

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA (FISIOLÓGÍA ANIMAL)



EFFECTO DEL HABITAT SOBRE LA ENDOCRINOLOGIA GONADAL
Y ADRENAL EN EL RINOCERONTE BLANCO (*Ceratotherium simum*)

TESIS DOCTORAL DE:

LETICIA MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**JUAN CARLOS ILLERA DEL PORTAL
GEMA SILVÁN GRANADO**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)



**EFFECTO DEL HÁBITAT SOBRE LA ENDOCRINOLOGÍA
GONADAL Y ADRENAL EN EL RINOCERONTE BLANCO
(*Ceratotherium simum*)**

Memoria para optar al grado de Doctor, presentada por

Leticia Martínez Fernández

Bajo la dirección de los Doctores

Juan Carlos Illera del Portal

Gema Silván Granada

Madrid, 2013



El **Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal** y la **Dra. Dña. Gema Silván Granado**,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral titulada: **"EFECTO DEL HÁBITAT SOBRE LA ENDOCRINOLOGÍA GONADAL Y ADRENAL EN EL RINOCERONTE BLANCO (*Ceratotherium simum*)"**, realizada por Dña. **Leticia Martínez Fernández**, bajo nuestra dirección, es apta para ser presentada ante el tribunal calificador.

Este trabajo, que presenta para optar al título de Doctor, ha sido realizado en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a 20 de marzo de 2013.

VºBº Directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: Juan Carlos Illera del Portal

Fdo.: Gema Silván Granado

Fdo.: Leticia Martínez Fernández

A mi familia.

*A todas aquellas personas
que se implican en la conservación de la vida salvaje*

AGRADECIMIENTOS

Y por fin ha llegado el momento...

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han apoyado y ayudado en la realización de esta Tesis Doctoral, y mis disculpas, por si aquí se me olvidara citar a alguien, porque todos habéis formado parte de esto.

A mis directores de Tesis, Juan Carlos Illera y Gema Silván. No tengo palabras suficientes de agradecimiento, sin vosotros, simplemente esto no hubiera sido posible. Juan Carlos, gracias por ofrecerme esta oportunidad y por haber confiado en mí desde el principio. Me has permitido trabajar en lo que más me gusta, poniendo a mi disposición, todos los medios que estaban a tu alcance. Siempre has querido lo mejor para mí y con tu vital optimismo, has hecho siempre lo imposible para verme feliz. Gema, gracias por hacerme sentir parte de un equipo, por todo tu esfuerzo y dedicación para formarme e introducirme en este mundo. Nunca dejaré de sorprenderme con todo lo que sabes y todo lo que me has enseñado. Gracias por haber estado siempre tan accesible y paciente con mis dudas, no lo hubiera conseguido sin tu infinita ayuda en todo el proceso. Pocas veces he conseguido que estuviésemos de acuerdo en algo, pero vuestra distinta opinión, hace que juntos forméis un gran equipo, el mejor que se puede tener.

A todo el Departamento de Fisiología en general, por haber estado siempre pendientes y dispuestos a ayudarme. Alfredo, gracias por tu apoyo incondicional y todo lo que he aprendido contigo. May, gracias por tus consejos y por compartir batallitas con las curvas. M^a Jose, gracias por haber hecho posible mi viaje a Sudáfrica y apoyar mi creatividad. Carmen, gracias por tus maravillas con el *photoshop* y tus ganas de aprender juntas y por supuesto, por cuidar tan bien del laboratorio por mucho trabajo que se acumulase. Alberto, porque siempre estás ahí para arreglar lo imposible y lo consigues. Juan, gracias por tu interés y simpatía.

Al Prof. Henk Bertschinger por aconsejarme y encontrarme sitio en una reserva, además de permitirme el acceso a la Universidad de Pretoria. A Mario Smuths, por preocuparte de mis muestras y enseñarme tus técnicas de laboratorio.

A la Reserva de Mabula y a todo su personal. A Danie Houbert por acogerme y permitirme "patrullar" la reserva en busca de rinocerontes. Y muy especialmente a Jock McMillan y Shani Preller, que desde el primer día y sin conocerme, me aceptasteis en vuestra casa y me hicisteis sentir una más. Jock, gracias a tu apoyo pude conseguir las tan ansiadas muestras, hiciste lo imposible porque todo saliera bien y me enseñaste a aprender de la naturaleza y solucionar cualquier problema. Shani (*my hippie sis*), gracias a ti aprendí todo lo que sé sobre huellas y animales. Me diste tu apoyo incondicional en todo momento y conocí a la increíble persona que eres. Ya sabes que tienes a una hermana donde quiera que estemos. Hemos compartido juntos momentos inolvidables, me regalasteis la mejor experiencia de mi vida y vosotros sois parte de ella. Resulta increíble todo lo que los animales te pueden enseñar y más aún, con el lujo de contar con gente como vosotros a mi lado.

A todo el equipo del Zoo de Madrid. Especialmente a Jesús Fernández y Eva Martínez, por permitirme estudiar a vuestros rinos y haber estado siempre disponibles, además del fabuloso trato que siempre me habéis brindado. Gracias también a todos los cuidadores que se han implicado con las muestras.

A todo el equipo del Bioparc de Valencia. Especialmente a Miguel Casares, cuya incansable dedicación a los animales, me permitió introducirme en el mundo de los rinocerontes. Gracias por dejarme estudiar a vuestros rinos y por hacerme sentir como una más durante mi estancia con vosotros. Gracias también a todo el equipo de cuidadores que aunque en condiciones agotadoras, me acogieron y se preocuparon por aprender para ayudarme en el estudio.

Al Prof. Franz Schwarzenberger por tutelar mi trabajo durante mi estancia en la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena y haber sabido aconsejarme en cada momento. Al Prof. Erick Möstl, por sus charlas acerca de la cromatografía y su ayuda en este proyecto. A Elke, por ayudarme y enseñarme con los análisis del laboratorio.

A toda la gente que he tenido la suerte de conocer a lo largo de esta etapa: Laura, Noe, Asun, Sara, Tania, Adri, Sole, Loren, Jimena, Fernando...Especialmente a Lau, porque siempre has estado y estarás ahí sin importar la distancia (¡y que vivan nuestros chispacitos!). Y a mi gran descubrimiento, Jose. Después de mi equivocada primera impresión, conocí a la gran persona que eres. Gracias por tu ayuda incondicional con los análisis estadísticos y tu infinita paciencia y sobre todo, gracias por querer ser parte de todo esto.

A mis amigos de hoy y de siempre. A mi grupo de biólogos (Eva, Belen, Ro liso, Eli, Roci, Iván y Titus) porque siempre me habéis apoyado en todo y nada sería lo mismo sin vosotros, me conocéis demasiado bien y sobre todo, me hacéis feliz. A Sergio, porque siempre has sabido solucionar mis problemas informáticos y le has dado un toque especial a todo el formato, gracias por tu tiempo y tus ideas. A Raúl, porque aunque has sufrido los momentos más duros, nunca has dejado de intentar hacerme sonreír. Gracias por enseñarme tu mundo y compartirlo conmigo. Y por supuesto a mi alma gemela, Cris, porque sin ti nada sería lo mismo, estás a mi lado en cada paso del camino, eres mi fuerza, mi alegría, mi todo.

A mi familia al completo, iporque sé que no hay otra mejor! En especial a mis padres, Carlos y Conchi; hermanos, Carli (y Aniten), Samu y Andrea y a mi recién llegado sobrino Nico. Siempre me habéis apoyado y animado a seguir adelante, porque siempre queréis lo mejor para mi, y siempre me lo dais.

Soy como soy gracias a todos vosotros. Os quiero.

ÍNDICE

RELACIÓN DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS	XIII
RESUMEN.....	- 1 -
ABSTRACT.....	- 11 -
I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	- 19 -
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	- 31 -
1. EL RINOCERONTE BLANCO	- 33 -
1.1. Clasificación actual del rinoceronte	- 34 -
1.2. Hábitat y reproducción.....	- 37 -
1.3. Comportamiento	- 39 -
1.3.1. Comportamiento social y niveles hormonales.....	- 42 -
1.3.2. Comportamiento reproductor y niveles hormonales	- 43 -
1.3.3. Evaluación de la respuesta de adaptación.....	- 46 -
2. HORMONAS ESTEROIDES.....	- 48 -
2.1. Síntesis, regulación y metabolismo de las hormonas esteroideas	- 48 -
2.2. Fisiología de los glucocorticoides	- 54 -
2.2.1. Funciones del cortisol	- 55 -
2.2.2. Distribución y metabolismo del cortisol	- 58 -
2.2.3. Factores que estimulan la liberación de cortisol	- 60 -
2.3. Fisiología de las hormonas sexuales	- 63 -
2.3.1. Andrógenos	- 63 -
2.3.2. Estrógenos	- 65 -
2.3.3. Progestágenos	- 70 -
2.3.4. Factores que estimulan la liberación de hormonas sexuales	- 72 -

3. MÉTODOS NO INVASIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	- 74 -
3.1. Enzimoinmunoanálisis (EIA)	- 76 -
3.1.1. Tipos de muestras biológicas para la determinación hormonal	- 78 -
3.1.2. Validación	- 80 -
3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	- 84 -
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 87 -
1. ANIMALES Y HÁBITAT	- 89 -
1.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo).....	- 89 -
1.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc).....	- 91 -
1.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)	- 94 -
2. COMPORTAMIENTO	- 99 -
2.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo).....	- 99 -
2.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc).....	- 100 -
2.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)	- 101 -
3. RECOGIDA DE MUESTRAS FECALES	- 102 -
3.1. Zoo de Madrid	- 102 -
3.2. Bioparc de Valencia.....	- 104 -
3.3. Reserva de Mabula (Sudáfrica)	- 104 -
4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS FECALES.....	- 106 -
4.1. Liofilizado de las muestras	- 106 -
4.2. Protocolo de extracción de heces	- 108 -
4.2.1. Protocolo para la extracción de glucocorticoides y progestágenos	- 108 -
4.2.2. Protocolo para la extracción de andrógenos y estrógenos	- 109 -
5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA resolución (HPLC).....	- 110 -
5.1. Preparación de las muestras fecales	- 110 -
5.2. Análisis HPLC	- 110 -

6. ANÁLISIS HORMONALES	- 111 -
6.1. Determinación de la concentración de estrógenos y andrógenos en heces..	
.....	- 111 -
6.2. Determinación de la concentración de progestágenos y glucocorticodes en heces.....	- 115 -
6.3. Parámetros de validación de las técnicas inmunoenzimáticas.....	- 118 -
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	- 119 -
7.1. Variables estadísticas empleadas	- 119 -
7.2. Análisis estadístico de los resultados	- 120 -
IV. RESULTADOS.....	- 123 -
1. VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS HORMONAL	- 125 -
1.1. Glucocorticoides.....	- 125 -
1.1.1. Relación glucocorticoides y estrés	- 127 -
1.2. Progestágenos	- 128 -
1.2.1. Relación progestágenos y gestación.....	- 128 -
1.3. Andrógenos y estrógenos.....	- 130 -
2. ANÁLISIS GENERAL.....	- 131 -
2.1. Glucocorticoides.....	- 131 -
2.2. Andrógenos.....	- 134 -
2.3. Progestágenos	- 136 -
2.4. Estrógenos	- 138 -
2.5. Determinación del sexo gonadal.....	- 140 -
3. GLUCOCORTICOIDES	- 141 -
3.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo).....	- 141 -
3.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)	- 143 -
3.3. Rinocerontes en libertad (Reserva).....	- 145 -

4. ANDRÓGENOS	- 148 -
4.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo).....	- 148 -
4.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc).....	- 149 -
4.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)	- 151 -
5. PROGESTÁGENOS	- 154 -
5.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo).....	- 154 -
5.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc).....	- 155 -
5.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)	- 157 -
6. ESTRÓGENOS	- 159 -
6.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo).....	- 159 -
6.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc).....	- 160 -
6.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)	- 162 -
7. CORRELACIONES HORMONALES Y CICLOS OVÁRICOS.....	- 164 -
7.1. Hembras en cautividad (Zoo)	- 164 -
7.2. Hembras en semi-cautividad (Bioparc)	- 167 -
7.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)	- 169 -
8. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO	- 170 -
8.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo).....	- 170 -
8.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc).....	- 170 -
8.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)	- 171 -
V. DISCUSIÓN	- 175 -
1. ANÁLISIS GENERAL.....	- 177 -
1.1. Glucocorticoides y estrés	- 177 -
1.2. Hormonas sexuales	- 183 -
1.2.1. Determinación del sexo gonadal.....	- 189 -

2. ANÁLISIS INDIVIDUAL.....	- 191 -
2.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo).....	- 191 -
2.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc).....	- 194 -
2.3. Rinocerontes en libertad (Reserva).....	- 198 -
VI. CONCLUSIONES.....	- 203 -
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 207 -

RELACIÓN DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

11-OXO EIA — 11 oxoetiocolanolona EIA

17 β -HSD — 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

3 β -HSD — 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

3CMO — 3-O-carboximetiloxima

Ac — Anticuerpo

ACTH — *Adrenocorticotrophic Hormone* - Hormona adrenocorticotropa

ADH — *Antidiuretic Hormone* - Hormona antidiurética (vasopresina)

Ag — Antígeno

AMPc — *cyclic Adenosine Monophosphate* - Monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA — *Analysis of Variance* - Análisis de la varianza

ARNm — Ácido ribonucleico mensajero

BSA — *Bovine Serum Albumine* - Albúmina de suero bovino

Ca — *Calcium* - Calcio

CBG — *Corticosteroid-binding Globulin* - Globulina portadora de corticosteroides

CIA — *Chemiluminescent Immunoassay* - Inmunoanálisis quimioluminiscente

CITES — *Convention on International Trade in Endangered Species* - Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres

CRH — *Corticotropin-releasing Hormone* - Hormona liberadora de corticotropina

CV — Coeficiente de variación

CYP11A1 — *Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1* - Citocromo P450, familia 11, subfamilia A, polipéptido 1

CYP11B1 — *Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1* -
Citocromo P450, familia 11, subfamilia B, polipéptido 1

CYP17 — *Cytochrome P450, family 17* - Citocromo P450, familia 17

CYP19 — *Cytochrome P450, family 19* - Citocromo P450, familia 19

CYP21A2 — *Cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2* -
Citocromo P450, familia 21, subfamilia A, polipéptido 2

DE — Desviación estándar

DHEA — *Dehydroepiandrosterone* - Dehidroepiandrosterona

DHT — *Dihydrotestosterone* - Dihidrotestosterona

DOA — Dioxoandrostano

E₁ — Estrona

E₂ — Estradiol

E₃ — Estriol

EIA — *Enzyme Immuno Assay* - Enzimoimmunoanálisis

ELISA — *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* - Análisis enzimático ligado a un
inmunoabsorbente

ESM — Error estándar de la media

EtOH — Etanol

FIA — *Fluorescent Immunoassay* - Inmunoanálisis fluorescente

FSH — *Follicle-stimulating Hormone* - Hormona estimulante de los folículos

g — *Gram* - Gramo

g — Unidades de fuerza centrífuga relativa

GABA — *Gamma Amino Butiric Acid* - Ácido gamma amino butírico

Gluc — Ácido glucurónico

GnRH — *Gonadotropin-releasing Hormone* - Hormona liberadora de gonadotropinas

HPA — *Hypotalamic-pituitary-adrenal (axis)* - Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

HPLC — *High-performance Liquid Chromatography* - Cromatografía líquida de alta resolución

HRP — *Horseradish Peroxidase* - Peroxidasa de rábano picante

IA — Inseminación Artificial

IRF — *International Rhino Foundation* - Fundación Internacional del Rinoceronte

IUCN — *International Union for Conservation of Nature* - Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

IUPAC — *International Union of Pure and Applied Chemistry* - Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

IVD — *In Vitro Diagnostics* - Diagnóstico *in vitro*

K — *Kalium (potassium)* - Potasio

kg — *Kilogram* - Kilogramo

kPa — *kilopascal* - Kilopascal

LDL — *Low-density Lipoprotein* - Lipoproteínas de baja densidad

LH — *Luteinizing Hormone* - Hormona luteinizante

m — *Meter* - metros

M — *Molar* - Molar

mg — *Milligram* - Miligramos

ml — *Milliliter* - Mililitros

μl — *Microliter* - Microlitro

mm — *Millimeter* - Milímetro

mM — *Millimolar* - Milimolar

N — Tamaño muestral

Na — *Natrium (sodium)* - Sodio

ng — *Nanogram* - Nanogramo

nm — *Nanometer* - Nanómetro

NS — No significativo

°C — *Celsius* - Grados Celsius (centígrados)

P₄ — *Progesterone* - Progesterona

pg — *Picogram* - Picogramo

pH — Símbolo de concentración de hidrogeniones

POMC — *Pro-opiomelanocortin* - Pro-opiomelanocortina

R — Coeficiente de correlación

R² — Coeficiente de regresión

RA — Receptor androgénico

RC — Reacciones cruzadas

REL — Retículo endoplásmico liso

RE α , RE β — Receptor de estrógenos alfa y beta

RIA — *Radioimmunoassay* - Radioinmunoanálisis

RP — Receptor de progesterona

S — *Sensitivity* - Sensibilidad

SNC — Sistema Nervioso Central

SO₄E₁ — Sulfato de estrona

SSC — *Species Survival Commission* - Comisión de la supervivencia de especies

St — Estándar

StAR — *Steroidogenic acute regulatory proteína* - Proteína esteroidogénica de regulación aguda

T — *Testosterone* - Testosterona

TMB — Timidilbencidina

UCM — Universidad Complutense de Madrid

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS Y TABLAS

Figura 1: Registro anual de rinocerontes asesinados debido a la caza furtiva en la última década.	- 33 -
Figura 2: Las cinco especies actuales de rinoceronte según sus diferentes tamaños..	- 35 -
Figura 3: Mapa de distribución geográfica del Rinoceronte Blanco.	- 36 -
Figura 4: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA).	- 47 -
Figura 5: Molécula de colesterol.	- 48 -
Figura 6: Molécula de pregnenolona.	- 50 -
Figura 7: Esquema de la glándula adrenal.	- 51 -
Figura 8: Síntesis de las distintas hormonas esteroideas a partir del colesterol.. -	52 -
Figura 9: Molécula de cortisol.	- 54 -
Figura 10: Molécula de testosterona.	- 63 -
Figura 11: Ruta bioquímica de la transformación testosterona – androstenediona – estrógenos.	- 64 -
Figura 12: Molécula de estradiol.	- 65 -
Figura 13: Molécula de estrona.	- 65 -
Figura 14: Molécula de progesterona.	- 70 -
Figura 15: Formato de microplaca de 96 pocillos.	- 114 -

∞

Gráfico 1: Resultados de HPLC de los glucocorticoides encontrados en heces de rinoceronte blanco.	- 126 -
Gráfico 2: Media de las concentraciones de glucocorticoides (ng/g), antes, durante y después de la gestación y el parto.	- 127 -
Gráfico 3: Perfil hormonal de las concentraciones de glucocorticoides (ng/g), antes, durante y después del parto de Marina.	- 128 -

Gráfico 4: Media de las concentraciones de progestágenos (ng/g), antes, durante y después de la gestación y el parto.	- 129 -
Gráfico 5: Perfil hormonal de la concentración de progestágenos (ng/g) antes de la inseminación artificial (IA) de Marina.	- 129 -
Gráfico 6: Perfil hormonal de la concentración de progestágenos (ng/g) durante la gestación y el parto de Marina.	- 129 -
Gráfico 7: Perfil hormonal de la concentración de progestágenos (ng/g) después de la gestación y parto de Marina.	- 130 -
Gráfico 8: Determinación de la concentración de andrógenos (a) y estrógenos (b), en diluciones seriadas de pools de heces de rinoceronte.	- 131 -
Gráfico 9: Comparación de la media de la concentración de glucocorticoides (ng/g) entre los tres hábitats estudiados.	- 132 -
Gráfico 10: Concentración de glucocorticoides entre invierno y verano en los tres hábitats del estudio.	- 132 -
Gráfico 11: Media de la concentración de glucocorticoides en machos y hembras.....	- 133 -
Gráfico 12: Concentración de glucocorticoides entre las estaciones de invierno y verano según el sexo de los rinocerontes.....	- 133 -
Gráfico 13: Comparación de la concentración de andrógenos (ng/g) entre los tres hábitats estudiados.....	- 134 -
Gráfico 14: Concentración de los andrógenos entre invierno y verano en los tres hábitats del estudio.	- 134 -
Gráfico 15: Media de la concentración de andrógenos en machos y hembras. -	- 135 -
Gráfico 16: Concentración de andrógenos entre las estaciones de invierno y verano según el sexo de los rinocerontes.	- 135 -
Gráfico 17: Comparación de la concentración de progestágenos (ng/g) entre los tres hábitats estudiados..	- 136 -
Gráfico 18: Concentración de progestágenos entre invierno y verano en los tres hábitats del estudio.	- 136 -

Gráfico 19: Media de la concentración de progestágenos en machos y hembras.....	- 137 -
Gráfico 20: Concentración de progestágenos entre las estaciones de invierno y verano según el sexo de los rinocerontes.....	- 137 -
Gráfico 21: Comparación de la concentración de estrógenos (ng/g) entre los tres hábitats estudiados.....	- 138 -
Gráfico 22: Concentración de estrógenos entre invierno y verano en los tres hábitats del estudio.	- 138 -
Gráfico 23: Media de la concentración de estrógenos en machos y hembras..	- 139 -
Gráfico 24: Concentración de estrógenos entre las estaciones de invierno y verano según el sexo de los rinocerontes.	- 139 -
Gráfico 25: Comparación de la concentración de glucocorticoides (ng/g) entre el macho y las dos hembras de rinoceronte blanco en cautividad.	- 142 -
Gráfico 26: Perfil hormonal de los glucocorticoides de las hembras (izquierda) y el macho (derecha) del Zoo de Madrid (cautividad).	- 142 -
Gráfico 27: Diferencia de la media de glucocorticoides entre las dos hembras (a), Nombula y Maiai y entre los dos machos (b), Rómulo y Cirilo, en semi-cautividad... ..	- 143 -
Gráfico 28: Perfil hormonal de los glucocorticoides de las hembras de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).	- 144 -
Gráfico 29: Perfil hormonal de los glucocorticoides de los machos de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).	- 144 -
Gráfico 30: Diferencia de la media de glucocorticoides entre las cinco hembras (a) y los tres machos (b) en libertad.	- 145 -
Gráfico 31: Perfil hormonal de los glucocorticoides de las cinco hembras en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva). ..	- 147 -
Gráfico 32: Perfil hormonal de los glucocorticoides de los tres machos en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva). ..	- 147 -
Gráfico 33: Comparación de la concentración de andrógenos (ng/g) entre los tres rinocerontes mantenidos en cautividad.....	- 148 -

Gráfico 34: Perfil hormonal de los andrógenos de las dos hembras (izquierda) y el macho (derecha) mantenidos en cautividad (Zoo). - 149 -

Gráfico 35: Comparación de la concentración de andrógenos (ng/g) entre Nombula y Maiai (a) y Rómulo y Cirilo (b)..... - 149 -

Gráfico 36: Perfil hormonal de los andrógenos de las hembras de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc). - 150 -

Gráfico 37: Perfil hormonal de los andrógenos de los machos de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc). - 151 -

Gráfico 38: Comparación entre invierno y verano de la media de la concentración de andrógenos (ng/g) de cada hembra (a) y cada macho (b) de los rinocerontes en libertad. - 152 -

Gráfico 39: Perfil hormonal de los andrógenos de las cinco hembras en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva). .. - 153 -

Gráfico 40: Perfil hormonal de los andrógenos de los tres machos en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva). .. - 153 -

Gráfico 41: Comparación de la concentración de progestágenos (ng/g) entre el macho y las dos hembras de rinoceronte blanco en cautividad. - 154 -

Gráfico 42: Perfil hormonal de los progestágenos de las dos hembras (izquierda) y el macho (derecha) mantenidos en cautividad (Zoo). - 154 -

Gráfico 43: Perfil hormonal de los progestágenos del rinoceronte macho del Zoo. - 155 -

Gráfico 44: Comparación de la concentración de progestágenos (ng/g) entre Nombula y Maiai (a) y entre Rómulo y Cirilo (b). - 155 -

Gráfico 45: Perfil hormonal de los progestágenos de las hembras de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc). - 156 -

Gráfico 46: Perfil hormonal de los progestágenos de los machos de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc). - 157 -

Gráfico 47: Comparación entre invierno y verano de la media de la concentración de progestágenos de cada hembra (izquierda) y cada macho (derecha) de los rinocerontes en libertad..... - 157 -

Gráfico 48: Perfil hormonal de los progestágenos en las cinco hembras en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva). .. - 158 -

Gráfico 49: Perfil hormonal de los progestágenos en los tres machos en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva). .. - 159 -

Gráfico 50: Comparación de la concentración de estrógenos (ng/g) entre el macho y las dos hembras de rinoceronte blanco en cautividad..... - 159 -

Gráfico 51: Perfil hormonal de los estrógenos de las dos hembras (izquierda) y el macho (derecha) mantenidos en cautividad (Zoo). - 160 -

Gráfico 52: Comparación de la concentración de estrógenos (ng/g) entre Nombula y Maiai (a) y Rómulo y Cirilo (b)..... - 160 -

Gráfico 53: Perfil hormonal de los estrógenos de las hembras de rinoceronte mantenidas en semi-cautividad (Bioparc). - 161 -

Gráfico 54: Perfil hormonal de los estrógenos de los machos de rinoceronte mantenidos en semi-cautividad (Bioparc). - 162 -

Gráfico 55: Comparación entre invierno y verano de la media de la concentración de estrógenos (ng/g) de cada hembra (a) y cada macho (b) de los rinocerontes en libertad. - 162 -

Gráfico 56: Perfil hormonal de los estrógenos en las cinco hembras en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva). .. - 163 -

Gráfico 57: Perfil hormonal de los estrógenos en los tres machos en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva). .. - 164 -

Gráfico 58: Perfil hormonal de los glucocorticoides y de los progestágenos de Marina antes de la inseminación artificial (IA). - 165 -

Gráfico 59: Perfil hormonal de los glucocorticoides y de los progestágenos de Marina durante la gestación y parto. - 165 -

Gráfico 60: Perfil hormonal de los glucocorticoides y de los progestágenos de Marina después de la gestación. - 166 -

Gráfico 61: Perfil hormonal de los progestágenos y de los estrógenos de Marina durante los meses de estudio del año 2010..... - 166 -

Gráfico 62: Perfil hormonal de los progestágenos y de los estrógenos de la Hembra Vieja..... - 167 -

Gráfico 63: Perfil hormonal de los progestágenos y de los estrógenos de Maiai..... - 168 -

Gráfico 64: Perfil hormonal de los progestágenos y de los estrógenos de Nombula... - 168 -

Gráfico 65: Frecuencia relativa de los comportamientos observados en cada hembra de rinoceronte blanco en semi-libertad (Bioparc). - 170 -

Gráfico 66: Frecuencia relativa de los comportamientos observados en cada hembra de rinoceronte blanco en semi-libertad (Bioparc). - 171 -

Gráfico 67: Frecuencia relativa de los comportamientos observados en cada hembra de rinoceronte blanco en libertad (Reserva). - 171 -

Gráfico 68: Frecuencia relativa de los comportamientos observados en cada macho de rinoceronte blanco en libertad (Reserva). - 172 -

Gráfico 69: Diferencia en la concentración media de testosterona (ng/g) en los rinocerontes en libertad (Reserva), cuando los rinocerontes se encuentran en estado "normal y tranquilo" (0) y cuando presentan alguna de las conductas analizadas (1). - 173 -

∞

Imagen 1: Esquema de la técnica EIA de competición. - 77 -

Imagen 2: Esquema básico del mecanismo típico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). - 85 -

Imagen 3: Recinto de día de la pareja reproductora de rinoceronte blanco del Zoológico de Madrid..... - 90 -

Imagen 4: Recinto de día los rinocerontes del Bioparc de Valencia..... - 91 -

Imagen 5: Marcas características de comportamiento territorial realizadas por el macho territorial en la Reserva..... - 102 -

Imagen 6: Liofilizador utilizado en Sudáfrica (izquierda); liofilizador utilizado en España (derecha). - 107 -

∞

Tabla 1: Etograma de comportamiento específico del rinoceronte blanco salvaje.....	- 41 -
Tabla 2: Resumen de algunos ejemplos de límites de sensibilidad en la determinación hormonal en diferentes tipos de muestras biológicas.	- 81 -
Tabla 3: Código para la monitorización del comportamiento reproductor del rinoceronte blanco (Bioparc).	- 100 -
Tabla 4: Códigos de los comportamientos observados en los rinocerontes en semi-cautividad.....	- 100 -
Tabla 5: Códigos de los comportamientos observados en las hembras y los machos de los rinocerontes en libertad (Reserva).....	- 101 -
Tabla 6: Comportamientos observados en los rinocerontes en libertad (Reserva) agrupados para el análisis estadístico.....	- 101 -
Tabla 7: Número de muestras fecales totales de cada rinoceronte en libertad.	- 105 -
Tabla 8: Modelos de regresión logística binaria para evaluar la capacidad predictiva de las concentraciones de andrógenos y estrógenos sobre el sexo del individuo.....	- 140 -
Tabla 9: Porcentaje de clasificación de las muestras obtenidas de cada sujeto por los modelos I y II.	- 141 -
Tabla 10: Resumen de la correlación entre la concentración de glucocorticoides y los distintos rinocerontes del Bioparc.....	- 145 -
Tabla 11: Diferencias estadísticas entre la media de glucocorticoides de las cinco hembras en libertad.....	- 145 -
Tabla 12: Valor medio de la concentración de glucocorticoides de cada uno de los rinocerontes en libertad.....	- 146 -
Tabla 13: Resumen de la correlación de la concentración de glucocorticoides entre los distintos rinocerontes de la Reserva.	- 147 -
Tabla 14: Nivel de significación en la comparación de la media de la concentración de andrógenos entre los cuatro rinocerontes en semi-cautividad.....	- 150 -

Tabla 15: Resumen de la correlación de la concentración de andrógenos entre los distintos rinocerontes del Bioparc. - 151 -

Tabla 16: Valor medio de la concentración de andrógenos (ng/g) de cada uno de los rinocerontes en libertad..... - 152 -

Tabla 17: Resumen de la correlación en la concentración de andrógenos entre los distintos rinocerontes de la Reserva..... - 153 -

Tabla 18: Nivel de significación en la comparación de la media de la concentración de progestágenos entre los cuatro rinocerontes en semi-cautividad. - 156 -

Tabla 19: Valor medio de la concentración de progestágenos de cada uno de los rinocerontes en libertad..... - 158 -

Tabla 20: Nivel de significación en la comparación de la media de la concentración de estrógenos (ng/g) entre los cuatro rinocerontes en semi-cautividad. - 161 -

Tabla 21: Valor medio de la concentración de estrógenos (ng/g) de cada uno de los rinocerontes en libertad..... - 163 -

Tabla 22: Análisis de correlación entre las distintas hormonas analizadas. - 164 -

Tabla 23: Análisis de correlación entre los glucocorticoides y los progestágenos..... - 165 -

Tabla 24: Análisis de correlación entre las distintas hormonas analizadas. - 167 -

Tabla 25: Análisis de correlación entre las distintas hormonas analizadas. - 169 -

Tabla 26: Número de conductas observadas, clasificadas según el grupo, en cada uno de los rinocerontes en libertad (Reserva). - 172 -

RESUMEN

I. Introducción

A finales del siglo XIX, numerosos esfuerzos de protección y translocación de ejemplares consiguieron salvar de la extinción a la única población remanente de rinoceronte blanco que subsistía con solo 20-50 individuos en KwaZulu-Natal (Sudáfrica). En la actualidad, se estiman unos 20.170 rinocerontes blancos, siendo Sudáfrica el país que alberga a la gran mayoría de esta especie (93,2%).

Actualmente, la mayor amenaza a la que se enfrenta esta especie en libertad es la caza furtiva, debida principalmente, a la creciente demanda ilegal de los cuernos en el mercado negro oriental. Hoy en día, los aproximadamente 750 individuos que se mantienen en cautividad en todo el mundo, podrían ser la única salvaguarda de la especie, con el inconveniente de que todavía se desconocen las causas de su baja tasa reproductora en cautividad. Es sabido, que las condiciones de cautividad alteran los ciclos biológicos y hormonales normales del animal, que no solo desembocan en fracaso reproductivo, sino que también alteran su bienestar y su comportamiento social. Por tanto, aún queda mucho por investigar acerca de la endocrinología gonadal y adrenal de esta especie, para conseguir no solo aumentar su éxito reproductivo en cautividad, sino también mejorar el manejo de las poblaciones.

En los rinocerontes en libertad, no solo la competitividad macho-macho parece importante para estimular el comportamiento sexual masculino, sino que, además, parece necesario que las hembras puedan ejercer cierta selección entre los posibles machos reproductores, pues se reproducen más a menudo con machos alfa, que con machos beta no territoriales (Rachlow *et al.*, 1998). Sin embargo, en cautividad, este comportamiento sexual depende principalmente de la estructura social artificial en la que se encuentren, determinado por el número de hembras y/o machos que convivan juntos y su estatus social dentro del grupo.

Las hormonas desempeñan un papel crucial en la regulación del comportamiento y coordinan los procesos fisiológicos de desarrollo en todos los organismos vivos. Por ello, las técnicas no invasivas de determinación hormonal, están cobrando cada día más importancia por su utilidad, entre otras, para el manejo de poblaciones salvajes. Así, el análisis hormonal en heces, en concreto de los niveles de glucocorticoides, se ha considerado como un importante evaluador de la relación entre los factores estresantes ambientales y el bienestar del animal que además, parecen ejercer cierta supresión sobre la reproducción (Moberg, 1991).

En muchas especies, la variación hormonal está regulada por cambios estacionales. Los rinocerontes macho en libertad, tienen mayores niveles de andrógenos durante la estación lluviosa, que coincide con los cambios comportamentales observados en dichos animales, sugiriendo un patrón reproductivo estacional (Kretzschmar *et al.*, 2004). La testosterona ha sido asociada con la dominancia, la territorialidad y el comportamiento sexual, estableciendo una conexión entre la fisiología y el comportamiento reproductivo en los machos de rinoceronte blanco (Rachlow *et al.*, 1998). Además, los niveles de andrógenos en heces parecen estar más relacionados con el rango social que con la edad, e incluso, dichos niveles aumentan cuando se encuentran en presencia de otros machos y hembras (Kretzschmar *et al.*, 2004, Christensen *et al.*, 2009).

El análisis no invasivo de hormonas sexuales, ha sido utilizado para intentar dilucidar las causas del fracaso reproductor, evaluando la ciclicidad ovárica femenina mediante las concentraciones de progestágenos y/o estrógenos (Schwarzenberger *et al.*, 1998). A pesar de la gran variabilidad individual que existe en esta especie en relación a la duración del ciclo estral, existen dos tipos principales de ciclos: cortos (4 semanas) y largos (10 semanas) (Hermes *et al.*, 2012). Por otro lado, se han encontrado evidencias que apoyan que la proporción entre andrógenos y estrógenos determina el sexo gonadal en todas las especies del reino animal (Tiway y Li, 2009).

◇ Objetivos:

La hipótesis general de nuestro estudio, es que los factores socio-ambientales, determinados según el tipo de hábitat, alteran los ciclos biológicos del rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*). Por ello, el principal objetivo de este proyecto de Tesis Doctoral es estudiar y comparar los perfiles hormonales de tres poblaciones de rinoceronte blanco: cautividad, semi-cautividad y libertad para determinar la relación entre la endocrinología gonadal y adrenal con las distintas condiciones de cautividad y el comportamiento reproductivo. De esta manera, se profundizará en el conocimiento de lo que ocurre en dicha especie en su hábitat natural con el fin de intentar aumentar su éxito reproductivo y bienestar en cautividad, además de mejorar el manejo de las poblaciones.

Para ello y de forma más específica, se proponen los siguientes objetivos:

1. Relacionar los niveles de glucocorticoides en heces con los factores socio-ambientales y las condiciones de cautividad en que se encuentra cada grupo de rinocerontes (grupos sociales, época del año, comportamiento), a través de la determinación y validación de los niveles de glucocorticoides mediante técnicas no invasivas, análisis de comportamiento social mediante observaciones *in situ* de cada rinoceronte en su hábitat, estudio detallado de cada tipo de hábitat y valoración de la influencia de la época del año.
2. Estudiar el comportamiento reproductivo y determinar las posibles causas del fracaso reproductor mediante la determinación de la concentración de hormonas sexuales (andrógenos, progestágenos y estrógenos) utilizando técnicas no invasivas, estudio detallado de cada tipo de hábitat y determinación de la influencia estacional sobre las hormonas sexuales mediante la comparación de los resultados entre los meses de invierno y verano.
3. Realización de un modelo de regresión logística binaria para predecir el sexo de los rinocerontes mediante la concentración de andrógenos y estrógenos en heces.

II. Material y métodos

Se recogieron un total de 572 muestras de heces correspondientes a 15 rinocerontes blancos (*Ceratotherium simum*), 9 hembras y 6 machos, entre los años 2009-2011, procedentes de tres instituciones que manejan esta especie:

- **Cautividad:** tres ejemplares de rinoceronte blanco (2 hembras y 1 macho) del Zoológico de Madrid, donde se recogieron un total de 129 muestras de heces.
- **Semi-cautividad:** grupo de 4 rinocerontes (2 hembras y 2 machos) del Bioparc de Valencia, obteniéndose un total de 286 muestras de heces. Se ha considerado como semi-cautividad por su esfuerzo en recrear lo más fielmente posible las condiciones del hábitat natural de estos animales, aportando espacios más amplios con un entorno muy similar a la sabana africana.
- **Libertad:** 8 rinocerontes blancos (5 hembras y 3 machos) de la Reserva de Mabula (Sudáfrica), donde se recogieron un total de 157 muestras de heces. Fue considerada como la población de rinocerontes en libertad, porque las condiciones que mantienen los animales son lo más parecidas posibles a las que poseen los rinocerontes completamente salvajes.

Se analizaron los perfiles hormonales y el comportamiento social y reproductor que presentaban los animales en cada hábitat. De esta manera, se determinaron las causas que pudieran estar influyendo tanto en su biología reproductiva como en su comportamiento reproductor, tomando como referencia los resultados obtenidos en una población en libertad. Para la evaluación del comportamiento, se utilizó como base el etograma de comportamiento de Owen-Smith (1973) sobre el rinoceronte blanco salvaje, realizando unas tablas con los códigos básicos de las conductas observadas. Se validó el metabolito de cortisol para la especie, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó la técnica ELISA de competición para analizar las distintas hormonas esteroides en heces (glucocorticoides, andrógenos, progestágenos y estrógenos).

Para evaluar el efecto de las variables *estación*, *sexo* y *hábitat* se analizaron los valores medios de cada sujeto mediante el empleo de estadística no paramétrica (test de *Wilcoxon*; prueba *U de Mann-Whitney* y ANOVA por rangos de *Kruskall-Wallis*, respectivamente), utilizando la corrección de *Bonferroni* en los casos necesarios. El efecto de la interacción entre las variables *estación* y *sexo* se evaluó mediante el test de *Wilcoxon*; entre *estación* y *hábitat* mediante el test de *Kruskall-Wallis*. La relación existente entre las variables continuas fue evaluada empleando la correlación de *Pearson*. Para el análisis estadístico del comportamiento, se compararon los niveles de las distintas variables hormonales con los comportamientos observados mediante la prueba *T de Student*. Finalmente, para la determinación del sexo gonadal, se ajustaron tres modelos de regresión logística binaria que evaluaron la capacidad predictiva de las concentraciones de andrógenos y estrógenos sobre el sexo, empleando las medias hormonales de los sujetos para modelar la variable sexo y poder clasificar cada muestra (304 y 268 de hembras y machos, respectivamente), valorando el acierto en la clasificación. El nivel de confianza de todos los análisis estadísticos utilizados fue del 95%, considerándose significativos los valores de $p < 0,05$.

III. Resultados y discusión

En nuestro estudio, se encontró una correlación entre las concentraciones de glucocorticoides y las condiciones de cautividad en las que se encuentran los rinocerontes, de forma que cuanto más estrictas son dichas condiciones de cautividad, mayores niveles de glucocorticoides presenta esta especie. El metabolito de cortisol analizado y validado para la especie fue el 5 α -pregnano-3 β , 11 β , 21-triol-20-ona. Para determinar su relación con el estrés, y mantener el carácter no invasivo de este estudio, tomamos como referencia los niveles de dicho metabolito en una situación natural estresante, el parto de una de las hembras (4.502,07 ng/g).

En condiciones de cautividad, parece que el estrés social recae sobre los animales subordinados, ya que no pueden evitar al individuo dominante (Creel *et al.*, 1996). En las hembras en semi-cautividad, pudimos relacionar la concentración hormonal con el rango social, observando la existencia de cierta jerarquía social. De esta forma, las concentraciones más elevadas de glucocorticoides, las encontramos en la hembra subordinada, y las concentraciones más altas de andrógenos en la hembra dominante. Sin embargo, en la población en libertad el aumento de los niveles de glucocorticoides y andrógenos, parecían estar más relacionados con la

convivencia conjunta de machos y hembras que con el rango social (Kretzschmar *et al.*, 2004, Christensen *et al.*, 2009).

Los niveles de glucocorticoides no presentaron cambios estacionales, aunque no podemos descartar que exista cierto patrón estacional y que la presión turística, la escasez de recursos durante el invierno, y/o las variaciones ambientales que ocurren en cada hábitat (temperatura, humedad y horas de luz), estén encubriendo una variación estacional que no ha podido ser detectada. Además, encontramos una diferencia significativa en los niveles de glucocorticoides en base al sexo, siendo superior en las hembras (hembras=901,77 ± 187,27 ng/g; machos=445,98 ± 105,65 ng/g), lo que podría estar relacionado tanto con la reproducción, como con la distinta respuesta a los estímulos estresantes que perciben, pero que, en cualquier caso, debe ser tomada en cuenta a la hora de valorar los niveles de glucocorticoides en esta especie en futuros trabajos.

Sin embargo, en todas las hormonas sexuales analizadas en la población de rinocerontes en su hábitat natural, hemos detectado variaciones hormonales según la estación, que no se apreció, o bien, ocurrió a la inversa, en condiciones de cautividad. Por un lado, los niveles de andrógenos, fueron estadísticamente superiores durante el verano o estación lluviosa (verano=131,33 ± 11,76 ng/g; invierno=58,69 ± 4,98 ng/g), tanto para los machos como para las hembras, lo que parece indicar la existencia de un patrón reproductivo estacional en el rinoceronte blanco que se pierde en condiciones de cautividad (Kretzschmar *et al.*, 2004). En la población de rinocerontes en libertad, también hemos observado un cambio estacional respecto a la concentración de progestágenos, que aumenta significativamente durante los meses de invierno sudafricano (invierno=568,31 ± 66,56 ng/g; verano=210,08 ± 26,74 ng/g). Puesto que los progestágenos son intermediarios en la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroides, este aumento podría estar relacionado con un aumento de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, para afrontar las difíciles condiciones en las que se encuentran los animales durante el invierno, y así obtener reservas suficientes para la producción de otras hormonas que sean requeridas. Además, en los rinocerontes en libertad, la concentración de estrógenos también fue estadísticamente superior en invierno (invierno=239,25 ± 8,02 ng/g; verano=158,70 ± 15,00 ng/g). Este aumento, también podría relacionarse con la tendencia reproductiva estacional, que se aprecia con los resultados de todas las hormonas sexuales en la población de rinocerontes en libertad.

Las concentraciones analizadas de glucocorticoides y andrógenos fueron relacionadas con el comportamiento. En la población en libertad, encontramos una interesante relación entre un aumento significativo en la concentración de andrógenos asociado a cualquiera de los comportamientos observados que diferían de su estado normal y tranquilo (territoriales, sexuales y agonísticos), sin que, sorprendentemente, ocurriera dicho aumento respecto a la concentración de glucocorticoides.

Mediante el análisis de progestágenos y estrógenos, también se determinaron los ciclos reproductivos de las hembras en semi-cautividad y sus posibles relaciones con las condiciones del hábitat y su rango social. En base a la concentración de progestágenos, la hembra dominante del hábitat de semi-cautividad, presentaba ciclos cortos cada $32,90 \pm 3,37$ días y parecía suprimir a la hembra subordinada, que no ciclaba con regularidad, observándose cierta inhibición reproductiva debida al rango social. En cautividad, también encontramos una hembra con ciclo corto ($27,20 \pm 2,25$ días) y otra hembra, cuyos elevados niveles de glucocorticoides ($2.237,34 \pm 92,69$ ng/g) podrían haber afectado a su función reproductora. A pesar de la gran variación individual encontrada en los patrones de sus ciclos reproductivos en esta especie, y de acuerdo a otros estudios, las concentraciones de progestágenos han servido como fiables indicadores de la gestación y de la fase lútea de estos animales (Schwarzenberger *et al.*, 1998), mientras que las concentraciones de estrógenos, no han resultado verdaderamente útiles pues no seguían un patrón cíclico determinado, pudiendo haber sido influenciadas por los fitoestrógenos ingeridos mediante la dieta (Tubbs *et al.*, 2012).

Las concentraciones de estrógenos y andrógenos, también fueron utilizadas para la determinación del sexo gonadal, que usamos para ajustar tres modelos de regresión logística binaria con el fin de evaluar la capacidad predictiva sobre el sexo de los rinocerontes, utilizando la proporción entre dichas hormonas como medida de discriminación entre ambos sexos. De los modelos planteados, seleccionamos el modelo II ($A > 1,46 E - 222$) que fue el que presentó una especificidad y sensibilidad más equilibrada en la determinación gonadal de los sexos, con una confianza media del 74,6%.

IV. Conclusiones

Según nuestra hipótesis principal, hemos comprobado que existe una correlación entre los niveles de glucocorticoides y las condiciones de cautividad en las que se encuentran los rinocerontes. Aunque no se ha encontrado un patrón estacional en relación a la concentración de glucocorticoides, sí se ha observado una diferencia en cuanto a las concentraciones medias entre machos y hembras, siendo superior en las hembras.

En su hábitat natural, los niveles de andrógenos fueron superiores durante el verano o estación lluviosa, lo que indica la existencia de un patrón reproductivo estacional en el rinoceronte blanco en libertad que se pierde en condiciones de cautividad. Por otro lado, existe una relación entre todos los comportamientos observados (territoriales, sexuales y agonísticos), que diferían de su estado normal, con un aumento en la concentración de andrógenos.

El análisis de las concentraciones de progestágenos fue un indicador fiable para la determinación de la fase lútea del ciclo ovárico y para la identificación de hembras gestantes en esta especie, no resultando fiable el análisis de estrógenos, posiblemente influenciados por los fitoestrógenos de la dieta.

El modelo de regresión logística binaria ajustado mediante las concentraciones de estrógenos y andrógenos, ha logrado un 74,6% de fiabilidad en la predicción del sexo en heces de rinoceronte blanco.

Nuestros resultados corroboran otros estudios que sugieren que la condición reproductiva, tanto en animales en cautividad como salvajes, puede ser evaluada mediante el análisis de hormonas esteroides en heces. Y por lo tanto, los métodos no invasivos de determinación hormonal han resultado ser potentes herramientas en el estudio de la endocrinología gonadal y adrenal del rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*).

V. Referencias bibliográficas

Christensen BW, Troedsson MHT, Young LJ, Oliva M, Penfold LM (2009). Effects of sociosexual environment on serum testosterone in captive male African rhinoceros. *Theriogenology* 71(7):1105-1111.

Creel S, Creel N, Monfort SL (1996). Social stress and dominance. *Nature* 379(6562):212.

- Hermes R, Hildebrandt TB, Walzer C, Göritz F, Gray C, Niemuller C, Schwarzenberger F (2012). Estrus induction in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Theriogenology* 78(6):1217-1223.
- Kretzschmar P, Ganslober U, Dehnhard M (2004). Relationship between androgens, environmental factors and reproductive behavior in male white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Hormones and Behavior* 45(1):1-9.
- Moberg GP (1991). How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science* 74(1):304-311.
- Owen-Smith R (1973). *The behavioural ecology of the white rhinoceros* (Tesis Doctoral). Universidad de Wisconsin, Madison, EEUU.
- Rachlow JL, Berkeley EV, Berger J (1998). Correlates of male mating strategies in white rhinos (*Ceratotherium simum*). *Journal of Mammalogy* 79(4):1317-1324.
- Schwarzenberger F, Walzer C, Tomasova K, Vahala J, Meister J, Goodrowe KL, Zima J, Strauß G, Lynch M (1998). Faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Animal Reproduction Science* 53(1-4):173-190.
- Tiwary BK, Li W (2009). Parallel evolution between aromatase and androgen receptor in the animal kingdom. *Molecular Biology and Evolution* 26(1):123-129.
- Tubbs C, Hartig P, Cardon M, Varga N, Milnes M (2012). Activation of southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) estrogen receptors by phytoestrogens: Potential role in the reproductive failure of captive-born females? *Endocrinology* 153(3):1444-1452.

ABSTRACT

I. Introduction

In the late XIX century, 20-50 individuals were the only remaining population of White Rhino located in KwaZulu-Natal (South Africa). Many efforts of protection and translocations managed to save the species from the brink of extinction. At present, it is estimated a total of 20,170 White Rhinos in the wild, while South Africa remains the stronghold for this species (93.2%).

Actually, the biggest threat facing this species is poaching, mainly due to the growing demand of its horn in the illegal Eastern black market. Today, the approximately 750 White Rhinoceros worldwide that remain in captivity may be the only safeguard of the species, with the drawback that even today, are not clearly known the causes for their low reproductive rate in captivity. It is well known that captive conditions alter their biological and hormonal cycles, which not only lead to reproductive failure, also alter their welfare and social behaviour. That is why there is still much research needed on this species, not only to increase their reproductive success in captivity, but also to improve population's management.

In free-ranging rhino populations, not only male-male competition seems essential to stimulate male sexual behaviour, but it also seems necessary that females can exert some selection among potential breeding males, because they tend to reproduce more often with alpha males, than with beta non territorial males (Rachlow *et al.*, 1998). However, in captivity, since there are primarily dependent on the artificial social structure in which they are living, this reproductive behaviour is determined by the number of females and / or males that live together and their social status within the group.

Hormones play a crucial role in the regulation of behavioural and physiological processes coordinating the development in all living organisms. Therefore, non-invasive techniques for determining hormones are becoming increasingly important for their utility, principally, in the management of free-ranging populations. Thus, hormonal analysis of glucocorticoids in faeces has proved to be an important evaluator in the relation between environmental stressors and animal condition, and also, believed to be involved in generating reproductive suppression (Moberg, 1991).

In many species, hormonal changes are regulated by seasonal changes. Free-ranging male rhinos have higher levels of androgen during the rainy season, which coincides with the behavioural changes observed in these animals, suggesting a seasonal reproductive pattern (Kretzschmar *et al.*, 2004). Testosterone has been associated with dominance, territoriality and sexual behaviour, establishing a connection between physiology and reproductive behaviour in male White Rhinoceros (Rachlow *et al.*, 1998). In addition, faecal testosterone levels are more related to social status than with age, and also, those levels increase when in the presence of other males and females (Kretzschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009).

Non-invasive analysis of sex hormones has been used to try to elucidate the causes of reproductive failure, assessing female ovarian cyclicity by determining progesterone and / or estrogen concentrations (Schwarzenberger *et al.*, 1998). Despite the great individual variability in the duration of the estrous cycle in this species, there are recognized two principal types: short cycle length (4 weeks) and long cycle length (10 weeks) (Hermes *et al.*, 2012). Furthermore, evidence was found to support that the ratio between androgens and estrogens is useful for gonadal sex determination in all species (Tiwary and Li, 2009).

◆ **Objectives:**

The hypothesis of our study is that socio-environmental factors, determined by habitat conditions, alter the biological cycles of the White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*). Therefore, the main aim of this PhD project is to study and compare the different habitats and hormonal profiles in three populations of White Rhinos: captivity, semi-captivity and wild population, to determine the relation between gonadal and adrenal endocrinology with different captive conditions and reproductive behaviour. Thus, we can increase the knowledge of what happens in this species in its natural habitat in order to improve their reproductive success and welfare in captivity, and progress in the management of rhino populations.

For this purpose and more specifically we propose the following objectives:

1. Relate faecal glucocorticoid levels with environmental and social factors under captive conditions associated with each type of habitat (social groups, time of year, behaviour), determining and validating glucocorticoid levels by non-invasive techniques, analysis of social behaviour by *in situ* observations of each rhino, and a detailed study of habitat conditions while assessing the influence of the time of year.

2. Study the reproductive behaviour and determine the possible causes of reproductive failure, measuring the concentration of sex hormones (androgens, progestagens and estrogens) by a non-invasive technique, and a detail study of habitat conditions, determining the seasonal influence on sex hormones by comparing the results in winter and summer months. In addition, androgen and estrogen concentrations, will be use to adjust a binary logistic regression model to predict the sex of the rhinos.
3. Performing a binary logistic regression model by measuring faecal androgen and estrogen concentration to predict the sex of the rhinos.

II. Material & Methods

A total of 572 faecal samples from 15 White Rhinos (*Ceratotherium simum*), corresponding to 9 females and 6 males, were collected among the years 2009-2011 from three different institutions:

- **Captivity:** 3 White Rhinoceros (2 females and 1 male) from the Zoo of Madrid. We have colleted a total of 129 faecal samples.
- **Semi-captivity:** a group of 4 White Rhinos (2 females and 2 males) from the Bioparc of Valencia, where we have collected 286 faecal samples. It has been considered as semi-captivity for their effort to recreate as closely as possible the natural habitat conditions of these animals, providing wider spaces with a very similar environment to African savannah.
- **Wild:** A total of 157 faecal samples were collected from 8 White Rhinos (5 females and 3 males) from the Reserve of Mabula (South Africa), which was considered our wild rhino population because animal conditions were as similar as possible to those compared to completely free-ranging rhinos.

We have analyzed the hormonal profiles and the social and reproductive behavior from each animal in their different habitat conditions. Thus, we determined the causes that could be influencing both reproductive biology and behaviour, taking as reference the results obtained in the wild population. For the behavioural assessment, we have analyzed the behaviour of the rhinos, based on the behavioural ethogram made by Owen-Smith (1973) on free-ranging White Rhinos, which was useful to make the basic codes for rhino's behaviour. Cortisol metabolite was validated for the species using high performance liquid chromatography (HPLC). A competitive ELISA was used to analyze steroid hormones in faeces (glucocorticoids, androgens, progestagens and estrogens).

. To evaluate the effect of variables *season*, *sex* and *habitat*, hormonal values were analyzed for each subject using nonparametric statistics (*Wilcoxon* test, *Mann-Whitney* test and ANOVA by ranks of *Kruskal-Wallis*, respectively), using the *Bonferroni* correction when necessary. The effect of the interaction between the variables *season* and *sex* was evaluated using the *Wilcoxon* test, between *season* and *habitat*, by *Kruskal-Wallis* test. The relation between continuous variables was assessed using *Pearson's* correlation. For the behaviour statistical analysis, we compared the hormonal levels with observed behaviours by *Student's T* test. Finally, for gonadal sex determination, three binary logistic regression models were adjusted to assess the predictive ability of androgens and estrogens concentrations on sex determination. To this end, the hormonal mean values of the subjects was used to form the *sex* variable in order to classify each sample (304 and 268 for females and males, respectively), evaluating the accuracy in the classification. For all statistical analysis the confidence interval was 95%, and significant differences when $p < 0.05$.

IV. Results & Discussion

In our study, we have revealed a correlation between an elevation of glucocorticoids and captive conditions. The cortisol metabolite validated for the species was 5 α -pregnane-3 β , 11 β , 21-triol-20-one. In order to maintain the noninvasive nature of this study, glucocorticoids concentration and its relation to stress, was related with the birth of one of the females, as a reference value from a natural stressful situation (4,502.07 ng/g).

In captivity, it seems that social stress falls on subordinates as they can not avoid the dominant individual (Creel *et al.*, 1996). In semi-captivity females, hormone concentrations were related to social status, demonstrating the existence of certain social hierarchy. Thus, higher glucocorticoid concentrations were found in the subordinate female and higher androgen concentrations in the dominant female. However, in the free-ranging population increased levels of glucocorticoids and androgens appeared to be more related to the coexistence of males and females than to social rank (Kretzschmar *et al.*, 2004, Christensen *et al.*, 2009).

Although glucocorticoid levels did not show to undergo seasonal changes, we can not exclude the possibility of a seasonal pattern. There could be many factors, such as tourist pressure, scarcity of resources, and/or environmental changes (temperature, humidity and hours of light), concealing a seasonal variation that we did not detect in our results. Besides, there was a significant sex difference on glucocorticoid concentrations, being higher in females (females= 901.77 ± 187.27 ng/g; males= 445.98 ± 105.65 ng/g). It could be related both to reproduction, and/or to the different response to stressful stimuli, but in any case, it should be taken into account when assessing glucocorticoid levels in this species in future work.

We have detected a seasonal variation in all the sex hormones analyzed in free-ranging rhinos, which occurred differently, or it did not appear, in captive populations. On one hand, androgen levels were statistically higher in summer (rainy season) (summer= 131.33 ± 11.76 ng/g; winter= 58.69 ± 4.98 ng/g), for both males and females, suggesting the existence of a seasonal reproductive pattern in free-ranging White Rhinos, which did not happen in captivity (Kretzschmar *et al.*, 2004). We have also observed a seasonal change in progestagens concentration in the free-ranging population, which increased significantly during the winter months (winter= 568.31 ± 66.56 ng/g; summer= 210.08 ± 26.74 ng/g). Since progestagens are intermediates in the synthesis of most steroid hormones, this elevation could be related to an increased activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and/or to cope with winter difficult conditions, in order to obtain enough reserves for the production of other hormones that might be required. Furthermore, in the free-ranging rhino population, estrogen concentrations was also statistically higher in winter (winter= 239.25 ± 8.02 ng/g; summer= 158.70 ± 15.00 ng/g). This increase could also be related to a seasonal reproductive trend, which appears to occur in relation to all the sex hormones.

Glucocorticoid and androgen concentrations were associated to behaviour. Only in the free-ranging population, we found an interesting relation between the increase of androgen levels and all the observed behaviours that differed from normal (territorial, sexual and agonistic displays), and surprisingly, without finding any difference on glucocorticoid levels.

The results of the analysis of progestagens and estrogens were also used to determine the reproductive cycles of the females and their possible relations with captive conditions and social rank. Based on the progestagen concentration, the dominant female in semi-captivity, presented short cycles length (32.90 ± 3.37 days) and appeared to be suppressing the subordinate female, which did not present regular cycling. Therefore, we have observed reproductive inhibition due to social rank. In captivity, we have also found a female rhino with short cycle length (27.20 ± 2.25 days) and one female with high glucocorticoids levels ($2,237.34 \pm 92.69$ ng/g) that might have affect their reproductive function. Despite the large individual variation found in the patterns of the reproductive cycles in this species, concentrations of progestagens have served as reliable indicators of gestation and luteal phase of these animals (Schwarzenberger *et al.*, 1998), while estrogen concentrations, have not proved to be really useful as they didn't seem to follow a cyclic pattern and might have been influenced by diet phytoestrogens (Tubbs *et al.*, 2012).

Estrogen and androgen concentrations were also helpful for gonadal sex determination. They were used to establish three binary regression models to assess their predictive power on rhino's sex determination, using the proportion between these hormones as a discrimination measure among the sexes. From the proposed models, we have selected model II ($A > 1.46 E - 222$), which was probed to have a more balanced sensitivity and specificity in gonadal sex determination, with a confidence interval of 74.6% in this species.

IV. Conclusions

According to our main hypothesis, we found that there is a correlation between the levels of glucocorticoids and rhinos captive conditions. Although we didn't found a seasonal pattern in relation to glucocorticoid concentrations, there has been observed a difference in the mean concentrations of males and females, being higher in females.

In the wild, androgen levels were higher during summer (rainy season), indicating the existence of a seasonal reproductive pattern in free-ranging White Rhinoceros that seems to disappear in captivity. On the other hand, we have related all observed behaviours (territorial, sexual and agonistic) with an increase in androgen concentrations.

The analysis of progestagens concentrations was a reliable indicator for the determination of the luteal phase of the ovarian cycle and also, identifying pregnant females in this species. Estrogen analysis resulted not reliable as concentrations might be influenced with diet phytoestrogens.

The binary logistic regression model adjusted by estrogen and androgen faecal concentrations, achieved 74.6% reliability in predicting the sex in White Rhinoceros.

According to other studies, our results suggest that reproductive status in both captive and free-ranging populations can be evaluated by analyzing faecal steroid hormones. And therefore, noninvasive methods for determining hormone have proved to be powerful tools in the study of gonadal and adrenal endocrinology in White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*).

V. References

- Christensen BW, Troedsson MHT, Young LJ, Oliva M, Penfold LM (2009). Effects of sociosexual environment on serum testosterone in captive male African rhinoceros. *Theriogenology* 71(7):1105-1111.
- Creel S, Creel N, Monfort SL (1996). Social stress and dominance. *Nature* 379(6562):212.
- Hermes R, Hildebrandt TB, Walzer C, Göritz F, Gray C, Niemuller C, Schwarzenberger F (2012). Estrus induction in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Theriogenology* 78(6):1217-1223.
- Kretzschmar P, Ganslober U, Dehnhard M (2004). Relationship between androgens, environmental factors and reproductive behavior in male white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Hormones and Behavior* 45(1):1-9.
- Moberg GP (1991). How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science* 74(1):304-311.
- Owen-Smith R (1973). *The behavioural ecology of the white rhinoceros* (Tesis Doctoral). Universidad de Wisconsin, Madison, EEUU.

- Rachlow JL, Berkeley EV, Berger J (1998). Correlates of male mating strategies in white rhinos (*Ceratotherium simum*). *Journal of Mammalogy* 79(4):1317-1324.
- Schwarzenberger F, Walzer C, Tomasova K, Vahala J, Meister J, Goodrowe KL, Zima J, Strauß G, Lynch M (1998). Faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Animal Reproduction Science* 53(1-4):173-190.
- Tiwary BK, Li W (2009). Parallel evolution between aromatase and androgen receptor in the animal kingdom. *Molecular Biology and Evolution* 26(1):123-129.
- Tubbs C, Hartig P, Cardon M, Varga N, Milnes M (2012). Activation of southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) estrogen receptors by phytoestrogens: Potential role in the reproductive failure of captive-born females? *Endocrinology* 153(3):1444-1452.

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

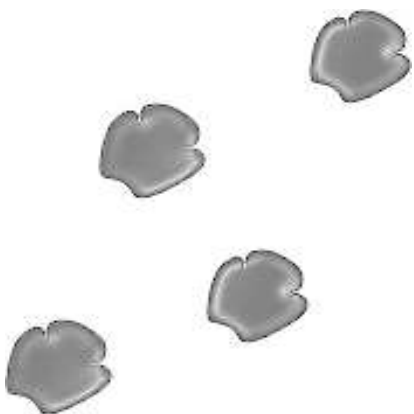
MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



A finales del siglo XIX, el rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) se encontraba al borde de la extinción contando con una población de apenas 20 individuos. Numerosos esfuerzos de protección y translocación de ejemplares a pequeñas reservas naturales y zonas privadas, consiguieron una rápida recuperación de la población (Emslie y Brooks, 1999; Rookmaaker, 2000), estimándose en Diciembre del 2010, unos 20.170 ejemplares en libertad, la gran mayoría (98,8%) localizados en tan sólo cuatro países: Sudáfrica, Namibia, Zimbabwe y Kenia, habiéndose registrado además en el año 2008, 750 ejemplares en cautividad en todo el mundo, según los datos elaborados por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, *International Union for Conservation of Nature*, 2011).

Actualmente, la mayor amenaza a la que se enfrenta esta especie en libertad es la caza furtiva. La drástica disminución de ejemplares registrada en los últimos años debido a este gran problema, se debe principalmente a la creciente demanda ilegal de su cuerno en el mercado negro oriental (Milliken *et al.*, 2009; Emslie, 2011). Esto ha ocasionado que de las cinco especies de rinoceronte que sobreviven en el mundo, la mayoría estén clasificadas en "peligro crítico" en la Lista Roja de Especies Amenazadas, según los últimos datos del 2011 del IUCN.

Además, aproximadamente el 90% de los rinocerontes blancos de África, se encuentran en Sudáfrica (Emslie y Brooks, 1999). Pero tal concentración de individuos en un solo país puede añadir otro riesgo, ya que se podría ocasionar nuevamente una dramática disminución de la población en momentos de inestabilidad política. Es por esto, que las poblaciones que se mantienen en cautividad, podrían funcionar como salvaguarda de la especie, con el inconveniente de que el rinoceronte blanco no se reproduce bien en cautividad (Gunn *et al.*, 1998; Rieches, 1998; Schwarzenberger *et al.*, 1999; Hermes *et al.*, 2004; Carlstead y Brown, 2005; Swaisgood *et al.*, 2006) y aún hoy en día se desconocen las causas de su baja tasa reproductora en cautividad.

A finales del siglo XX, se estimaron alrededor de 8.440 rinocerontes blancos en 247 discretas y pequeñas poblaciones salvajes (Emslie y Brooks, 1999), las cuales, son propensas a la endogamia. Esto podría generar una reducción en su variabilidad genética que, a su vez, podría resultar en una disminución de la fertilidad y la viabilidad de la especie (Baur y Erhardt, 1995; Guerier *et al.*, 2012), además de una reducción de la adaptabilidad de las especies a los cambios del entorno (Foose, 1993), lo que en definitiva, aumenta el riesgo de extinción de la especie (Wright *et al.*, 2008). El conocimiento del comportamiento reproductivo de

los rinocerontes puede ayudar a evaluar el número de animales activamente reproductores en estas poblaciones para intentar solucionar el problema de la endogamia (Schreiber *et al.*, 1993; Parker y Waite, 1997).

El estudio de la biología reproductiva del rinoceronte blanco ha sido propuesto como tema de investigación prioritaria en diversos grupos y organizaciones (*International Rhino Foundation, SOS Rhino, etc.*). Siendo el estudio del comportamiento reproductivo otra parte importante también para la conservación y manejo de las poblaciones salvajes (Kretzschmar *et al.*, 2004; Hutchins y Kreger, 2006).

En 1982 Lindemann descubrió que el principal requerimiento para una reproducción exitosa es la presencia de más de un macho. La competitividad macho-macho que se establece, parece necesaria para estimular el comportamiento sexual masculino. Por otro lado, también parece necesario que las hembras puedan ejercer cierta selección entre los posibles machos reproductores, para poder iniciar así su ciclo estral (Owen-Smith, 1988), lo que ya ha sido confirmado en diversos estudios realizados en rinocerontes salvajes, comprobándose que, efectivamente, las hembras se reproducen más a menudo con machos alfa, aquellos que defienden satisfactoriamente su territorio, que con machos beta no territoriales, los que adoptan un rango de subordinado hasta la adquisición de su propio territorio (Owen-Smith, 1971, 1973 y 1975; Rachlow *et al.*, 1998). A pesar de que los rinocerontes pueden encontrarse en diversos tipos de hábitat, se ha visto una selección positiva de unos tipos frente a otros (Tatman *et al.*, 2000) pues las hembras suelen seleccionar al macho según el territorio que éste posea, preferiblemente zonas con abundante alimento y numerosos recursos. Es por esto que también los machos parecen elegir su territorio en base a la cantidad de alimento, para que un mayor número de hembras prefieran su territorio y poder aumentar así su éxito reproductivo (White *et al.*, 2007b).

La competencia entre machos y la elección de pareja ejercida por las hembras aumenta el grado de endogamia debido a que, en una población, solo unos pocos de los posibles individuos reproductores (tamaño efectivo de la población), se reproducen realmente. Para conservar la diversidad genética, las poblaciones pequeñas o las que son estrictamente dirigidas por la elección de la hembra, necesitan ser manejadas adecuadamente. El éxito y la efectividad de los programas de manejo pueden ser mejorados si se consiguiera una correcta identificación de los verdaderos machos reproductores para cambiarlos entre las distintas poblaciones (Schreiber *et al.*, 1993; Parker y Waite, 1997).

La tendencia generalizada es pensar que el estrés social recae más fuertemente sobre los individuos subordinados que sobre los dominantes, presentando por ello mayores concentraciones de glucocorticoides y generando así, un estrés crónico que suprime la capacidad reproductora de los subordinados (Creel *et al.*, 1992 y 1996; Creel, 2001; Monfort, 2003; Metrione *et al.*, 2007). Sin embargo, no siempre es así, pues en algunas especies salvajes se ha visto que el estrés crónico forma parte de los costes de la dominancia social más que de la subordinación, encontrando concentraciones superiores de cortisol y/o corticosterona en los individuos dominantes del grupo (Creel *et al.*, 1996; Barja *et al.*, 2008a). Esto parece ocurrir en aquellas especies que tienden a ser más agresivas para mantener su estatus social o territorio (Creel *et al.*, 1996 y 2005; Barja *et al.*, 2008a). Algunos autores han investigado la posible interacción entre los diferentes ejes endocrinos en la regulación del comportamiento reproductivo, existiendo una fuerte interacción entre los andrógenos y los glucocorticoides que determina la presencia o ausencia de secreción de la glándula adrenal y el goteo de orina, señales asociadas con la táctica reproductiva competitiva (Schwarzenberger *et al.*, 2000b; Brown *et al.*, 2001).

En una gran variedad de estudios, tanto en humanos como en distintas especies animales, la testosterona ha sido asociada con la agresividad, el comportamiento antisocial (Booth *et al.*, 2006), la dominancia (Beehner *et al.*, 2006), y el comportamiento sexual (Everitt y Stacey, 1987; Alexander *et al.*, 1994). En rinocerontes, mediante análisis hormonales de andrógenos en los machos, se ha determinado que los niveles de testosterona en heces están más relacionados con el rango social que con la edad, estando directamente relacionados con la defensa y marcaje del territorio e indirectamente relacionados con un mayor éxito reproductivo. Además, dichos niveles aumentan cuando se encuentran en presencia de otros machos y hembras, de forma que un macho que convive junto a dos o más hembras, tendrá mayores niveles de testosterona que aquel que no convive con hembras (Kretzschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009). La relación entre los niveles de andrógenos y la territorialidad establece una conexión entre la fisiología y el comportamiento reproductivo en los machos de rinoceronte blanco (Rachlow *et al.*, 1998; Kretzschmar *et al.*, 2004).

En muchas especies, la variación hormonal está regulada por cambios estacionales (Aguirre *et al.*, 2007; Abáigar *et al.*, 2010). El aumento de andrógenos en los rinocerontes machos en libertad y los cambios conductuales coinciden con el inicio de la estación lluviosa (Kretzschmar *et al.*, 2004), que en Sudáfrica corresponde a los meses entre Septiembre y Febrero, aproximadamente, mientras que los niveles de testosterona y glucocorticoides caen durante la estación seca o invierno, debido posiblemente a la pérdida de masa corporal, como se ha visto en algunos ungulados (Taillon y Côté, 2008), sugiriendo un patrón reproductivo estacional aunque no demasiado estricto en las poblaciones en libertad (Kretzschmar *et al.*, 2004). En cautividad, puesto que no existen esas fluctuaciones estacionales en cuanto a la disposición de la comida, depende principalmente de la estructura social artificial en la que se encuentren, determinado por el número de hembras y/o machos que convivan juntos y su estatus social dentro del grupo (Hermes *et al.*, 2005).

Mediante análisis hormonales en heces se han intentado dilucidar las causas del fracaso reproductor y determinar si los prolongados períodos no reproductivos afectan a la salud genital (Carlstead y Brown, 2005). El desarrollo de patologías reproductivas y la inactividad ovárica en el rinoceronte blanco, son consecuencia de la edad, además de estar relacionados con prolongados periodos no reproductivos. Este proceso de envejecimiento en la asimetría de los órganos genitales se pueden prevenir con la consecución de, al menos, una gestación (Hermes *et al.*, 2006).

Entre otros índices potencialmente útiles, que aún no se aplican en determinadas especies, se encuentra la ciclicidad ovárica femenina (Mason y Veasey, 2010), que la mayoría de estudios analiza en base a la determinación de la concentración de progesterona y/o sus metabolitos en suero, plasma o heces, pues sigue un patrón cíclico de concentración creciente desde la fase folicular a la fase lútea del ciclo estral (Hindle y Hodges 1990; Hindle *et al.*, 1992; Heistermann *et al.*, 1998; Schwarzenberger *et al.*, 1995, 1996b, 1998 y 2000b; Masunda *et al.*, 1999; Ostrowski *et al.*, 2005; Hirata *et al.*, 2009), pudiendo además, distinguir entre hembras gestantes y no gestantes, así como determinar la duración de la gestación en las distintas especies (Schwarzenberger *et al.*, 1991 y 1995). Otros autores, analizan la concentración de estrógenos para determinar el inicio de la fase folicular (Hesterman *et al.*, 2008). El análisis conjunto de progestágenos y estrógenos, resulta una herramienta fiable en la gran mayoría de especies, tanto para la evaluación de la funcionalidad del cuerpo lúteo, como para la identificación de la duración del ciclo estral o el análisis de periodos de gestación

(Schwarzenberger *et al.*, 1991, 1995 y 1996b). Otros autores se basan en el análisis de andrógenos, precursores de los estrógenos, como indicadores de la fase folicular, pues en algunas especies, la determinación de estrógenos no ha resultado demasiado fiable (Schwarzenberger *et al.*, 2004; Hirata *et al.*, 2009). Por otro lado, se han encontrado evidencias que apoyan que la proporción entre andrógenos y estrógenos determina el sexo gonadal en todas las especies del reino animal (Tiwary y Li, 2009).

Sin embargo, existen otros factores que también intervienen en la reproducción de estos animales, pues con excesiva frecuencia fallan los diversos intentos de reproducción en cautividad (Gunn *et al.*, 1998; Rieches, 1998; Schwarzenberger *et al.*, 1999). El estrés debido a las relaciones sociales de los grupos artificiales formados en cautividad, las deficiencias nutricionales o la falta de variación estacional en el suministro de alimentos, pueden influenciar en el balance hormonal y pueden llegar a causar infertilidad tanto en machos como en hembras (Gunn *et al.*, 1998).

Uno de los principales problemas de los animales en cautividad estriba en que disponen de demasiado tiempo libre ya que no se enfrentan a los retos que les propone la naturaleza debido a que se les suministra todo lo que necesitan. Por ello, pueden desarrollar conductas aberrantes que no se darían nunca en libertad, provocándoles estrés, agresión o miedo, disminuyendo su estado de salud tanto físico como psicológico (Menargues *et al.*, 2006; Schwarzenberger, 2007b). Además, la complejidad que presentan y la gran variedad de causas por las que se modifican sus conductas naturales, alterando sus ciclos biológicos, dificulta su óptima reproducción en cautividad (Schwarzenberger *et al.*, 1999; Hermes *et al.*, 2004; Carlstead y Brown, 2005).

Para la evaluación del comportamiento, tanto en los rinocerontes alojados en reservas naturales como en los de parques zoológicos, se tiene en cuenta la edad, el sexo, el tamaño y todo tipo de enriquecimiento que se aplica por parte de los cuidadores del parque (Freeman *et al.*, 2010). También resulta importante la comunicación mediante sonidos o gestos, que indica el estado tanto emocional como reproductivo del animal (Carlstead y Brown, 2005; Soltis, 2010). Para analizar los comportamientos específicos de los rinocerontes blancos salvajes, Owen-Smith (1973) creó un etograma de comportamiento que ya ha sido utilizado por diversos autores (Metrione, 2005; Metrione *et al.*, 2007; Swaisgood *et al.*, 2006) y que ha sido adaptado para emplearlo en la valoración del comportamiento de los rinocerontes blancos salvajes de este estudio de Tesis Doctoral.

La mayoría de los estudios utilizan los índices de bienestar, en base a los resultados de corticosteroides y el comportamiento estereotipado (Carlstead y Brown, 2005). La medida de los glucocorticoides ha sido probada como un poderoso evaluador de la relación entre los estresantes ambientales y la condición del animal (Brousset *et al.*, 2005; Chinnadurai *et al.*, 2009; Sheriff *et al.*, 2011; Barrette *et al.*, 2012; Vick *et al.*, 2012). En los rinocerontes, se ha determinado que el cortisol tiene mayor rango de respuesta que la corticosterona (Turner *et al.*, 2002) por ello, ya ha sido empleada la medida de cortisol como indicador de estrés tanto en las distintas especies de rinoceronte (Schwarzenberger *et al.*, 2000a; Menargues *et al.*, 2006) como en muchas otras especies animales (Barja *et al.*, 2008a y 2011; Ashley *et al.*, 2011; Chelini, 2011).

Debido a la importancia que tiene la adaptación de las especies a las nuevas condiciones ambientales de un nuevo entorno (Kretzschmar *et al.*, 2004), el Bioparc de Valencia, donde hemos realizado parte de nuestro estudio, a diferencia de otros parques zoológicos convencionales, ha recreado lo más fielmente posible las condiciones del hábitat natural de los animales, aportando diferentes tipos de enriquecimiento en espacios más amplios con un entorno muy similar a la sabana africana: seleccionando la vegetación, el agua y la tierra incluso introduciendo otras especies animales (cebras, antílopes,...) con las que suelen convivir en su hábitat natural.

Las hormonas tienen un papel crucial en la regulación del comportamiento y coordinan los procesos fisiológicos de desarrollo en todos los organismos vivos, interviniendo en la mediación de los efectos genéticos y ambientales en los fenotipos morfológicos y de comportamiento (Wada, 2008; Urbanski, 2011). Regulan la adquisición, asimilación y utilización de nutrientes para el crecimiento y el metabolismo, el control de la gametogénesis y el comportamiento sexual, además de ser mediadoras de las respuestas a cambios del ambiente, permitiendo también la comunicación entre organismos (Denver *et al.*, 2009).

Debido a la baja tasa de reproducción natural en cautividad y a los diferentes condicionantes que pueden alterar el estado tanto físico como psicológico de tan valiosos animales (Schwarzenberger, 2007b), se hace necesaria la elaboración de proyectos que determinen, evalúen y estudien los distintos factores implicados en dichos cambios, para mejorar su adaptación y colaborar en su manejo y conservación.

Hasta la fecha, no se han realizado estudios longitudinales que incluyan simultáneamente poblaciones de rinoceronte blanco en tres hábitats diferentes, para poder monitorizar los perfiles hormonales en rinocerontes salvajes que determinen la influencia del hábitat y del estatus social, que podrían estar alterando dichos perfiles en los grupos de rinocerontes mantenidos en cautividad. Un estudio comparativo del comportamiento reproductor de los rinocerontes salvajes es necesario para mejorar la reproducción de los que se encuentran en cautividad. Esto, podría ayudar además a mejorar la reproducción de la críticamente amenazada subespecie nortea del rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum cottoni*), de la cual se estimaron tan sólo seis individuos en 2006 en una única población de África, creyendo actualmente que podría estar extinta debido a la ausencia de señales que confirmen su presencia. Los últimos cuatro ejemplares considerados potencialmente reproductores, que se encontraban en cautividad, fueron trasladados a una Reserva Natural en Kenia con la esperanza de estimular la reproducción en condiciones salvajes (Emslie, 2011).

El objetivo de este estudio es evaluar la influencia de los factores socio-ambientales relacionados con las distintas condiciones de cautividad que presentan tres poblaciones diferentes de rinoceronte blanco, mediante análisis hormonal en heces y análisis del comportamiento. Para ello, se analizarán las heces de los rinocerontes en cautividad (Zoo de Madrid) y semi-cautividad (Bioparc de Valencia) durante un año y durante la época de invierno y verano del mismo año en los rinocerontes blancos salvajes de una reserva sudafricana (Reserva de Mabula), lo más parecida posible a una población en libertad según la definición de Leader-Williams y colaboradores (1997), para finalmente determinar la influencia de los factores socio-ambientales y relacionarlo con las concentraciones de glucocorticoides y hormonas sexuales (andrógenos, progestágenos y estrógenos).

Pensamos que nuestro estudio en el rinoceronte blanco aportará beneficios importantes en su conservación mediante la elucidación de nueva información acerca de su endocrinología gonadal y adrenal, a través de la comparación entre los distintos hábitats del estudio. La información adquirida será útil para mejorar nuestro conocimiento acerca de su reproducción y poder caracterizar su estado social y reproductivo, ayudando así a dilucidar las causas del fracaso reproductor de los animales mantenidos en cautividad, información esencial para un exitoso manejo de las poblaciones de rinoceronte blanco.

OBJETIVOS

La hipótesis de nuestro estudio, es que los factores socio-ambientales, determinados según el tipo de hábitat, alteran los ciclos biológicos del rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*). Por ello, el principal objetivo de este proyecto de Tesis Doctoral es estudiar y comparar entre los distintos hábitats, los perfiles hormonales en tres poblaciones de rinoceronte blanco:

- **Cautividad:** rinocerontes del Parque Zoológico de Madrid.
- **Semi-cautividad:** rinocerontes del Bioparc de Valencia.
- **Libertad:** rinocerontes de una reserva natural de Sudáfrica (Mabula).

Y determinar la relación entre la endocrinología gonadal y adrenal con los factores ambientales y el comportamiento reproductivo, para aportar un mayor conocimiento de lo que ocurre en dicha especie en su hábitat natural y poder así mejorar su éxito reproductivo y bienestar en cautividad, además de mejorar el manejo de las poblaciones. Para ello se proponen los siguientes objetivos:

1. Relacionar los niveles de glucocorticoides en heces con los factores socio-ambientales según el tipo de hábitat en que se encuentra cada grupo de rinocerontes (grupos sociales naturales/artificiales, época del año, disposición del alimento, comportamiento, etc.). Para lograr este objetivo se realizará:

- Determinación y validación de los niveles de glucocorticoides mediante técnicas no invasivas.
- Análisis de comportamiento social mediante observaciones *in situ* de cada rinoceronte en su hábitat.
- Estudio detallado de cada tipo de hábitat.
- Valoración de la influencia de la época del año.

2. Estudiar el comportamiento reproductivo y determinar las posibles causas del fracaso reproductor. Para alcanzar este objetivo, se realizará:

- Medida de la concentración de hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos) mediante técnicas no invasivas.
- Análisis de comportamiento social mediante observaciones *in situ* de cada rinoceronte en su hábitat y estudio detallado de cada tipo de hábitat.
- Determinación de la influencia estacional sobre las hormonas sexuales, comparando los resultados entre los meses de invierno y verano.

3. Realización de un modelo de regresión logística binaria para predecir el sexo de los rinocerontes mediante la concentración de andrógenos y estrógenos en heces.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

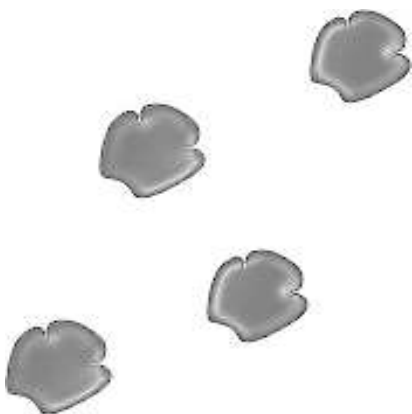
MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. EL RINOCERONTE BLANCO

Sudáfrica es el país que alberga la mayor parte de la población de esta especie, estimándose actualmente en unos 18.800 individuos en libertad (93,2%). El mayor problema al que se enfrenta esta especie en libertad es la caza furtiva, estando catalogada como especie "casi amenazada" en la Lista Roja de Especies Amenazadas desde el año 2003 según los últimos datos del 2008 del IUCN (*International Union for Conservation of Nature*). Debido a la creciente demanda ilegal de su cuerno en el mercado oriental (apreciado principalmente para ornamentación y utilizado como falso afrodisíaco o como supuesto remedio de diferentes enfermedades en la medicina tradicional oriental), en unos cinco años podría disminuir drásticamente el tamaño poblacional alcanzando el nivel de especie "amenazada" o "en peligro de extinción" si no se toman las medidas adecuadas al respecto (IUCN African Rhino Specialist Group, 2010; Emslie, 2011).



Figura 1: Registro anual de rinocerontes asesinados debido a la caza furtiva en la última década (South African Department of Environmental Affairs, 2012; Annamiticus, 2012).

La drástica disminución que sufrió esta especie al final del siglo XIX, posiblemente generó una reducción de la variabilidad genética, aunque aún no ha sido investigado.

La experiencia indica que los numerosos esfuerzos realizados en contra de la caza furtiva en determinadas poblaciones, han podido mantener un nivel sostenible de pérdidas, sin embargo, no todas las poblaciones reciben suficiente protección y los recortes presupuestarios en materia de conservación del hábitat y de las especies, son una causa importante de preocupación (Amin *et al.*, 2006).

Los blancos más fáciles para los cazadores furtivos son aquellos rinocerontes criados bajo cuidado humano que posteriormente han sido reintroducidos. Éstos, carecen de miedo al humano y son fáciles de encontrar pues tenderán a situarse cerca de zonas habitadas (Matipano, 2004). Pero a pesar de ser la caza furtiva el mayor riesgo para las poblaciones de rinoceronte, no es el único. El deterioro constante del hábitat y un manejo inadecuado de las poblaciones, entre otros, son aspectos importantes a destacar (Ogutu *et al.*, 2012). Se debe realizar un estudio detallado de la capacidad de carga de la zona y la optimización de recursos para evitar la superpoblación, la falta de alimento, las peleas y las enfermedades (Bothma *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2007; Linklater y Swaisgood, 2008). También son vulnerables las pequeñas poblaciones de rinoceronte blanco que se encuentran disgregadas en los diversos países del sur de África, que debido a la alta endogamia son sensibles a la pérdida de variabilidad genética y por tanto, a un declive reproductor (Guerier *et al.*, 2012).

Para salvar esta especie del comercio ilegal, éste, debe ser tratado como delito grave y asignar los recursos suficientes, personal altamente capacitado y las tecnologías apropiadas que permitan abordarlo con eficacia. El éxito en la lucha contra este mercado ilegal requerirá el compromiso de los gobiernos y las organizaciones no gubernamentales así como el apoyo de la sociedad (Bennett, 2011).

1.1. Clasificación actual del rinoceronte

La familia de la que forman parte todos los rinocerontes actuales, *Rhinocerotidae*, parece que tuvo su origen durante el Eoceno, hace aproximadamente 50 millones de años (Hutchins y Kreger, 2006; Kahlke y Lacomat, 2008). En la actualidad sobreviven en el mundo tan solo cinco especies de rinoceronte (Figura 1), estando la mayoría catalogadas en "peligro crítico" según la clasificación confeccionada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2008):

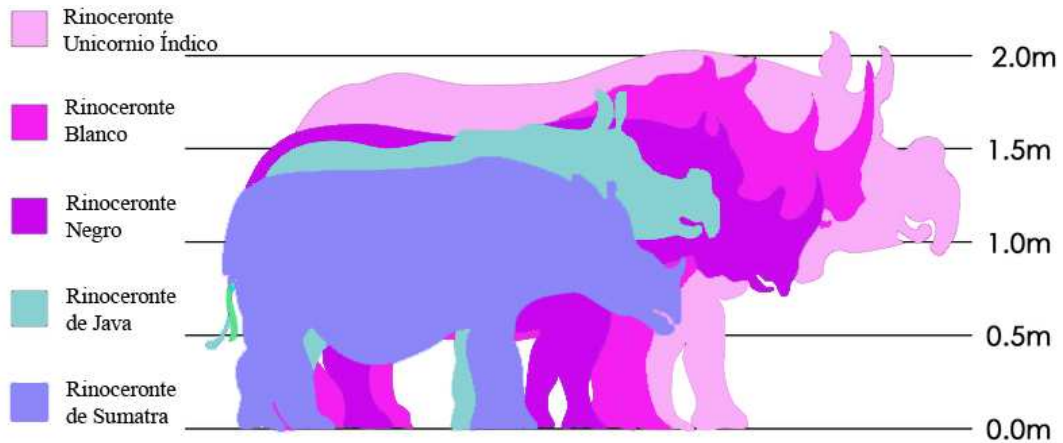


Figura 2: Las cinco especies actuales de rinoceronte según sus diferentes tamaños (adaptado de *WikipedianProlific*, 2006).

- **Rinoceronte de Java** (*Rhinoceros sondaicus*): especie nativa de Indonesia y Vietnam que cuenta con tres subespecies (*R. sondaicus sondaicus*, *R. sondaicus annamiticus* y *R. sondaicus inermis* (extinta; Nowak, 1999). Los últimos registros estiman una población actual entre 40-60 individuos, estando catalogada en “peligro crítico”.

- **Rinoceronte de Sumatra** (*Dicerorhinus sumatrensis*): especie nativa de Indonesia (Malasia) que recoge tres subespecies (*D. sumatrensis lasiotis* (probablemente extinto), *D. sumatrensis sumatrensis* y *D. sumatrensis harrissoni*). Se estima una población inferior a 275 individuos. Catalogado en “peligro crítico”.

- **Rinoceronte Negro** (*Diceros bicornis*): especie nativa de Angola, Kenia, Mozambique, Namibia, Sudáfrica, Tanzania y República Unida de Zimbabwe que cuenta con cuatro subespecies (*D. bicornis bicornis*, *D. bicornis longipes* (extinta; Emslie, 2011), *D. bicornis michaeli*, *D. bicornis minor*). Registrados actualmente 4.880 individuos aproximadamente y considerado en “peligro crítico”.

- **Rinoceronte Indio (Unicornio Índico)** (*Rhinoceros unicornis*): nativo de India y Nepal cuenta con unos 2.575 individuos aproximadamente. Catalogado como “vulnerable”.

- **Rinoceronte Blanco** (*Ceratotherium simum*): especie seleccionada para nuestro estudio. Siendo la más abundante, contando en la actualidad con unos 20.170 individuos, distribuidos por gran parte de África (Figura 3), su población no está exenta de riesgo estando catalogada como "casi amenazada" (IUCN; WWF).

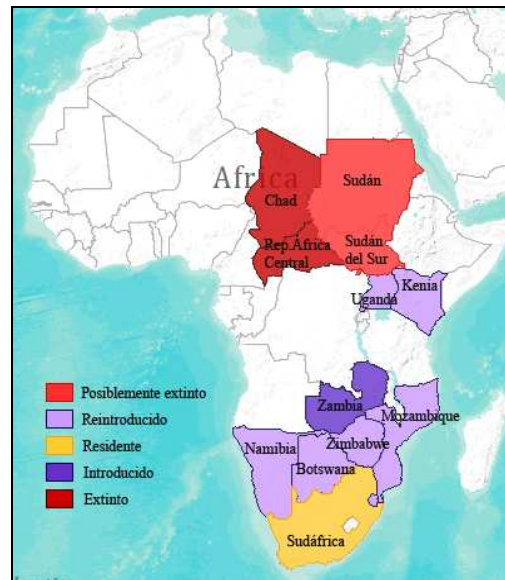


Figura 3: Mapa de distribución geográfica del Rinoceronte Blanco (IUCN, 2008).

La clasificación actual del rinoceronte blanco reconoce dos subespecies:

- Rinoceronte blanco sureño (*C. simum simum*): nativa de Botswana, Kenia, Namibia, Sudáfrica, Swazilandia, Zambia y Zimbabwe. Fue descrita primeramente por Burchell en 1827 y ha sido la subespecie seleccionada para nuestro estudio.
- Rinoceronte blanco norteño (*C. simum cottoni*): se encuentra principalmente en el norte de África, estando catalogada en "peligro crítico" contando con una población inferior a 10 individuos.

Debido a diferencias tanto morfológicas como genéticas entre ambas subespecies, algunos autores difieren sobre dicha clasificación. Tal es el caso de Groves y colaboradores, que en el año 2010 publicaron un artículo en el que consideraban que dichas subespecies, deberían ser clasificadas como especies diferentes, pero su recomendación generó gran controversia por lo que no ha llegado a ser reconocida universalmente (IUCN).

1.2. Hábitat y reproducción

El rinoceronte blanco predomina en zonas de sabana seca formando parte del grupo de los herbívoros pastadores poco selectivos con fermentación cecal (caudal), alimentándose principalmente de hierbas pero añadiendo a su dieta hojas y raíces según necesidad (Perrin y Brereton-Stiles, 1999; Bothma *et al.*, 2004; Apps y Du Toit, 2006; Hutchins y Kreger, 2006; Pradhan *et al.*, 2008).

De las cinco especies actuales de rinoceronte, el rinoceronte blanco es el más social y gregario (Hutchins y Kreger, 2006), de forma natural, aparece en pequeños grupos familiares, que generalmente constan de un solo macho con varias hembras y sus crías, existiendo escaso o nulo solapamiento entre los distintos grupos (Tatman *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2009). Pueden darse agrupaciones mayores especialmente durante el invierno o estación seca, que en Sudáfrica corresponde aproximadamente a los meses comprendidos entre Abril-Septiembre, cuando escasea la comida. Durante los meses de verano o estación lluviosa (Octubre-Marzo), se encuentran más dispersos: madres caminando junto a sus crías; pequeños grupos de individuos sub-adultos de aproximadamente la misma edad y generalmente emparentados; y machos adultos solitarios (Shrader y Owen-Smith, 2002; Apps y Du Toit, 2006; Hutchins y Kreger, 2006; Bothma y Du Toit, 2010).

La relación social más fuerte que ocurre en los rinocerontes, es la que se establece entre una hembra y su cría más joven (Hutchins y Kreger, 2006) mientras que los machos adultos reproductores son animales solitarios que defienden satisfactoriamente su territorio de cualquier otro macho adulto que intente pasar, pudiendo llegar a permitir la presencia de otros machos jóvenes (Owen-Smith, 1971 y 2004; Kretzschmar *et al.*, 2004; Støen *et al.*, 2009). Las hembras pueden moverse libremente hasta en siete territorios diferentes, pero suelen quedarse la mayor parte del tiempo en uno o dos territorios adyacentes (Owen-Smith, 1973 y 1975; Estes, 1992), ocupando zonas de aproximadamente 20 km², siendo el área principal de 5 km², que eligen, generalmente, según la abundancia de alimento. Aunque se encuentran en diferentes tipos de hábitat, se ha visto una selección positiva de unos tipos frente a otros, preferentemente pastizales (Tatman *et al.*, 2000). Mientras los machos marcan territorios de tamaño parecido al área principal de las hembras, éstos, parecen elegir su territorio también en base a la cantidad del alimento, para tener un mayor número de hembras en su territorio y aumentar así su éxito reproductivo (White *et al.*, 2007b).

Sin embargo, en alguna especie de rinoceronte, como el rinoceronte negro, se han encontrado evidencias de una mayor dispersión de los machos frente a las hembras (Van Coeverden *et al.*, 2011).

Cabe destacar, que en los rinocerontes la vista no está muy desarrollada (Owen-Smith, 1971) (son incapaces de diferenciar a una persona inmóvil a más de 30 metros), siendo el olfato y el oído sus sentidos más desarrollados: su tejido olfativo supera el tamaño de su cerebro y sus orejas tubulares pueden rotar de forma independiente en dirección al sonido (IRF, *International Rhino Foundation*). Por ello, para marcar territorio en el caso de los machos, y para avisar del momento del ciclo en que se encuentran las hembras, esparcen sus olores tanto de orina como de heces de diversas maneras: disgregando las heces con las patas traseras o realizando marcas de orina con excavación en tierra, entre otras (Kretzschmar *et al.*, 2004). Además, se ha visto que los rinocerontes tienden a defecar cerca del excremento de otro rinoceronte, siendo también más habitual, encontrar sus rastros cerca de los bordes o caminos de las reservas naturales, donde advierten de su presencia (Laurie, 1982; Hutchins y Kreger, 2006).

Todas las especies de rinoceronte son polígamas, de estrategia sexual poligínica (Garnier *et al.*, 2001) y poliándrica, donde ambos sexos buscan múltiples compañeros sexuales (Owen-Smith, 2004; Hutchins y Kreger, 2006). La edad fértil en las hembras de rinoceronte comienza entre los 6-7 años de edad, y se estima que termina a los 30-35 años de edad, siendo su esperanza de vida en libertad de aproximadamente 40 años (Owen-Smith, 1988). Después de 16 meses de gestación, paren una cría de aproximadamente 40 kg de peso que pasan su primer año de vida mamando de la madre (Player y Feely, 1960; Owen-Smith, 1973; Estes, 1992; White *et al.*, 2007a). A diferencia de las hembras, los machos no cuidan de la cría. Persiguen a la hembra durante dos semanas antes de que se produzca el apareamiento y la abandonan dos días después (Owen-Smith, 1973 y 1975). La elección de una pareja por parte de la hembra ocurre en aquellas especies en las que las hembras invierten más tiempo y energía en cuidar a su descendencia que los machos (Trivers, 1972). La alta inversión de recursos en una cría, reduce el potencial de la hembra para tener otra (Partridge y Halliday, 1984), lo cual genera un conflicto para la hembra, que de acuerdo con la teoría de la evolución de Darwin, los individuos pretenden aumentar el número de descendientes directos (adecuación Darwiniana) o de los genes que pasan a su descendencia (adecuación inclusiva, Hamilton, 1964).

Es posible, que las hembras hayan desarrollado una cierta estrategia para solucionar este conflicto (Kretzschmar, 2002). Una de estas estrategias, es la selección de la mejor pareja de acuerdo con beneficios directos materiales o beneficios indirectos genéticos (Andersson, 1994; Møller y Jennions, 2001), a la hora de elegir, parece que las hembras prefieren al macho de mayor y mejor condición corporal, incluyendo un cuerno de mayor longitud (Kretzschmar *et al.*, 2004). La hembra puede adquirir beneficios directos si el macho posee un territorio de reproducción de alta calidad, si muestra un comportamiento efectivo hacia los depredadores, si la protege del acoso de otros machos, o simplemente por la ausencia de enfermedades de transmisión directa (Byers *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1999; Møller y Jennions, 2001; Kretzschmar, 2002). Los beneficios indirectos ocurren cuando el macho seleccionado tiene genes que contribuyen a la supervivencia y habilidad reproductora de la descendencia (Fisher, 1999; Norris y Lopez, 2011). La alta inversión de recursos que realiza la hembra de rinoceronte blanco en la cría y la baja inversión que efectúa el macho, sugiere que en esta especie existe dicha selección de la pareja por parte de las hembras.

1.3. Comportamiento

Para la evaluación del comportamiento, tanto en los rinocerontes alojados en reservas como en los de parques zoológicos, se tiene en cuenta la edad, el sexo, el tamaño, el origen (cautividad, salvaje) y las frecuencias y duraciones de los diversos tipos de conductas que presentan (Carlstead *et al.*, 1999b; Freeman *et al.*, 2010). También resulta importante la comunicación por contacto y mediante sonidos, que indican tanto el estado emocional como reproductivo del animal (Carlstead y Brown, 2005; Cinková y Kretzschmar, 2010; Soltis, 2010).

El manejo juega un papel primordial, en cuya evaluación se cubren: respuestas conductuales y cognitivas (apatía, dominancia, comportamiento olfativo, agresividad, comportamiento estereotipado); respuestas fisiológicas (respuestas simpáticas, secreción de corticosteroides); posibles efectos negativos del estrés prolongado en la reproducción (reducción de la gametogénesis, baja libido, atención materna deficiente, etc.) y la salud (peor cicatrización, altas tasas de enfermedad, menor esperanza de vida) (Carlstead *et al.*, 1999b; Carlstead y Brown, 2005; Mason y Veasey, 2010).

II. Revisión bibliográfica

Los comportamientos específicos analizados en los rinocerontes salvajes son identificados mediante un etograma de comportamiento de rinoceronte blanco salvaje, definido por Owen-Smith en 1973 y que ya ha sido utilizado por diversos autores (Metrione, 2005; Metrione *et al.*, 2007; Swaisgood *et al.*, 2006) (Tabla 1).

COMPORTAMIENTO O VOCALIZACIÓN	INTENCIÓN, PROPÓSITO	DESCRIPCIÓN
Bufido (<i>Snort</i>)	Aviso leve "mantente alejado"	Inhalación o exhalación nasal
Gruñido (<i>Snarl</i>)	Aviso más fuerte para mantener las distancias	Rugido áspero, breve o mantenido, con la boca abierta, la cabeza elevada y las orejas hacia atrás
Resoplido, jadeo (<i>Pant</i>)	Buscar contacto o mantener una comunicación	Exhalación o inhalación profunda de pecho
"Hic" (vocalización)	Intento de cortejo del macho	Repetitivas exhalaciones sibilantes con un "roncus" al inicio de cada inhalación
Chillido agudo (<i>Squeal</i>)	La acción de un macho hacia una hembra, dentro del contexto de territorialidad	Tono agudo que va perdiendo fuerza, pudiendo convertirse en un gemido silbante (singing)
Grito (<i>Shriek</i>)	Evitación de un ataque	Intenso, estridente. Orejas hacia atrás, cabeza inclinada hacia delante
Gimoteo, quejido (<i>Whine</i>)	Crías buscando la ubre o adolescentes moviéndose hacia sus compañeros	Tono fino como un maullido, cambiando el tono
Chirrido (<i>Squeak</i>)	Señal de distrés de la cría	Brusco y agudo
Jadeo (<i>Gas-puff</i>)	Respuesta a un sobresalto	Inhalación o exhalación repentina
Orejas fijas hacia atrás	Comportamiento para aumentar las distancias	Orejas gachas hacia atrás, acompañado de empuje de cabeza y bufido o gruñido.
Pasos de avance	Aviso más poderoso que el uso de un bufido o gruñido, para alejar al contrario	Pasos rápidos hacia el receptor al tiempo que vocaliza un bufido, gruñido o chillido
Golpe de cuerno (<i>horn prod</i>)	Movimiento ritualizado de ataque	Cabeza agachada seguido de un movimiento hacia arriba dando golpes.
Choque de cuernos	Gesto para evitar enzarzarse con el contrario	Cuerno bajo paralelo al suelo, golpea de lado hacia el atacante
Carga	Comportamiento de intimidación	Avance rápido
Balanceo vertical de cabeza	Invitación a jugar y señal de excitación	Movimientos rápidos de cabeza arriba y abajo
Muestra del lateral	Acto de apaciguamiento	Giro de cabeza evitando al otro
Cuerno contra cuerno fijo, mantenido	Comportamiento de intimidación	Choque de cuernos entre dos machos, manteniendo la fuerza, cabezas elevadas y orejas hacia delante

COMPORTAMIENTO O VOCALIZACIÓN	INTENCIÓN, PROPÓSITO	DESCRIPCIÓN
Frota cuerno	Aserción de la presencia o estatus	Cuerpo ladeado, movimientos del cuerno contra el suelo
Escarba	Relacionado con la deposición de marcas olfativas	Arrastrando las patas delanteras o traseras, nariz presionando el suelo
Encuentro nasal	Para identificar individuos	Movimientos lentos y relajados que permiten el contacto de las narices
Ataque	Echar al adversario	Golpes con el cuerno, directos sobre el cuerpo del adversario, empujándolo
Lucha	Oponentes que intentan expulsarse el uno al otro	Gestos de ataque de los dos oponentes, pelea
Aceptación de contacto físico	Para fortalecer vínculos	Expresión de un vínculo cercano mediante contacto físico no agresivo
Olfateo de orina/heces	Identificación	Olisqueo de orina o heces. Puede estar seguido de un movimiento de retracción del labio superior (<i>flehmen</i>)
Olfateo de la vagina	Identificación del estro, cortejo	El macho huele la vagina de la hembra. Puede estar seguido de un movimiento retractor del labio superior (<i>flehmen</i>)
Descanso de la barbilla, mentón	Cortejo	El macho apoya su cabeza en el lomo de la hembra
Monta	Reproducción	El macho se coloca a horcajadas sobre el lomo de la hembra, manteniéndose sobre sus patas traseras

Tabla 1: Etograma de comportamiento específico del rinoceronte blanco salvaje (adaptado de Owen-Smith, 1973; Metrione y Harder, 2011).

El bienestar de los animales implica estados como "sufrimiento" o "satisfacción" que podemos deducir, pero no se puede medir directamente. Los índices de bienestar se han desarrollado a partir de dos fuentes principales: estudios en los seres humanos que sufren y en los animales de investigación, deliberadamente sometidos a los retos que se sabe afectan el estado emocional (Mason y Veasey, 2010).

Uno de los principales problemas de los animales en cautividad estriba en que disponen de demasiado tiempo libre, ya que no se enfrentan a los retos que les propone la naturaleza debido a que se les suministra todo lo que necesitan. Por ello, pueden desarrollar conductas aberrantes que no se darían nunca en libertad, provocándoles estrés, agresión o miedo, disminuyendo su estado de salud tanto físico como psicológico (Cinková, 2006; Menargues *et al.*, 2006; Schwarzenberger, 2007b). Además, la complejidad que presentan y la gran variedad de causas por las que se modifican sus conductas naturales, alterando el ciclo biológico adecuado

para su reproducción, dificulta su óptima reproducción en cautiverio siendo muy bajas sus tasas reproductivas (Schwarzenberger *et al.*, 1999; Hermes, *et al.*, 2004; Carlstead y Brown, 2005) y que aún no han sido clarificadas completamente. Por ello, se siguen investigando y desarrollando diferentes técnicas de enriquecimiento ambiental para progresar en el conocimiento de tan valiosa especie, y en definitiva, mejorar su bienestar y calidad de vida en cautividad.

En los últimos años, las técnicas no invasivas para la determinación hormonal están cobrando gran importancia, por su fácil obtención en poblaciones salvajes y los valiosos datos que aportan para un óptimo manejo (Monfort, 2003). Mediante análisis hormonales en heces se han intentado dilucidar tanto las causas del fracaso reproductor (Carlstead y Brown, 2005; Schwarzenberger, 2007a; Roth, 2006), como la evaluación de la respuesta al estrés y cómo los animales perciben y se adaptan a su entorno (Sheriff *et al.*, 2011).

1.3.1. Comportamiento social y niveles hormonales

El papel de las hormonas en el desarrollo del comportamiento animal es un tema de gran interés en la actualidad. El papel más conocido es el de los andrógenos, pues una amplia variedad de conductas animales son andrógeno-dependientes, como el comportamiento sexual, conductas agresivas y el rango social (Rubinow y Schmidt, 1996). Sin embargo, menos claro está el papel de otras hormonas. Es conocido que las situaciones de conflicto social alteran la actividad de los péptidos opioides, de la CRH (hormona liberadora de corticotropina) y de la vasopresina. Y se cree que la liberación de catecolaminas disminuye el umbral para que se desencadene la conducta agresiva, desarrollándose en este caso una agresividad defensiva (Mickzek y Oliver, 1998).

Los estudios sobre los efectos de los andrógenos en el comportamiento animal conducen a varias conclusiones: primero, los andrógenos pueden influir en el comportamiento mediante efectos organizadores y/o activadores sobre la agresividad de tipo ofensivo, dentro de la cual estarían incluidas la agresividad por dominancia, la intraespecífica o la territorial (Mickzek y Oliver, 1998; Vasadze *et al.*, 2007); en segundo lugar, la relación entre los andrógenos y el comportamiento se vuelve más compleja a medida que avanzamos en la escala evolutiva y finalmente, los resultados a veces son contradictorios, dependiendo de la experiencia pasada y los factores sociales (Rubinow y Schmidt, 1996).

En resumen, las conductas ofensivas estarían moduladas por los andrógenos circulantes, mientras que las conductas defensivas parecen estarlo por catecolaminas y glucocorticoides (Dantzer y Salaün, 1992).

De esta manera se ha observado que, en primates, la estimulación persistente del eje corticotropo afecta al poder reproductor de los individuos. Así, los animales bajo presión (animales subordinados) suprimen su reproducción, observándose inhibición de la función ovárica y abortos (Wallner *et al.*, 1999).

En los rinocerontes, los machos alfa tienden a tener concentraciones más elevadas de andrógenos respecto a los machos beta (Christensen *et al.*, 2009), sin embargo, no presentan diferencias significativas en cuanto al tamaño corporal (Rachlow *et al.*, 1998). Los machos no territoriales, adoptan un estatus de subordinado hasta que pueden adquirir su propio territorio (Owen-Smith, 1971, 1973 y 1975; Rachlow *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 2009). Si el rango social está relacionado con los niveles de andrógenos, esto tiene otros costes asociados, como por ejemplo, concentraciones elevadas de andrógenos pueden comprometer el sistema inmune (Wingfield *et al.*, 2001). Además, en otras especies animales, diversos autores indican que los animales dominantes, son los que presentan un nivel superior de glucocorticoides en heces respecto a los animales subordinados, atribuyéndolo a las interacciones agresivas en las que los animales dominantes se ven envueltos para mantener su dominancia (Monfort *et al.*, 1998; Abbott *et al.*, 2003; Creel, 2005; Barja *et al.*, 2008a).

1.3.2. Comportamiento reproductor y niveles hormonales

En muchos animales, los comportamientos agresivos se relacionan con los periodos reproductores (particularmente en especies reproductoras estacionales) y con el incremento asociado que se produce de testosterona (Bouissou, 1983). En los rinocerontes de las reservas de Sudáfrica, se ha observado que el aumento de andrógenos en los machos y los cambios conductuales coinciden con el inicio de la estación lluviosa (Septiembre-Febrero), sugiriendo un patrón reproductivo estacional aunque no demasiado estricto. Además, dichos niveles aumentan si se encuentran en presencia de otros machos y hembras. Sin embargo, el aumento de testosterona que se produce en los machos, parece estar directamente relacionado con la defensa y marcaje del territorio e indirectamente relacionado con un mayor éxito reproductivo (Kretzschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009).

La falta de alimento que se produce en los animales en libertad según la época del año en la que se encuentren, es considerada como uno de los factores estresantes que más impacto tiene sobre su reproducción (Norris y Lopez, 2011). En cautividad, no existen esas fluctuaciones estacionales en cuanto a la disposición de la comida, por lo que la reproducción, depende en parte de la estructura social artificial en la que se encuentren, determinado por el número de hembras y/o machos que convivan juntos y su "condición" dentro del grupo (Hermes *et al.*, 2005; Metrione *et al.*, 2007). De esta forma, por ejemplo, un macho que convive junto a dos o más hembras, tendrá mayores niveles de testosterona que aquel que no tiene hembras (Christensen *et al.*, 2009). Es por todo esto, que en algunos programas de reproducción en cautividad del rinoceronte blanco, se hace necesaria la existencia de un macho "encelador", el cual active con su presencia el comportamiento sexual masculino y a su vez estimule a las hembras, para poder culminar en la cópula (Kretzschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009).

Mediante la determinación de la concentración de metabolitos de progesterona, se puede caracterizar la fase lútea, pues se produce un rápido aumento de su concentración (Kock *et al.*, 1991; Schwarzenberger *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2001), siendo también un poderoso indicador de la gestación puesto que dichos niveles se elevan drásticamente (Berkeley *et al.*, 1997; Garnier *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Schwarzenberger *et al.*, 1996b; Schwarzenberger *et al.*, 2000b; MacDonald *et al.*, 2008). Además, la concentración de estrógenos, pero también la determinación de andrógenos, son fieles indicadores de la fase folicular y se mantienen en niveles basales durante la gestación (Schwarzenberger *et al.*, 1996b y 2000b), pudiendo ser utilizados como referencia de ciclos ovulatorios (Kassam y Lasley, 1981; Kock *et al.*, 1991).

Los patrones de los ciclos reproductivos en las hembras de rinoceronte presentan una gran variación individual (Schwarzenberger *et al.*, 1998), además de ser diferentes incluso dentro de las cinco especies de rinoceronte (Hermes *et al.*, 2007). De esta forma, se ha visto una duración de 21-25 días en el rinoceronte de Sumatra (Heistermann *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 2001), 27 días en el rinoceronte negro (Schwarzenberger *et al.*, 1993; Berkeley *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2001; Lance *et al.*, 2001; Radcliffe *et al.*, 2001; Garnier *et al.*, 2002), 30-35 días o 65-70 días en el rinoceronte blanco (Hindle *et al.*, 1992; Radcliffe *et al.*, 1997; Schwarzenberger *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001) y 43-48 días en el rinoceronte Indio (Kassam y Lasley, 1981; Schwarzenberger *et al.*, 2000b; Gomez *et al.*, 2004; Stoops *et al.*, 2004).

Para el caso concreto del rinoceronte blanco, Patton y colaboradores propusieron en 1999, mediante la determinación de los metabolitos de progesterona en extractos fecales y observando sus patrones de comportamiento reproductivo, que la duración típica del ciclo estral en esta especie, es aquella que tiene aproximadamente un mes de duración, existiendo dos grupos principales:

1. Ciclo estral típico: de aproximadamente 4 semanas de duración.

2. Ciclo estral de unas 8 semanas con una fase lútea de casi el doble de duración respecto al grupo anterior. Estos ciclos fueron menos frecuentes e incluso algunos parecían aberrantes.

El estudio más reciente acerca de la duración del ciclo estral en esta especie, sugiere dos tipos principales de ciclos: aquellos que duran 4 semanas y los que duran 10 semanas (Hermes *et al.*, 2012), aunque se cree que solo los ciclos cortos son los fértiles, mientras que los ciclos largos parecen estar asociados con el envejecimiento reproductivo (Hermes *et al.*, 2007).

La mayoría de los rinocerontes que se mantienen en cautividad presentan largos periodos anovulatorios sin actividad del cuerpo lúteo, lo que parece ser causa principal de su baja tasa reproductora en cautividad (Hermes *et al.*, 2007 y 2012). También influye el desarrollo de patologías reproductivas y la inactividad ovárica, que son consecuencia de la edad, además de estar relacionado con prolongados periodos no reproductivos (Carlstead y Brown, 2005). Este proceso de envejecimiento de los órganos genitales se pueden prevenir con la consecución de, al menos, una gestación (Hermes *et al.*, 2006).

En las hembras de todos los mamíferos en general, las respuestas inmunes juegan un papel importante en cuanto a la reproducción, pues en caso de enfermedad, se produce un bloqueo de la gestación mediante distintas vías: reduciendo su motivación para que se produzca el cruzamiento; reduciendo la atracción de los machos hacia las hembras; e interrumpiendo los eventos hormonales necesarios para que se produzca una gestación exitosa (Norris y Lopez, 2011).

1.3.3. Evaluación de la respuesta de adaptación

Cuando se produce una situación de estrés el organismo sufre una serie de cambios internos para adaptarse a esa nueva situación. La respuesta es fundamentalmente neuroendocrina, con una activación del sistema simpático-adrenomedular, que conlleva la liberación de catecolaminas y del eje corticotropo, con la liberación de hormonas adrenales que inducen cambios en el metabolismo y/o regulación iónica, que trabajan para combatir los factores fisiológicos y psicológicos para eliminar o neutralizar el estímulo estresante (Chacón, 2004; Reeder y Kramer, 2005; Norris, 2007).

El análisis de los niveles de glucocorticoides es un componente esencial en la evaluación de la respuesta al estrés, que aunque debe considerarse junto a otros parámetros, ofrece una considerable información de cómo los animales perciben y se adaptan a su entorno, siendo además una medida indirecta del bienestar animal (Schwarzenberger *et al.*, 2000a; Reeder y Kramer, 2005; Sheriff *et al.*, 2011).

La determinación de cortisol tiene mucho interés para valorar la respuesta de un animal tanto para un estrés agudo como frente a un estrés que actúe de forma crónica (Figura 4):

- Tras la acción de un estímulo agudo o la inyección intravenosa de ACTH (hormona adrenocorticotropa) se produce un aumento de la cortisolemia, que alcanza un pico máximo que luego vuelve a niveles basales (Wasser *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2002; Norris, 2007; Metrione y Harder, 2011).
- Si la acción del estímulo es crónica, la cortisolemia puede estar elevada o ser normal, dependiendo del efecto de retrofuncionalidad, por lo que únicamente la aplicación de una prueba dinámica permitirá valorar la capacidad de respuesta adrenocortical (Borell y Ladewing, 1989; Chacón 2004).

Bajo estrés crónico o una habituación al estímulo estresante, la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal del animal está disminuida (Ostrander *et al.*, 2006; Cyr y Romero, 2008; Petrowski *et al.*, 2012) y la elevada concentración de glucocorticoides mantenida durante largos periodos de tiempo, puede tener efectos perjudiciales para el animal (Rothschild *et al.*, 2008) ya que se produce una hipertrofia de la glándula adrenal que provoca una pérdida de masa corporal, pérdida de actividad reproductora e inmunosupresión (Norris, 2007).

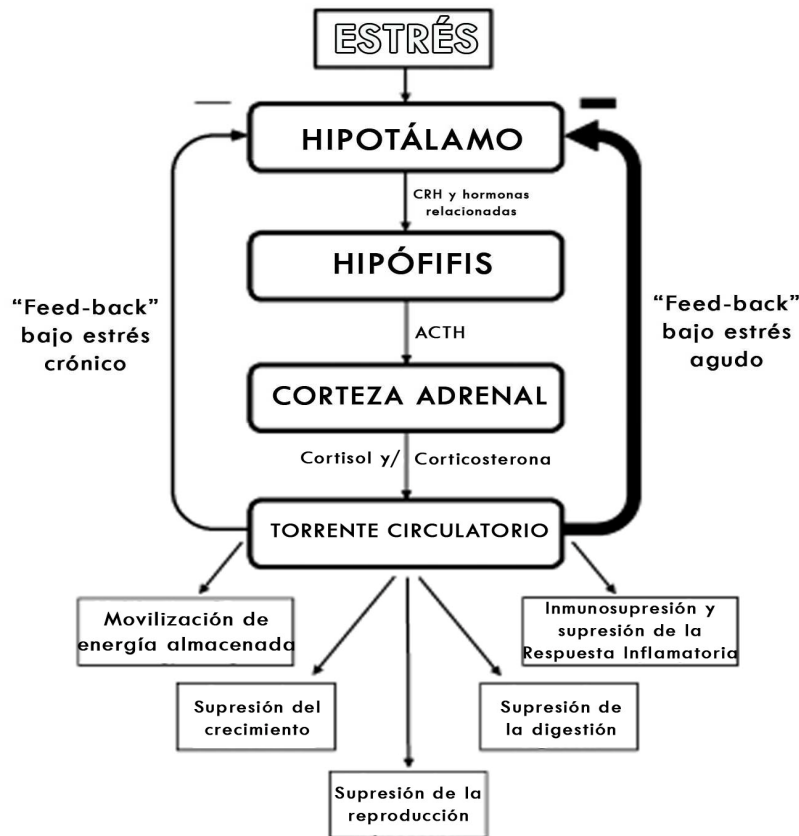


Figura 4: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA). Efecto de la influencia del "feed-back" negativo producido bajo estrés agudo, comparado con el producido bajo estrés crónico y las consecuencias principales que se producen en el organismo bajo la acción de agentes estresantes (Figura adaptada de Sheriff *et al.*, 2011).

Si se quiere evaluar el estado de bienestar de un animal, al mismo tiempo que se determina la concentración de cortisol, es necesario tener en cuenta otros parámetros, como el patrón de comportamiento (conducta agresiva, estereotipos, comportamiento apático), el estado de salud y la productividad ya que son numerosos los estímulos capaces de desencadenar respuestas de estrés en los animales (Sheriff *et al.*, 2011). Los efectos de estos estímulos han sido ampliamente estudiados, siendo la determinación del cortisol un parámetro de gran interés (Rothschild *et al.*, 2008; Barja *et al.*, 2011). En el caso de los rinocerontes, entre otras especies animales, se sabe que existen diversas situaciones, como el transporte o la traslocación de ejemplares, que actúan como factores estresantes para los animales, aumentando los niveles de glucocorticoides (Turner *et al.*, 2002; Linklater *et al.*, 2010).

Por otro lado cada vez es más habitual valorar la respuesta del eje corticotropo a diferentes estímulos estresantes mediante la determinación del cortisol o sus metabolitos en diversas muestras fisiológicas como son la saliva, orina, heces y la leche (Gomez *et al.*, 2004; Bayazit, 2009; Konjevic *et al.*, 2011), cobrando cada día más importancia la determinación en heces por su facilidad para el manejo de poblaciones de animales salvajes (Flauger *et al.*, 2010).

2. HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides poseen importantes funciones reguladoras en una amplia variedad de procesos biológicos incluyendo la reproducción, la diferenciación, el desarrollo, la proliferación celular, la apoptosis, la inflamación, el metabolismo, la homeostasis, y la función cerebral (Tsai y O'Malley, 1994; Edwards, 2005). Muchos de sus efectos se deben a la unión con su receptor, que mediados a través de la modulación de la expresión génica, se producen con un retraso de horas o incluso días. Sin embargo, se han identificado otras respuestas a los esteroides que siguen rutas no genómicas y por lo tanto son mucho más rápidas, ocurriendo en cuestión de segundos o minutos (Rubinow y Schmidt, 1996; Lösel y Wehling, 2003; Edwards, 2005).

2.1. Síntesis, regulación y metabolismo de las hormonas esteroides

El esteroide más abundante y conocido es el colesterol (Figura 6), precursor de moléculas tan importantes como los ácidos biliares, las hormonas esteroides o la vitamina D. El colesterol proviene principalmente de la síntesis endógena en el hígado y en menor proporción por la ingesta de colesterol en la dieta (Norris, 2007).

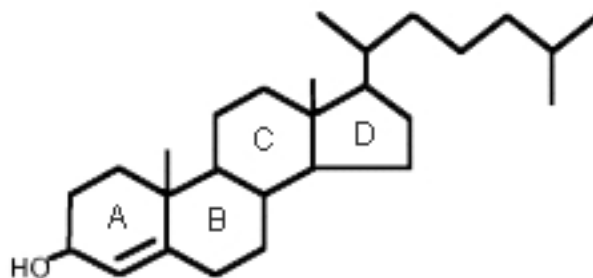


Figura 5: Molécula de colesterol.

Existen muchos esteroides de distinta naturaleza, pero todos ellos poseen un núcleo común, el ciclopentano perhidrofenantreno, formado por cuatro anillos que se nombran con las letras A, B, C y D. Los distintos esteroides se diferencian por la naturaleza y posición de los sustituyentes, además de variar en el número de átomos de carbono que poseen. De esta forma, los estrógenos son compuestos de 18 átomos de carbono, mientras que los andrógenos poseen 19 y tanto los corticoides como los progestágenos tienen 21 átomos de carbono (Norris, 2007).

El primer paso para la síntesis de todas las hormonas esteroides, es la conversión del colesterol en pregnenolona (Figura 6). El colesterol puede proceder de la síntesis intracelular a partir del acetato, de los ésteres de colesterol almacenados en las gotas lipídicas citoplasmáticas o bien, es transportado en la sangre unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), que son captadas por la célula esteroideogénica, gracias a la existencia de receptores específicos para dichas proteínas. Los ésteres de colesterol se hidrolizan, y el colesterol libre es transportado desde el citoplasma a la membrana externa de la mitocondria (Gruber *et al.*, 2002). Mediante una proteína específica (StAR, *steroidogenic acute regulatory protein*) pasa a la membrana mitocondrial interna (Jameson, 2007) donde una desmolasa produce la escisión de la cadena lateral dando lugar a la pregnenolona, que es el precursor común de todas las vías esteroideogénicas. La pregnenolona pasa al retículo endoplasmático liso, donde gracias a una serie de transformaciones enzimáticas, se van sintetizando todas las hormonas esteroides (Moreno *et al.*, 2011). Las enzimas para la biosíntesis de esteroides están localizadas en el retículo endoplasmático liso (REL) o en las mitocondrias. Puesto que los esteroides pueden atravesar fácilmente las membranas biológicas, no pueden ser almacenados en el interior de las células y por lo tanto, se sintetizan a solicitud (Moyes y Schulte, 2007).

Los esteroides forman tres clases principales de hormonas en los vertebrados: los mineralocorticoides, los glucocorticoides y las hormonas sexuales (Moyes y Schulte, 2007).

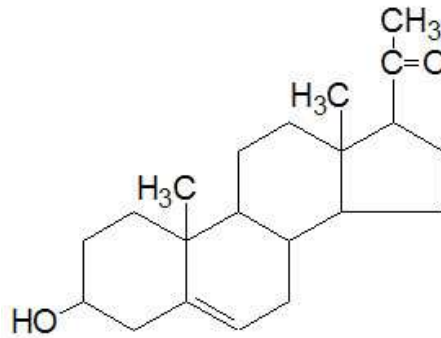


Figura 6: Molécula de pregnenolona.

Las hormonas esteroides son principalmente sintetizadas en el hígado (colesterol), en las gónadas (estrógenos, andrógenos y progesterona), en la placenta (estrógenos y progesterona), en la corteza adrenal (corticosteroides y andrógenos) y en el cerebro (neuroesteroides). Existen, sin embargo, dos rutas principales para su formación, por un lado la ruta de los esteroides adrenales (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal) y por otro, los gonadales (eje hipotálamo-hipófisis-gonadal) (Norris, 2007; Salvador, 2012). De forma general, esta regulación de la síntesis de esteroides, depende de señales constituidas por hormonas proteicas (Guzman *et al.*, 2010):

- Hormona corticotropa (CRH) y hormona adrenocorticotropa (ACTH) en el caso de glucocorticoides.
- Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) en el caso de las hormonas sexuales.

Sin embargo, este no es el único mecanismo de la vía esteroidogénica, pues se ha observado que los ejes neuroendocrinos también interaccionan con el sistema inmune. Esta comunicación bidireccional se establece porque los esteroides pueden regular algunas funciones del sistema inmune y viceversa, moléculas secretadas por el sistema inmune, pueden modular la síntesis de esteroides (Sandi *et al.*, 1989), como es el caso de las citoquinas, cuyas acciones incluyen desde la activación y proliferación de células inmunológicas, hasta la mediación de la respuesta inflamatoria y regulación de la esteroidogénesis adrenal, gonadal y neural (Norris, 2007; Guzman *et al.*, 2010).

Los mamíferos poseen generalmente dos glándulas adrenales localizadas cranealmente a cada riñón. Cada glándula adrenal, está constituida por una corteza y una médula, ambas zonas constituyen tejidos endocrinos con distinta estructura, acción y tejido embrionario pero compartiendo una misma función: intervenir en la adaptación del individuo al medio ambiente que le rodea (Moreno *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011). La médula supone el 20% de la glándula mientras que la corteza supone el 80%, siendo la encargada de la producción de las hormonas esteroides: glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas sexuales. A su vez, la corteza se divide en tres capas (Figura 7): la zona glomerular es la más superficial y encargada de la secreción de aldosterona; la zona intermedia, llamada fascicular, es la responsable de la síntesis de cortisol y de andrógenos en menor proporción; la zona reticular, la más interna, sintetiza andrógenos y algo de cortisol (Norris, 2007; Moreno *et al.*, 2011).

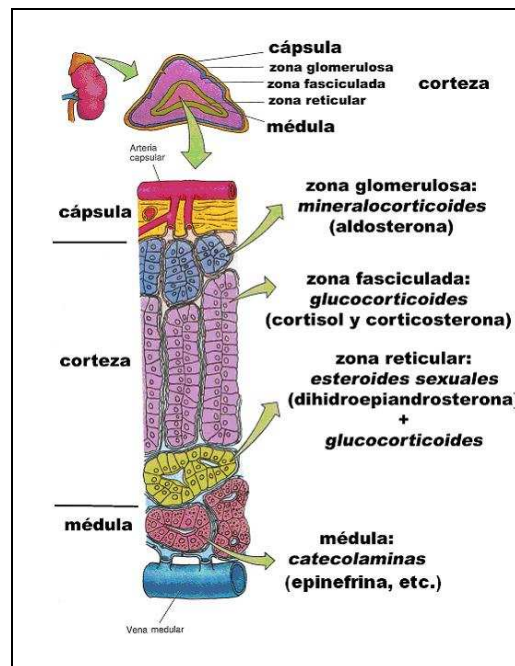


Figura 7: Esquema de la glándula adrenal (Moreno *et al.*, 2011).

Las hormonas corticoadrenales se dividen en tres grupos dependiendo de su acción fisiológica: hormonas mineralocorticoides, hormonas glucocorticoides y hormonas sexuales (Moyes y Schulte, 2007; Norris, 2007).

- **Hormonas mineralocorticoides:** predomina la aldosterona, cuya función principal es la regulación del metabolismo del Na⁺ y el K⁺. Por tanto, su acción es principalmente sobre el equilibrio hidroelectrolítico, basándose en la recuperación de Na⁺ y la excreción de K⁺ a nivel de los riñones, tracto digestivo, glándulas sudoríparas y salivales. Consecuencia de ello es la regulación del volumen de agua extracelular.
- **Hormonas glucocorticoides:** el cortisol y la corticosterona son las más importantes. Su función más conocida es su acción sobre los glúcidos: incrementan la producción de glucosa, pero además ejercen diversos tipos de acciones: incremento de la degradación de proteínas en aminoácidos, liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, regulación del sistema inmune y de las respuestas inflamatorias.
- **Hormonas sexuales:** andrógenos como la dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona, testosterona y estrógenos como el estradiol. Regulan las características sexuales, la reproducción y el comportamiento sexual.

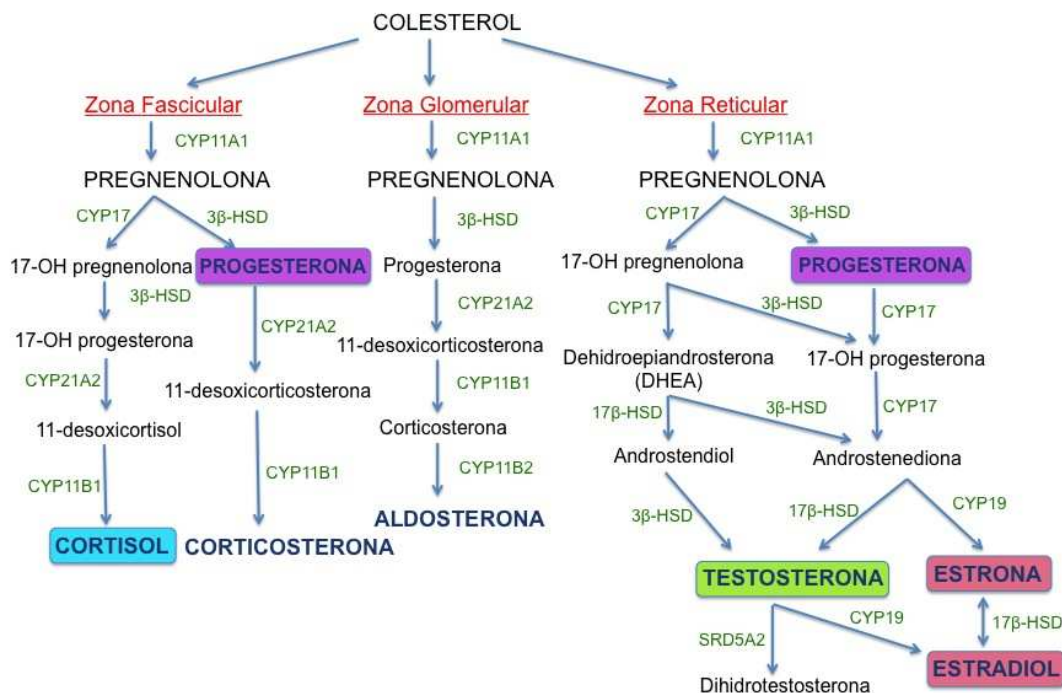


Figura 8: Síntesis de las distintas hormonas esteroides a partir del colesterol.

La producción de hormonas corticoadrenales está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal o eje corticotropo. El control que ejerce es complejo, ya que, como hemos señalado anteriormente, depende de influencias neuronales, del control hormonal y de su interacción con el sistema inmune (Sandi *et al.*, 1989; Norris, 2007; Guzman *et al.*, 2010).

Todo el eje se encuentra bajo el control del sistema nervioso central (SNC) por medio de neurotransmisores peptídicos. Al SNC llegan continuamente estímulos provenientes del órgano subformical (equilibrio físico-químico), de los centros bulbares (sistema cardiovascular) y del sistema límbico (estado anímico del animal) (García-Belenguer *et al.*, 1993; Chacón, 2004). Los neurotransmisores peptídicos estimulan a nivel hipotalámico la producción y liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual, funciona como uno de los mayores reguladores de la respuesta de adaptación del animal frente al estrés interno o externo (Tsatsanis *et al.*, 2007). Cuando la CRH alcanza la hipófisis, estimula rápidamente la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la síntesis de la pro-opiomelanocortina (POMC), precursor de la ACTH. La unión de la ACTH a receptores específicos de membrana de la corteza adrenal, produce la activación del sistema adenilato ciclasa-AMPC, que estimula la protein quinasa A, desencadenándose el paso de colesterol a pregnenolona, generando la síntesis y liberación de glucocorticoides (Norris, 2007; Moreno *et al.*, 2011). Si existe un estímulo prolongado de ACTH, se produce una hipertrofia de la zona fascicular de la corteza adrenal, además de un incremento de las enzimas necesarias para la síntesis de cortisol. Esta es la causa de que el cortisol sea la principal hormona producida tras la estimulación por ACTH. En concreto, el cortisol tiene un efecto directo de retrofuncionalidad negativa sobre el eje corticotropo (Moreno *et al.*, 2011). Actúa sobre el hipotálamo uniéndose a receptores específicos intracelulares que disminuyen la síntesis y liberación de CRH. Por lo tanto, se bloquea la liberación de ACTH y la producción de la POMC. Este efecto ayuda a mantener el nivel de cortisol en sangre ya que cuando éste aumenta por encima de un nivel, disminuye la cantidad de ACTH y CRH (Jameson, 2007).

Como ya hemos comentado anteriormente, la actividad reproductora se coordina mediante el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. La actividad de las neuronas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), integran la información tanto hormonal como neuronal de los bucles de retrofuncionalidad. La liberación de GnRH a la eminencia media y su transporte por la vía portal hipotálamo-hipofisaria, controla la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) desde la hipófisis anterior. Ambas hormonas actúan a nivel

gonadal activando la maduración de los gametos y en las hembras, impulsando la ruptura de los folículos maduros (Stouffer, 2003; Norris y Lopez, 2011).

El análisis de los efectos del estrés sobre el eje reproductivo se basa en gran medida en la determinación de la concentración de LH y GnRH, dando lugar al concepto de que los efectos del estrés sobre la reproducción, implican efectos sobre las neuronas de la GnRH en última instancia. Las señales que median estos efectos sobre dichas neuronas no están del todo claras y, probablemente, incluyan múltiples vías hormonales y neuronales que difieren dependiendo de la naturaleza del estímulo estresante, la especie y el estado hormonal y social del animal (Breen *et al.*, 2005; Avitsur *et al.*, 2007; Norris y Lopez, 2011).

La manera en la que un esteroide es metabolizado determina la naturaleza de la señal del esteroide y el grado en que se amplifica (Rubinow y Schmidt, 1996). Generalmente, implica la reducción de cadenas laterales, grupos o ambos y la conjugación con otras moléculas como la glucosa para formar glucurónido o su conjugación con sulfato. La formación de sulfato o glucurónido varía dependiendo del esteroide y/o de la especie. Los conjugados son solubles en agua, así que al ser liberados a la sangre, no se unirán de forma efectiva a las proteínas del plasma ni entrarán en las células para unirse a sus correspondientes receptores. En consecuencia, son filtrados desde la sangre, apareciendo en la orina. Algunos esteroides son metabolizados por el hígado, añadidos a la bilis y excretados vía intestinal, pudiendo ser encontrados en las heces (Monfort, 2003; Norris, 2007).

2.2. Fisiología de los glucocorticoides

El cortisol (Figura 9), como el resto de las hormonas esteroides, se sintetiza tomando el colesterol como substrato. Su fórmula química se nombra como 4-pregnen-11 β -17, 21-triol-3,20-diona (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*).

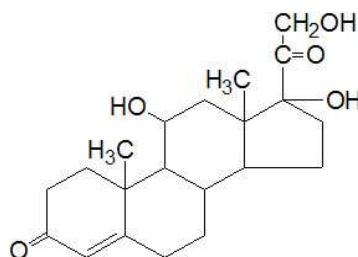


Figura 9: Molécula de cortisol.

Como ya hemos comentado anteriormente, en el REL se produce la transformación de pregnenolona en las distintas hormonas esteroides. En concreto, la formación de glucocorticoides, se puede producir mediante dos vías (Figura 8) (Norris, 2007; Moreno *et al.*, 2011):

- Vía de los 17 α -hidroxiesteroides: Transformación de la pregnenolona en 17-OH pregnenolona que mediante la acción de una hidroxilasa, forma 17-OH progesterona a partir de la cual se forma 11-deoxicortisol que finalmente se convertirá en cortisol.
- Vía de los 17-deoxiesteroides: Conversión de la pregnenolona en progesterona mediante una reacción enzimática mediante la CYP17. La progesterona, se convertirá en 11-deoxicorticosterona, siendo por tanto precursora de la síntesis de corticosterona.

El mecanismo de acción del cortisol es muy similar al de otras hormonas esteroides. El cortisol difunde a través de las membranas de las células efectoras. En el citoplasma de las células, los receptores están saturados en un rango del 10-70% por lo que un aumento o disminución de cortisol plasmático libre modifica el número de receptores libres produciéndose la respuesta fisiológica (Jameson, 2007).

La unión del glucocorticoide a su receptor produce un cambio conformacional en éste, que permite que el complejo glucocorticoide-receptor se una a sitios específicos del ADN, posteriormente mediante la síntesis de ARNm aumenta la síntesis de proteínas en el citoplasma. Ejemplo de ello es la producción de enzimas gluconeogénicas en el hígado.

2.2.1. Funciones del cortisol

Los glucocorticoides pueden tener efectos muy complejos ya que pueden producir acciones anabólicas, catabólicas, reguladoras, inhibidoras, estimulantes o facilitantes según el tejido implicado. Los principales efectos sobre el organismo son los siguientes:

▪ **Efectos metabólicos:** los glucocorticoides presentan una importante función reguladora sobre el metabolismo de glúcidos, proteínas y lípidos.

- Sobre los glúcidos: incrementan de seis a diez veces la gluconeogénesis hepática a expensas de aminoácidos, con lo cual se estimula la formación de glucosa y el depósito de glucógeno hepático (Norris, 2007; Guyton y Hall, 2011). Paralelamente y debido a su efecto antiinsulínico, disminuye el consumo periférico de glucosa, necesario para mantener la producción normal de glucosa. Mientras que la epinefrina y el glucagón tienen una acción rápida aumentando la glucemia, el cortisol es de acción más lenta prolongando el efecto de estas hormonas. Los glucocorticoides resultan indispensables en periodos de ayuno prolongado para suministrar glucosa al SNC y a los eritrocitos, los cuales no cuentan con otra fuente de energía (Jameson, 2007). En animales puramente carnívoros este efecto es primordial, pues es la forma que poseen estas especies para obtener glucosa (Moreno *et al.*, 2011).

- Efectos sobre las proteínas: a nivel hepático aumenta la síntesis proteica, lo que conduce a un acúmulo de proteínas en el hígado. Sin embargo, en el resto del organismo, especialmente a nivel muscular y tejido linfoide, inhiben la producción proteica y estimulan la proteólisis (Guyton y Hall, 2011). Todo ello conduce a un aumento de aminoácidos en sangre, el cual se ve incrementado por una disminución del transporte a través de las membranas plasmáticas. Este aumento de aminoácidos libres produce un acúmulo de sustancias nitrogenadas que conlleva a un balance de nitrógeno negativo. Esta situación es responsable de algunos de los síntomas que aparecen cuando hay un exceso de cortisol, como es la debilidad muscular o la falta de la síntesis de matriz ósea (Guyton y Hall, 2011; Moreno *et al.*, 2011).

- Efectos sobre los lípidos: se estimula la movilización de grasas lo que da lugar a un aumento de la concentración de ácidos grasos libres en plasma, a la vez que se favorece la acción de factores lipídicos del tejido adiposo como son la epinefrina y la hormona del crecimiento (Jameson, 2007). La insulina liberada en respuesta a la hiperglucemia produce una resíntesis de lípidos, lo que unido al aumento del apetito produce un acúmulo de grasas con una distribución especial en regiones torácicas y cefálicas del cuerpo (Jameson, 2007; Guyton y Hall, 2011).

- **Efectos sobre el sistema inmune:** la respuesta inmune es inhibida por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal a distintos niveles: un aumento de los glucocorticoides inhibe la respuesta inflamatoria así como la producción de anticuerpos; la CRH no sólo estimula la liberación de ACTH sino que también causa la liberación de somatostatina y dopamina, que reducen la secreción de la hormona del crecimiento y prolactina, respectivamente. La liberación de citoquinas, como las interleucinas o los interferones, que se produce durante un aumento de la actividad inmune, pueden activar la liberación de la CRH del hipotálamo, que en último término eleva la concentración de glucocorticoides y suprime la respuesta inmune. No todas las acciones de los glucocorticoides suprimen la respuesta inmune, ya que a nivel fisiológico, determinados aspectos de la inmunidad celular son mejorados por los glucocorticoides, aunque una elevación crónica puede ser supresora (Norris, 2007).
- **Acción sobre fluidos y electrolitos:** facilitan la excreción de Na^+ y agua y la retención de K^+ , inhiben las acciones de la vasopresina sobre el túbulo distal del riñón y producen un aumento sobre la tasa de filtración glomerular (Moreno *et al.*, 2011).
- **Efectos sobre la reproducción:** El inicio de la pubertad está asociado con la activación de la función adrenal (adrenarquia). Los animales que poseen una función adrenal disminuida, pueden experimentar un retraso de la pubertad y/o en la reproducción. La secreción de glucocorticoides se eleva durante la estación reproductiva, estando considerada como un factor esencial para una reproducción exitosa. Sin embargo, elevados niveles de glucocorticoides pueden bloquear la secreción de gonadotropinas y retrasar o inhibir la reproducción (Moberg, 1991; Norris, 2007).
- **Efectos durante la gestación, el parto y la lactancia:** Los glucocorticoides parecen tener una importante función durante las últimas semanas de la gestación, en la maduración pulmonar de la cría antes de su nacimiento y estimulando la síntesis de surfactante pulmonar (Bolt *et al.*, 2001; Houfflin-Debarge *et al.*, 2005; Garbrecht *et al.*, 2006), así como en su desarrollo intestinal (Sauter *et al.*, 2004). Durante el parto, se han relacionado con el aumento de la contractibilidad uterina (Challis y Smith, 2001) como intermediario para la activación del miometrio (Jenkin y Young, 2004) y también, inducen la síntesis y secreción de leche materna controlando la lipogénesis y la síntesis de lactosa, interviniendo en el mantenimiento de la viabilidad y función de las células mamarias secretoras (Casey y Plaut, 2007).

- **Respuesta de adaptación:** la liberación de glucocorticoides forma parte de la respuesta de adaptación fisiológica, que es una respuesta inespecífica necesaria para que el organismo sea capaz de hacer frente a los estímulos estresantes que recibe, siendo imprescindible esta respuesta para sobrevivir (Norris, 2007; Moreno *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011).

2.2.2. Distribución y metabolismo del cortisol

La corteza adrenal secreta las hormonas esteroides al torrente circulatorio. El cortisol liberado en sangre se transporta principalmente conjugado con proteínas plasmáticas, de forma específica con CBG (*Corticosteroid-binding Globulin*) o inespecíficamente con albúmina, quedando libre únicamente el 10% del cortisol total (Lewis *et al.*, 2005; Jameson, 2007; Norris, 2007). Sólo esta fracción libre es capaz de abandonar el torrente sanguíneo mediante difusión pasiva a través de las membranas celulares. Así, se puede encontrar cortisol libre en otros fluidos biológicos: saliva, leche y orina (Golden *et al.*, 2011).

Los mayoría de los corticosteroides son conjugados con sulfatos o glucurónidos para aumentar su solubilidad en agua, y de esta forma son fácilmente excretados en la orina y en las heces (Norris, 2007). Los metabolitos del cortisol llegan al intestino con la bilis en forma de compuestos conjugados (Taylor, 1971). Una vez en el intestino estos metabolitos pueden ser desconjugados y reabsorbidos produciéndose una circulación enterohepática de esteroides (Symonds *et al.*, 1994). Los esteroides no reabsorbidos son eliminados con las heces pudiendo ser metabolizados por bacterias específicas (Palme *et al.*, 1996).

La concentración de glucocorticoides (o sus metabolitos) se puede medir en diversos fluidos corporales o excrementos. Principalmente, las muestras fecales ofrecen la ventaja de que pueden ser fácilmente recogidas y la determinación de estos metabolitos es un método práctico para controlar la producción de glucocorticoides. Se han desarrollado inmunoensayos enzimáticos (EIA), para permitir la medición de los grupos de glucocorticoides en las heces de animales (Möstl y Palme, 2002; Young *et al.*, 2004).

Mientras que en orina existe cortisol y cortisona libre sin metabolizar en concentraciones detectables, en heces prácticamente no se detectan, existiendo únicamente trazas no representativas, por ello, se recurre al análisis de glucocorticoides (Palme y Möstl, 1997; Palme *et al.*, 1999). Para ello, las muestras deben ser extraídas antes de ser analizadas. En la técnica de EIA, la extracción con un solvente no polar (metanol al 80%) ha sido la que ha dado recuperaciones más altas (Palme y Möstl, 1997; Möstl *et al.*, 1999), sin embargo, hay que tener en cuenta las diferencias de polaridad de los glucocorticoides predominantes en cada especie a la hora de elegir el método de extracción.

El estudio de los derivados de cortisol en heces, es relativamente reciente, por lo que no están todos los metabolitos identificados. La naturaleza de los distintos metabolitos eliminados con las heces, varía dependiendo de la especie, así, en rumiantes o herbívoros, los metabolitos más representativos son los 11,17 dioxoandrostano (Palme *et al.*, 2000; Möstl *et al.*, 2002) y debido a la longitud del intestino, tienen un metabolismo más intenso de los derivados del cortisol, distinto al de los carnívoros. Por ello, Palme y Möstl (1997), pusieron a punto una técnica EIA, que es capaz de cuantificar los derivados 11,17 DOA gracias a la reacción cruzada que tienen con la 11 oxoetiocolanolona EIA (11-OXO EIA). El anticuerpo reconoce únicamente una parte de la molécula común a todos los derivados 11,17-DOA, existiendo por tanto, una especificidad de grupo. Este método se ha probado en varias especies animales tanto domésticas como salvajes: ovino y bovino (Palme *et al.*, 1999; Palme *et al.*, 2000); caballos y cerdos (Möstl *et al.*, 1999), cérvidos (Sauerwein *et al.*, 2004; Konjevic *et al.*, 2011); elefantes (Ganswindt *et al.*, 2003); mamíferos silvestres (Rehnus *et al.*, 2009; Dantzer *et al.*, 2010); etc.; con resultados satisfactorios. Otros autores, han detectado corticosterona en algunos herbívoros, mediante el mismo método de detección de los 11,17-DOA (Morrow *et al.*, 2002). Actualmente, el análisis de los derivados del cortisol en heces continúa en estudio, pues se siguen desarrollando técnicas con diferentes anticuerpos, con el objetivo de detectar el mayor número posible de derivados del cortisol en heces en las distintas especies.

La determinación de la concentración de cortisol será de gran ayuda en la valoración de algunos problemas de comportamiento, así como en la evaluación de la capacidad de adaptación de los animales al medio que les rodea, medida a su vez indirecta del estado de bienestar animal (Chacón, 2004; Sheriff *et al.*, 2011). No obstante, a la hora de interpretar los resultados obtenidos en el análisis de cortisol debemos tener en cuenta varios factores. En primer lugar es preciso conocer los

niveles basales normales para la especie y el método de análisis utilizado, ya que existen diferencias importantes entre especies y entre procedimientos analíticos. Por otra parte, los niveles basales de cortisol pueden verse alterados por diferentes factores fisiológicos o patológicos, por lo que la realización de pruebas dinámicas, con las que se puede evaluar la respuesta de la corteza adrenal a la acción de productos estimulantes o supresores de su actividad, resulta de gran utilidad (Chacón, 2004). Entre dichas pruebas, una de las más utilizadas es la estimulación con ACTH (*ACTH Challenge*), consistente en evaluar la respuesta de la corteza adrenal a la estimulación que ejerce sobre ella la ACTH, pero tienen el inconveniente asociado de la manipulación del animal, sedación, etc.

El avance de las técnicas de determinación de derivados de cortisol en heces, tiene ventajas importantes respecto a la determinación en plasma, puesto que la toma de la muestra no supone ningún estrés para el animal, al no tener que ser manipulado y reflejan el estado del eje corticotropo en un periodo de tiempo más grande sin estar influenciado por pequeñas fluctuaciones en el tiempo (Palme y Möstl, 1999; Möstl *et al.*, 1999). Todo esto, ha abierto las posibilidades de evaluación de animales salvajes y aquellos de difícil manejo en los zoológicos (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Sheriff *et al.*, 2011).

2.2.3. Factores que estimulan la liberación de cortisol

La concentración de cortisol en sangre no es constante, varía como respuesta a factores fisiológicos o a diversos agentes estresantes, externos o internos, que producen una activación del eje corticotropo como parte de una respuesta de adaptación (Norris, 2007).

➤ **Factores fisiológicos:**

- **Ritmo circadiano:** el factor de variación más importante es el ritmo nictameral o circadiano. En animales diurnos se observan concentraciones de CRH, ACTH, y cortisol más elevadas durante las últimas horas de la noche y primeras de la mañana, disminuyendo la concentración por la tarde. Sin embargo, en animales nocturnos, el ciclo está invertido, observándose la concentración más alta durante las primeras horas de oscuridad (Illera *et al.*, 1993; Bell-Pedersen *et al.*, 2005; Jerjes *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Norris, 2007; Thanos *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2010; Golden *et al.*, 2011). Además del ritmo circadiano en muchas especies se observan ritmos ultradianos, los

cuales son repetibilidades rítmicas que ocurren en ciclos de menos de 24 horas (Chacón, 2004; Qian *et al.*, 2012).

- **Estación del año:** en muchas especies se ha observado una variación de la concentración de glucocorticoides que sigue un patrón estacional (Kenagy y Place, 2000; Wingfield y Kitaysky, 2002; Barja *et al.*, 2011; Corlatti *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha visto que los herbívoros presentan unos niveles superiores de glucocorticoides durante la estación seca (Chinnadurai *et al.*, 2009). Además, parece ser esencial en el éxito reproductivo, una elevación en la secreción de glucocorticoides durante la estación reproductora (Norris, 2007).

- **Especie animal y variaciones individuales:** el nivel basal de cortisol varía dependiendo de la especie, el género e incluso el propio individuo, lo que se debe tener en cuenta a la hora de valorar la cortisolemia (Weibel *et al.*, 2002; Touma *et al.*, 2003). Así mismo, la relación entre los glucocorticoides mayoritarios (cortisol y corticosterona) depende de la especie animal. En general, en la mayoría de las especies de mamíferos, hay un predominio del cortisol, mientras que en aves y roedores es la corticosterona la más abundante (Mormède *et al.*, 2011). En rinocerontes, no se ha llegado a un consenso generalizado, algunos autores han analizado cortisol (Schwarzenberger *et al.*, 2000a) y otros corticosterona (Wasser *et al.*, 2000; Metrione y Harder, 2011), aunque parecen ser los dos igualmente válidos para evaluar la respuesta de la corteza adrenal en esta especie (Turner *et al.*, 2002).

- **Estado fisiológico del animal:** al final de la gestación o del parto existe un aumento de la actividad del eje corticotropo y del sistema simpático que se refleja en un aumento de los niveles de glucocorticoides (Behringer *et al.*, 2009). El estado reproductivo parece ser un importante modulador de la función adrenal (Barja *et al.*, 2011; Kersey *et al.*, 2011).

- **Alimentación:** hay autores que han observado que la alimentación influye en la concentración de cortisol. Así por ejemplo, se ha observado un pico de cortisol en el momento de la ingestión de alimento (Schibler *et al.*, 2003; Norris, 2007). Cuando existe un periodo largo de ayuno o de restricción alimentaria se produce una hiperactividad del eje corticotropo para mantener la glucemia, volviendo a la normalidad tras la ingesta del alimento (Moreno *et al.*, 2011). Sin embargo, otros autores, indican que los patrones diurnos de

metabolitos y hormonas, no resultan afectados por los suministros energéticos de la dieta (Ndibualonji *et al.*, 1997).

▪ **Enriquecimiento ambiental:** el mantenimiento de especies salvajes en cautividad, es una complicada tarea que muchas veces requiere la utilización de distintas técnicas de enriquecimiento ambiental, que deben ser planteadas correctamente, para disminuir los niveles de glucocorticoides (Pirovino *et al.*, 2011; Poessel *et al.*, 2011).

➤ **Agentes estresantes:**

▪ **Agentes externos:** Dantzer y Mormède en 1979 los dividían en tres grandes grupos derivados de:

- Interacciones con otros animales (estrés social): en los sistemas de explotación intensivos, la superpoblación, el cambio de animal dominante, la presencia/ausencia de hembras en el grupo, el aislamiento de animales gregarios, etc., son situaciones en las que se pueden desencadenar la respuesta al estrés. Se ha demostrado que el rango social de un individuo se refleja en su sistema neuroendocrino y la modificación del mismo se acompaña de variaciones en la concentración plasmática de glucocorticoides y testosterona (Summers, 2002; Wingfield y Kitaysky, 2002; Abbott *et al.*, 2003; Sapolsky, 2004; Carlstead y Brown, 2005; Barja *et al.*, 2008a; Coburn *et al.*, 2010).

- Interacciones animales-medio ambiente: las condiciones ambientales influyen notoriamente en el estado de bienestar del animal, el cual responde frente a situaciones desfavorables de temperatura, humedad, ventilación, ruido, tipo de suelo, higiene medioambiental, altitud, alimento, etc. (Carr, 2002; Wingfield y Kitaysky, 2002; Bernabucci *et al.*, 2010; Johnstone *et al.*, 2012).

- Interacciones entre animales y el hombre: en este grupo estarían incluidas todas las situaciones estresantes derivadas del manejo de animales. Así por ejemplo, el destete, la alimentación, el transporte y la presión turística (Morton *et al.*, 1995; Schwarzenberger *et al.*, 2000a; Dehnhard *et al.*, 2001; Carr, 2002; Barja *et al.*, 2007; Viljoen *et al.*, 2008; Harcourt *et al.*, 2010; Linklater *et al.*, 2010).

- **Estresores endógenos:** los agentes estresantes no provienen siempre del exterior, en ocasiones proceden del propio organismo. Ejemplo de ello sería el dolor y las enfermedades (Norris, 2007; Ganswindt *et al.*, 2010).

2.3. Fisiología de las hormonas sexuales

Anteriormente, ya hemos comentado las generalidades de las hormonas sexuales en cuanto a su síntesis, regulación y metabolismo (Ver apartado 2.1). En esta sección, profundizaremos en los detalles para cada tipo de hormona sexual:

2.3.1. Andrógenos

Los andrógenos se definen como compuestos que estimulan y controlan principalmente las características masculinas, y estructuralmente, son miembros de la familia de las hormonas esteroides, formados por 19 átomos de carbono (C₁₉). El andrógeno más común en la mayoría de los vertebrados es la testosterona (Figura 10), a pesar de que otros andrógenos, como la androstenediona, predominan en algunas especies y procesos (Moyes y Schulte, 2007).

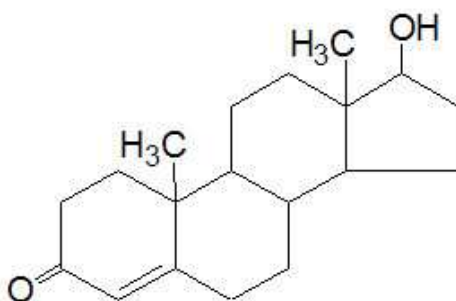


Figura 10: Molécula de testosterona.

La testosterona se sintetiza a partir de la androstenediona por la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) (Figura 11) y la enzima 5 α -reductasa convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), un andrógeno mucho más activo (Norris, 2007).

La testosterona es una de las hormonas androgénicas naturales más potentes y dentro de sus efectos biológicos se encuentra el promover el crecimiento muscular, estimulando la síntesis proteica (efecto anabólico) e inhibiendo su degradación (efecto anti-catabólico). Estas señales fisiológicas de la testosterona son moduladas mediante su interacción con los receptores intracelulares de andrógenos (RA) (Vingren *et al.*, 2010).

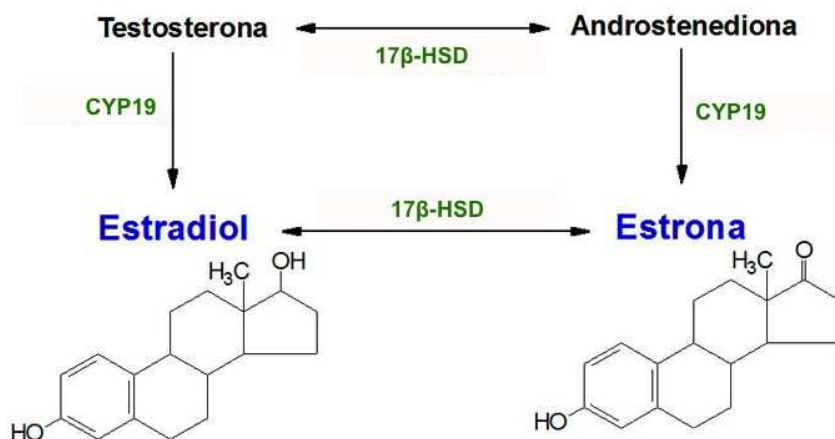


Figura 11: Ruta bioquímica de la transformación testosterona – androstenediona – estrógenos (CYP19: aromatasa, 17β-HSD: deshidrogenasa).

De forma generalizada, los andrógenos tienen dos efectos principales: los efectos androgénicos, como por ejemplo la diferenciación, el crecimiento y desarrollo del tracto reproductivo masculino, y los efectos anabólicos, como la estimulación del crecimiento lineal del cuerpo y el crecimiento somático. Durante el desarrollo temprano, los andrógenos “masculinizan” los genitales internos y externos y el cerebro, mientras que después de la pubertad, los efectos consisten en la maduración de los genitales externos y órganos accesorios sexuales además de facilitación de la libido y la potencia sexual (Rubinow y Schmidt, 1996; Liu y Veldhuis, 2009).

En los machos, la fuente principal de andrógenos circulantes, son los testículos, donde la hormona luteinizante (LH) de la hipófisis estimula la síntesis de testosterona y la libera al torrente sanguíneo. Otros andrógenos importantes son la dihidrotestosterona (DHT), la androstenediona y la dehidroepiandrosterona (DHEA). En las hembras, la corteza adrenal y los ovarios, también sintetizan andrógenos, pues son importantes precursores de la síntesis de estrógenos además de estimular el comportamiento sexual (Norris, 2007).

◇ Otras funciones de los andrógenos:

- Juegan un papel importante en la organización o programación de los circuitos cerebrales, que posteriormente son activadas por esteroides gonadales (Rubinow y Schmidt, 1996). Los andrógenos, son capaces de activar mecanismos neuroprotectores específicos para inhibir la muerte celular, lo que puede resultar útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Nguyen *et al.*, 2010).
- Se encargan tanto del tamaño como de la fuerza del músculo esquelético mediante diversos mecanismos. Los andrógenos se unen a receptores nucleares específicos que influyen directamente en la transcripción de genes diana. Estos genes codifican para factores de transcripción específicos del músculo, enzimas y proteínas estructurales. Además, pueden ejercer efectos no genómicos en el músculo mediante el aumento de la absorción de Ca^{2+} y modulando la actividad quinasa. Por tanto, el efecto anabólico de los andrógenos se debe a la combinación de sus acciones genómicas y no genómicas (Dubois *et al.*, 2012).

Se han encontrado evidencias que apoyan que la proporción entre andrógenos y estrógenos determina el sexo gonadal en todas las especies del reino animal (Bogart, 1987; Tiwary y Li, 2009).

2.3.2. Estrógenos

Los estrógenos son moléculas de 18 átomos de carbono (C_{18}) que derivan del colesterol. Existen tres tipos de estrógenos naturales: el estradiol (E_2 ; Figura 12), la estrona (E_1 ; Figura 13) y el estriol (E_3) (Gruber *et al.*, 2002).

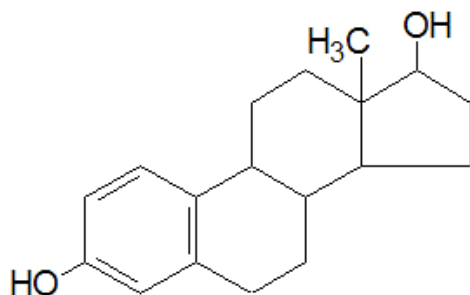


Figura 12: Molécula de estradiol.

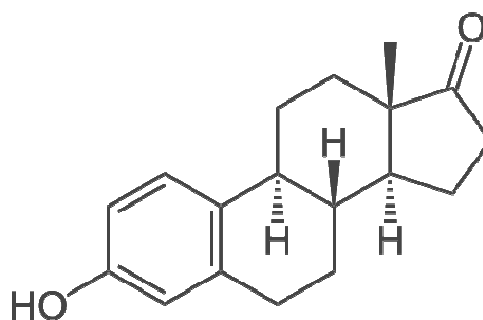


Figura 13: Molécula de estrona.

Los estrógenos se producen a partir de los andrógenos mediante la enzima CYP19 o aromatasa (Figura 11), cuya síntesis es estimulada por la FSH de la hipófisis (Norris, 2007). Por tanto, el encargado de metabolizar los andrógenos a estrógenos es el complejo enzimático citocromo P450 aromatasa, presente en el retículo endoplasmático, que cataliza la conversión de la testosterona en estradiol-17 β y la androstenediona en estrona (Gruber *et al.*, 2002; Moyes y Schulte, 2007). A pesar de ser conocidos como la "hormona femenina", se encuentra en los dos sexos (Hess *et al.*, 1997), habiéndose detectado actividad aromatasa en el músculo, en la grasa, en el tejido nervioso, y en las células de Leydig de los testículos (Gruber *et al.*, 2002).

También en el caso de los estrógenos, las respuestas celulares clásicas son mediadas a través de receptores nucleares de estrógenos (RE), que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando (Hess *et al.*, 1997). Cuando los estrógenos libres difunden en la célula, se unen al dominio del ligando del receptor, que se disocia de sus chaperonas citoplásmicas formando el complejo receptor-estrógeno que difunde al núcleo de la célula. Los complejos receptor-estrógeno, no solo se unen a los elementos de respuesta, sino también a los coactivadores o represores nucleares, aunque no se conoce exactamente el mecanismo de translocación nuclear de dichos complejos (Gruber *et al.*, 2002).

Existen dos tipos principales de RE que varían en estructura, y sus genes codificantes están en cromosomas diferentes: el receptor de estrógenos alfa (RE α) y el receptor de estrógenos beta (RE β), aunque se han investigado otro tipo de receptores acoplados a proteínas G (Choleris *et al.*, 2009; Gabor *et al.*, 2012). La distribución de ambos receptores de estrógenos, difiere en los tejidos, aunque existe cierto solapamiento. Las células de la granulosa y las espermatidas en desarrollo, contienen principalmente RE β , además, están presentes en otros tejidos, incluyendo riñón, mucosa intestinal, parénquima pulmonar, médula ósea, hueso, cerebro, células endoteliales y próstata. Por el contrario, el endometrio y el estroma ovárico contienen en su mayoría RE α (Gruber *et al.*, 2002).

Varios compuestos de plantas tienen similitudes estructurales y funcionales a los estrógenos y por tanto, se conocen como fitoestrógenos. El coumestrol, la genisteína y la daidzeína son algunos de los fitoestrógenos que se encuentran típicamente en la soja. (Gruber *et al.*, 2002). El 17 α -estradiol y la estrona (biológicamente débil), tienen una mayor afinidad por los RE α , habiendo por lo menos dos fitoestrógenos, la genisteína y coumestrol, que se unen con mayor afinidad a dichos receptores (Tubbs *et al.*, 2012) mientras que varios

contaminantes ambientales, tales como los alquilfenoles, tienen una mayor afinidad por los RE β (Gruber *et al.*, 2002). En el caso de los rinocerontes, se ha visto que el coumestrol y la daidzeína que ingieren en la dieta, se unen con mucha afinidad a los receptores de estrógenos produciendo su activación, lo que supone un riesgo en la salud reproductora de estos animales (Tubbs *et al.*, 2012).

Los estrógenos son clave en la regulación y la síntesis de hormonas hipofisarias implicadas en la reproducción, como la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la prolactina, ejerciendo sus efectos biológicos mediante su unión a los dos tipos de RE que se encuentran en la hipófisis (Sánchez-Criado *et al.*, 2004). En machos, induce la formación del hipotálamo además de estimular el comportamiento sexual (Norris, 2007).

Los factores que regulan la producción de estrógenos durante el período reproductivo, son controlados por las gonadotropinas. Durante los ciclos estrales, la producción de estradiol varía cíclicamente, encontrando concentraciones plasmáticas bajas justo antes de la ovulación y altas en la fase preovulatoria, con un pico preovulatorio estimulado por LH y FSH. Este aumento de estradiol, también es responsable del comportamiento reproductivo en la hembra (Gruber *et al.*, 2002).

La ovulación, es el resultado de un aumento progresivo en los niveles circulantes de estradiol, que ocurre con el crecimiento de los folículos. En la mayoría de los casos, un nivel alto de estrógenos en sangre, activa el hipotálamo, el cual, libera un pulso largo de GnRH, provocando a su vez un pulso de LH y FSH, desencadenando la ruptura de uno o varios folículos maduros, dependiendo de la especie. El proceso de la ovulación implica la ruptura del folículo maduro y la liberación del oocito, marcando el final de la fase folicular y el principio de la fase lútea en el ovario (Norris, 2007).

Los genes responsables de la producción de la hormona estimulante del folículo, gobiernan la expresión de las enzimas esteroideogénicas. En los tejidos periféricos, la producción de los diferentes estrógenos y su interconversión depende de la expresión local y la actividad de la aromatasa, la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, y las sulfatasas de estrona (Gruber *et al.*, 2002).

En el plasma, el estradiol se une reversiblemente a las globulinas de unión a hormonas sexuales, a las β -globulinas, y con menor afinidad a la albúmina quedando libre tan solo un 2-3% aproximadamente. Los estrógenos son metabolizados por sulfatación o glucuronización y los conjugados se excretan por la bilis o la orina. La hidrólisis de estos conjugados por la flora intestinal y la posterior reabsorción de estrógenos, resultan en una circulación enterohepática (Gruber *et al.*, 2002).

Distintas vías metabólicas, tales como i) la oxidación de los estrógenos a los catecol estrógenos y la relación con sus respectivas quinonas, y ii) la generación de radicales libres por el ciclo redox entre los catecol estrógenos o dietilestilbestrol y sus quinonas, son investigados por su influencia en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Parece que las reacciones redox involucradas en el ciclo de los estrógenos son carcinogénicas (Liehr *et al.*, 1986; Liehr y Roy, 1990; Gruber *et al.*, 2002).

Los estrógenos lipoides son ésteres grasos de los estrógenos que comprenden una clase separada de las hormonas esteroides, encontrándose predominantemente en el tejido adiposo. Se sintetizan en la sangre y se unen a las lipoproteínas. En general, menos del 10% del estradiol en suero se une a lipoproteínas, principalmente lipoproteínas de alta densidad (HDL), pero puede ser transferido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) por un mecanismo transportador aún desconocido. Los estrógenos lipoides son más resistentes al catabolismo que los estrógenos libres y por lo tanto se eliminan lentamente, pudiendo servir como una reserva potencial de esteroides (Gruber *et al.*, 2002).

◆ Otras funciones de los estrógenos:

- Estrógenos como el estradiol, estimulan la proliferación y vascularización de la mucosa uterina y el endometrio. Son capaces de estimular la queratinización de las células epidérmicas, produciendo fibras de proteínas de queratina que forman la estructura principal de pelo y piel (Norris, 2007).
- Estimulan el crecimiento, el flujo sanguíneo, y la retención de agua en los órganos sexuales. En el hígado, los estrógenos aumentan el número de receptores de lipoproteínas, resultando en una disminución de las concentraciones séricas del colesterol LDL (Gruber *et al.*, 2002).

- Se cree que a la larga, tienen una acción neuroprotectora. En el tejido cerebral de ratas adultas, se ha visto que inducen la remodelación sináptica y dendrítica y producen la activación glial. En las neuronas del hipocampo, en un área implicada en la memoria, aumentan la densidad de N-metil-D-aspartato y la sensibilidad neuronal. Determinados mecanismos parecen facilitar procesos de memoria (Foy *et al.*, 2004). Los estrógenos resultan importantes en la supervivencia de neuronas expuestas a diversos tipos de daños, incluyendo el estrés oxidativo, la isquemia, y diversos tipos de enfermedades neurodegenerativas. Además, los estrógenos son factores neurotróficos en el desarrollo y la diferenciación cerebral, pudiendo modular los neurotransmisores y la función sináptica y adquiriendo un papel en la transmisión "feed-back" a las neuronas de GnRH en el hipotálamo, controlando además la producción y secreción de prolactina a nivel de la hipófisis (Edwards, 2005).
- El sistema cardiovascular es un importante tejido efector de los estrógenos. Tanto las células endoteliales, como las células musculares lisas vasculares expresan RE α y RE β . Se cree que son agentes naturales vasoprotectores. Los estrógenos producen vasodilatación a corto plazo y reducen el tono vascular muscular mediante la apertura de canales específicos de calcio a través de un mecanismo dependiente de monofosfato de guanosina. A nivel celular, los estrógenos inhiben la apoptosis de las células endoteliales y promueven su actividad angiogénica *in vitro* (Gruber *et al.*, 2002).
- Ejercen un efecto directo en el mantenimiento de la masa ósea mediante la estimulación de la apoptosis de los osteoclastos e inhibiendo su acción (Manolagas *et al.*, 2002; Edwards, 2005).
- El páncreas endocrino es un tejido sensible a estrógenos. En concreto, el estradiol-17 β a determinadas concentraciones, ha sido probado como modulador en la secreción de insulina y glucagón mediante la variación de la concentración de la glucosa intracelular a través de oscilaciones de Ca²⁺ (Nadal *et al.*, 2004; Edwards, 2005).
- Los estrógenos y sus receptores, parecen tener un efecto de reconocimiento social entre individuos, marcado principalmente por los ciclos estrales de las hembras (Gabor *et al.*, 2012).

2.3.3. Progestágenos

Los progestágenos son estructuralmente diferentes a los andrógenos y estrógenos, poseen 21 átomos de carbono (C₂₁) y ejercen sus efectos principales sobre el sistema reproductor femenino (Moyes y Schulte, 2007). La progesterona (Figura 14), como el resto de hormonas esteroides, toma el colesterol como sustrato y se forma a partir de la molécula de pregnenolona.

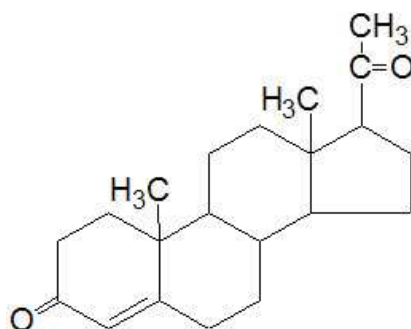


Figura 14: Molécula de progesterona.

En la mayoría de los vertebrados, encontramos dos tipos de receptores de progesterona: RP-A y RP-B. Aunque ambos receptores son prácticamente indistinguibles en cuanto a su actividad esteroide, presentan distinta actividad transcripcional. En muchos contextos, los RP-B son fuertes activadores de la transcripción génica, mientras que los RP-A pueden actuar como represores (ligando dependientes) de los RP-B y de otros receptores de esteroides, incluyendo los receptores de estrógenos (Edwards, 2005). De esta forma, la progesterona regula el comportamiento sexual femenino mediante la activación directa o indirecta de sus receptores (Guerra-Araiza *et al.*, 2009).

Los progestágenos tales como la pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona, son producidos por todos los tejidos esteroideogénicos como intermediarios en la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroides, sintetizándose principalmente en la corteza adrenal, en los testículos y en los ovarios y en el tejido adiposo de las hembras (De Geyter *et al.*, 2002; Norris, 2007). Es por esto, que las concentraciones que presentan tanto los machos como las hembras, no difieren significativamente entre ellos (Morden *et al.*, 2011). La progesterona además, inhibe la liberación de gonadotropinas de la adenohipófisis. Su papel como hormona reproductiva en mamíferos, está bien establecido (Norris, 2007).

El efecto fisiológico más importante de la progesterona, pudiera ser su capacidad de inducir la maduración de las células germinales. Esta acción de la progesterona se produce en ausencia de transcripción de genes, basándose en las acciones no genómicas de los esteroides, añadiendo el hecho de que es capaz de inducir la maduración en oocitos enucleados (Ferrell, 1999; Edwards, 2005).

Como hemos comentado anteriormente, la ovulación marca el comienzo de la fase lútea del ciclo ovárico, así como el final de la fase folicular. De esta forma, el pico de LH que se produce en la ovulación, induce a las células de la granulosa y algunas células de la teca interna a diferenciarse en cuerpo lúteo, el cual, funciona como una glándula endocrina secretando estrógenos y progesterona (Norris, 2007). Las células de la granulosa del ovario, sintetizan y secretan progesterona teniendo ellas mismas receptores de progesterona que se expresan en células de la granulosa de forma regular por el efecto de la LH durante la etapa preovulatoria (Stouffer, 2003).

En la mayoría de las especies, la condición secretora del cuerpo lúteo dura poco tiempo, después del cual, empieza a degenerar. A medida que el cuerpo lúteo continúa diferenciándose, aumenta la síntesis y secreción de progesterona y estrógenos. El aumento de progesterona induce cambios en la hembra que preparan al sistema reproductor para una posible gestación, en la cual, el cuerpo lúteo secreta grandes cantidades de progesterona y estrógenos en menor proporción. Estos niveles circulantes de progesterona durante la fase lútea, suprimen la liberación de GnRH del hipotálamo, evitando un desarrollo folicular adicional y previniendo así, un segundo episodio ovulatorio (Moyes y Schulte, 2007; Norris, 2007). La progesterona tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la quiescencia del útero durante la gestación, por lo que se encuentra en concentraciones muy elevadas, disminuyendo la sensibilidad del útero a la oxitocina, que estimula su contracción (Stouffer, 2003; Jenkin y Young, 2004; Edwards, 2005). Si el oocito no está fertilizado, el cuerpo lúteo comienza a degradarse, la esteroidogénesis disminuye y el útero comienza una fase regresiva. La degeneración del cuerpo lúteo, libera a la GnRH hipotálica de la inhibición producida por la progesterona y los estrógenos, con la consecuente reiniciación del desarrollo folicular (Moyes y Schulte, 2007; Norris, 2007).

◆ **Otras funciones de los progestágenos:**

- La progesterona tiene importantes acciones biológicas en el sistema nervioso central (SNC), incluyendo la conducta sexual femenina, la liberación de la LH (hormona luteinizante) del hipotálamo, requerida para la ovulación y con actividad protectora frente a convulsiones, además de ser potente anestésico y analgésico. Sus efectos neuroprotectores se deben principalmente a sus metabolitos reducidos como el 5 α pregnano-3 α -ol-20-ona (alopregnanolona). Las células del SNC pueden sintetizar alopregnanolona y otros metabolitos reducidos de la progesterona, que conduce al término de "neuroesteroides" que actúan localmente en el cerebro de manera paracrina (Reddy *et al.*, 2004; Edwards, 2005; Pinna *et al.*, 2008). Puesto que la alopregnanolona es un potente modulador alostérico de la acción del GABA mediante los receptores GABA, mejorando la respuesta de dichos receptores al GABA se podría mejorar la agresividad impulsiva, la irritabilidad, la ansiedad y la depresión (Pinna *et al.*, 2008).

2.3.4. Factores que estimulan la liberación de hormonas sexuales

Los niveles de hormonas sexuales no son constantes y varían según diversos factores:

➤ **Factores fisiológicos:**

- **Ritmos biológicos:** la liberación de hormonas ocurre a menudo de forma explosiva y no tanto de forma continua y constante, mediante patrones cíclicos diurnos, mensuales, o estacionales, que de forma general se denominan ritmos biológicos. Por ejemplo, en humanos, el pico máximo de testosterona ocurre entre las 2 y las 6 de la mañana (Norris, 2007) así como en las hembras, la fluctuación de los niveles de estradiol y progesterona ocurre con bastante regularidad (Gruber *et al.*, 2002; Stouffer, 2003). No sólo varían los niveles hormonales, sino que también las células efectoras pueden presentar distinta sensibilidad y fluctuar según patrones diarios o estacionales (Norris y Lopez, 2011).

- **Estación del año:** se ha visto que la concentración de progestágenos, estrógenos y andrógenos varía de forma estacional en algunas especies (Aguirre *et al.*, 2007; Abáigar *et al.*, 2010). Aunque los rinocerontes no son considerados como reproductores estacionales estrictos, se ha observado una tendencia a la existencia de periodos más fértiles, que suelen coincidir con el final de verano o inicio de la estación seca, de forma que la cría nace durante la estación lluviosa que es cuando las condiciones son más óptimas para su supervivencia (Garnier *et al.*, 2002).

- **Especie animal y variaciones individuales:** el nivel basal de las hormonas sexuales varía dependiendo de la especie, la raza e incluso el propio individuo, lo que se debe tener en cuenta a la hora de realizar su valoración (Norris y Lopez, 2011).

- **Estado fisiológico del animal:** ya hemos comentado el importante papel y la variabilidad en la concentración de las hormonas sexuales durante los ciclos estrales y la gestación. Por ejemplo, durante la gestación los progestágenos se encuentran en concentraciones muy elevadas, así como el resto de hormonas sexuales también varían en función de la fase del ciclo en que se encuentran (Stouffer, 2003; Edwards, 2005; Norris, 2007).

- **Alimentación:** hay autores que han observado que la alimentación influye en la concentración de determinadas hormonas. Tal es el caso de los fitoestrógenos exógenos (comentados con anterioridad) que pueden ser introducidos mediante la dieta pudiendo afectar a la salud reproductora de los rinocerontes (Tubbs *et al.*, 2012). Además, la falta de alimento, es conocida como uno de los factores estresantes más típicos que afectan a la reproducción de especies en libertad (Norris y Lopez, 2011).

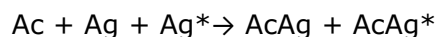
- **Interacciones:** con otros animales, con el medio ambiente y con el hombre. Al igual que se citaba en los glucocorticoides, todas estas interacciones también varían la concentración de las hormonas sexuales, principalmente la de los andrógenos y en concreto, la de la testosterona (Wingfield *et al.*, 2001; Beehner *et al.*, 2006; Booth *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2009).

3. MÉTODOS NO INVASIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

El avance más importante del mundo de la endocrinología se produjo con la aparición de las técnicas inmunológicas de análisis hormonal. Los primeros estudios sobre técnicas inmunológicas, utilizaban isótopos radiactivos como marcadores para cuantificar la concentración de la hormona a analizar. En las últimas décadas, se han desarrollado mucho las técnicas inmunológicas, existiendo numerosos métodos que siguen el mismo principio, pero con diferentes marcadores de la reacción: enzimáticos, fluorescentes, quimioluminescentes, etc. (Chacón, 2004; Lequin, 2005).

En general, los métodos inmunológicos tienen unas características de especificidad y sensibilidad que los hace idóneos para la cuantificación de hormonas (Ekins, 1987).

El principio de estas técnicas es la reacción irreversible entre la sustancia antigénica a evaluar y su correspondiente anticuerpo lo que va a dar lugar a la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Silván, 1991). En el ensayo, una cantidad fija de anticuerpo (Ac) se hace reaccionar con antígeno marcado (Ag*) y sin marcar (Ag) los cuales compiten por unirse al Ac.



Después de un periodo de incubación, se separa la fracción de antígeno unido al anticuerpo de la fracción libre y se mide la cantidad de antígeno marcado, que será inversamente proporcional a la cantidad de hormona sin marcar que exista en la muestra (Maggio, 1987).

◇ Clasificación de los métodos inmunológicos de determinación hormonal

Los métodos inmunológicos de determinación hormonal, pueden clasificarse en dos tipos, en función de si la reacción Ag-Ac es competitiva o no lo es:

- **Técnicas competitivas:** comprenden la mayoría de los métodos y siguen el esquema de competición anteriormente explicado, en el cual, el antígeno marcado compite con el antígeno presente en la muestra, por unirse al anticuerpo (Bertholf y Bowman, 1996; Slage y Ghosn, 1996).

- **Técnicas no competitivas:** son técnicas que no se basan en una reacción de competición ya que el anticuerpo se encuentra en exceso y el antígeno no debe competir para unirse a él (Bertholf y Bowman, 1996; Slage y Ghosn, 1996). Existen diversos diseños: un exceso de Ac y la adición de las fracciones de antígeno marcado y sin marcar en distintas etapas; adición en primer lugar del antígeno presente en la muestra y posteriormente adición del anticuerpo marcado específico frente al antígeno que ha reaccionado o frente al anticuerpo libre.

La diferencia principal entre ambos tipos de ensayos son las condiciones necesarias para obtener la máxima sensibilidad. En las técnicas competitivas la concentración de Ac debe tender a cero y en las no competitivas el Ac debe tender a infinito. La sensibilidad en las técnicas competitivas depende fundamentalmente de la afinidad del anticuerpo por la sustancia a analizar mientras que en las técnicas no competitivas, al encontrarse el Ac en exceso, la sensibilidad depende de la especificidad del marcador (disminuyendo al mínimo las uniones inespecíficas).

Algunos autores afirman que al utilizar el anticuerpo en exceso son más sensibles que las técnicas competitivas (Ekins, 1987; Slage y Ghosn, 1996). En primer lugar porque se ven menos influenciadas por sustancias o condiciones que afecten a la cinética de la reacción del antígeno con el anticuerpo. Por otro lado son menos sensibles a errores de pipeteo, aumentando la precisión de la técnica. Sin embargo, las técnicas no competitivas, también tienen desventajas: necesitan gran cantidad de anticuerpo específico purificado (Slage y Ghosn, 1996), aumentando notablemente los costes de la técnica; A pesar de que la reacción Ag-Ac se produce más rápidamente que en las técnicas competitivas, al realizarse el ensayo en más pasos, resulta más laborioso y lento (Bertholf y Bowman, 1996); además, los ensayos en los que el antígeno se debe unir a dos moléculas de anticuerpo están limitados por el tamaño de la molécula de antígeno (Ekins, 1987; Slage y Ghosn, 1996).

Las técnicas inmunológicas se pueden clasificar también, en función de la naturaleza de los marcadores utilizados. Existen numerosas técnicas con diferentes marcadores, entre las cuales, cabe destacar:

- Técnicas de radioinmunoanálisis o RIA (*Radioimmunoassay*): utilizan isótopos radiactivos como marcadores.
- Técnicas de enzimoimmunoanálisis o EIA (*Enzyme immunoassay*): el marcador es una enzima. Para cuantificar la unión del antígeno con el anticuerpo utilizan la capacidad de las enzimas de transformar un sustrato.
- Técnicas de fluoroinmunoanálisis o FIA (*Fluorescence immunoassay*): técnicas cuyos marcadores son grupos fluorescentes.
- Técnicas de quimioluminiscencia o CIA (*Chemiluminescence immunoassay*): utilizan sustancias capaces de emitir luz bajo una reacción química de oxidación.

3.1. Enzimoimmunoanálisis (EIA)

Como hemos indicado anteriormente, en esta técnica se utilizan enzimas para marcar tanto el antígeno como el anticuerpo, siendo las más ampliamente utilizadas, dentro de las que no usan isótopos radiactivos (Joyce *et al.*, 1977; Munro y Stabenfeldt, 1984; Joshi, 1985).

La actividad de la enzima sobre el sustrato apropiado produce una señal que se mide mediante cromatografía, fluorescencia, quimioluminiscencia o por medio de los cambios de pH o conductividad (Munro y Lasley, 1988).

De los métodos que realizan la separación de fases, los más utilizados son los ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), que utilizan una fase sólida a la que se une el Ac o el Ag. Existen además muchos tipos de ELISA competitivos, dentro de los cuales destacamos el propuesto por Munro y Stabenfeldt (1985) para la determinación de cortisol:

- Dichos autores proponen unir el Ac específico anticortisol a la fase sólida (microplaca). Después de la incubación y del lavado se añade el cortisol a determinar (muestra) junto al conjugado cortisol-enzima marcadora. Éstos competirán por unirse al anticuerpo. Después de un periodo de incubación, se separa la fracción de antígeno unido al anticuerpo de la fracción libre y se mide la cantidad de antígeno marcado, mediante la lectura fotométrica de la densidad óptica, que será inversamente proporcional a la cantidad de cortisol (hormona sin marcar) que exista en la muestra (Imagen 1).

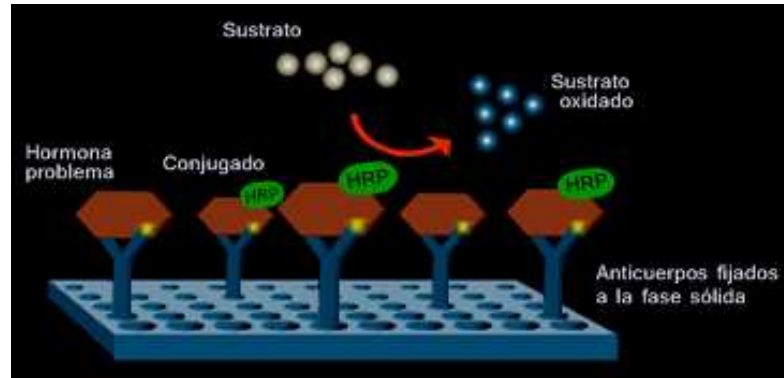


Imagen 1: Esquema de la técnica EIA de competición.

En general, son muchos los autores que reconocen que los métodos de EIA reúnen una serie de características que permiten superar muchos de los inconvenientes propios de otros métodos, como los RIA (Silván, 1991; Bertholf y Bowman, 1996):

- Las enzimas siguen procesos bioquímicos muy eficaces, pequeñas concentraciones de enzima hidrolizan una gran cantidad de sustrato, gracias a lo cual, la señal se ve amplificada, incrementando la sensibilidad del método. Algunos autores, además, mejoran los ensayos añadiendo un complejo biotina-avidina, que incrementa la sensibilidad de la técnica (Shamsuddin y Harris, 1983).
- Elevada especificidad.
- Métodos sencillos, rápidos de realizar, con una buena repetibilidad y una evaluación objetiva, por lo cual, se pueden llevar a cabo sin necesidad de personal altamente cualificado.
- La medida de actividad enzimática se realiza mediante un proceso sencillo, por lo que se puede adaptar fácilmente a analizadores químicos automatizados.
- Se mejora la eficiencia, ya que el tiempo necesario para las incubaciones y lavados es menor que el requerido por ejemplo en los RIA.
- La vida media de los reactivos es mayor que en los RIA.
- Se reducen los costes ya que tanto los reactivos como el material y equipamiento necesarios son más baratos.

- El manejo de los reactivos no supone peligro alguno para la salud y la eliminación de los residuos no obliga a tomar precauciones especiales.
- Se pueden obtener resultados orientativos visualmente, lo que permite su utilización en pruebas de campo.

A pesar de las ventajas, algunos autores como Yalow (1978) señalan ciertas desventajas:

- Los marcadores enzimáticos son técnicamente más difíciles de separar.
- La presencia de enzimas supone un impedimento estérico que disminuye la sensibilidad de la técnica.

El desarrollo de una técnica de EIA requiere distintos pasos, que esquemáticamente serían los siguientes (Silván, 1991):

1. Adhesión de los anticuerpos a la fase sólida (microplaca).
2. Incubación y lavado.
3. Adición del conjugado hormona-enzima, las muestras y los estándares para que tenga lugar la reacción de competición.
4. Incubación y lavado.
5. Adición del cromógeno que se une a la enzima produciéndose una reacción colorimétrica.
6. Frenado de la reacción colorimétrica.
7. Lectura espectrofotométrica.

3.1.1. Tipos de muestras biológicas para la determinación hormonal

En la realización de un análisis hormonal, existen diversas muestras biológicas que pueden ser utilizadas de forma no invasiva para el animal, como por ejemplo, la saliva, la orina y las heces (Munro *et al.*, 1991; Morrow *et al.*, 2000; Bayazit, 2009; Brown *et al.*, 2010). La extracción de saliva, por ejemplo, es un método poco cruento para el animal, y permite analizar cortisol libre sin metabolizar o diversos metabolitos de las hormonas sexuales (Gómez *et al.*, 2004; Menargues *et al.*,

2006). Sin embargo, requiere de cierto entrenamiento del animal y no es factible usarlo en poblaciones de animales salvajes en libertad. La recolección de orina es otra opción viable, pero de nuevo, su recogida en hábitats naturales se hace muy complicada. Las muestras fecales son las que están cobrando cada día más importancia, para la determinación de los metabolitos de diferentes hormonas, por su facilidad de recogida y utilidad para el manejo de poblaciones de animales salvajes (Foley *et al.*, 2001; Flauger *et al.*, 2010).

◇ **Obtención de muestras fecales**

La toma de muestras no requiere ningún manejo estresante del animal pues lo normal es recoger las heces en el momento de la defecación, del suelo del recinto de los animales en cautividad o del hábitat de los animales salvajes. Sin embargo, el tiempo transcurrido entre la deposición y el procesado de la muestra es importante, por lo que es esencial seguir un óptimo protocolo de recogida, almacenamiento y extracción de las muestras (Monfort, 2003; Buchanan y Goldsmith, 2004; Abáigar *et al.*, 2010). Así, por ejemplo, Masunda y colaboradores (1999) observaron que la cantidad de metabolitos de progesterona en heces, decrecía exponencialmente al aumentar el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente y lo atribuyeron a posibles fluctuaciones de temperatura, que podían haber influido en la tasa de degradación de la progesterona. Debido a que la flora fecal contiene una enzima con actividad desmolasa capaz de escindir las cadenas laterales de los esteroides de 21 carbonos, algunos autores recomiendan congelar la muestra tan pronto es recogida (Hulsman *et al.*, 2011) y otros, apoyan que dicho efecto se puede evitar con el calentamiento de las muestras a 95°C (Möstl *et al.*, 1999; Morrow *et al.*, 2002). Sin embargo, otros autores, consideran que las muestras fecales de animales salvajes pueden recogerse incluso hasta tres días más tarde de la deposición, teniendo en cuenta periodos de lluvias que puedan ejercer un efecto de "lavado" en la muestra, afectando por tanto, a las concentraciones hormonales de la muestra (Rehnus *et al.*, 2009; Abáigar *et al.*, 2010). Para el caso concreto de las heces de rinoceronte, se ha visto que la concentración de progesterona aumenta tras 24 y 48 horas a temperatura ambiente, comparado con la concentración que presentan las heces congeladas, que se mantiene estable durante largos periodos de tiempo (Neumann *et al.*, 2002).

3.1.2. Validación

En las técnicas inmunológicas la mayoría de los autores utilizan varios parámetros a la hora de su validación (Silván, 1991; Chacón, 2004): sensibilidad; especificidad; precisión, reproducción y errores; exactitud; paralelismo y linealidad. Gracias a la validación se puede asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos con dicha técnica.

◇ **Sensibilidad**

La definición de sensibilidad más extendida actualmente es equiparable al límite de detección (Kanarek, 2005). Es decir, la cantidad mínima de la sustancia a analizar (antígeno o anticuerpo) que da respuesta medible y distinguible en ausencia de dicha sustancia (Schuurs y Van Weemen, 1977) o, la concentración mínima de la sustancia a analizar que el procedimiento analítico es capaz de diferenciar con certeza del "ruido de fondo" o uniones inespecíficas (Bergmeyer, 1983; Kanarek, 2005). Se calcula como la media de la concentración de hormona que corresponde a la máxima unión (B_0), menos dos desviaciones estándar (DE) de la media de ocho ensayos consecutivos (Abraham, 1975).

$$S = B_0 - 2x DE$$

Sin embargo, la sensibilidad (S) también se puede considerar como la concentración de hormona a determinar que produce el 50% de la unión máxima de hormona marcada al anticuerpo. La absorbancia que corresponde a la máxima unión del Ac y la hormona marcada se llama B_0 y se produce en ausencia de hormona en la muestra. Para poder expresar la sensibilidad de forma numérica, se calcula la concentración de hormona en la muestra que produce el 50% de la unión máxima ($B_0/2$) (Schuurs y Van Weemen, 1977).

$$S = B_0/2$$

La sensibilidad de un método enzimático depende de numerosos factores (Van Weemen y Schuurs, 1971):

- Lo que más influye es la afinidad del Ac por el Ag, por ello es muy importante la calidad del Ac utilizado. Diferencias en la afinidad del Ac por el Ag y por el Ag marcado suponen un efecto negativo sobre la detectabilidad de la técnica.

- Las condiciones y el manejo de la técnica utilizada es primordial en la sensibilidad obtenida: tipo de ensayo, tipo de muestra, dilución de la muestra para evitar interferencias, concentración de reactivos, el orden en que reactivos y muestras se añaden para que reaccionen entre sí, periodos de incubación, temperatura de incubación, método utilizado para separar la fracción libre de la que ha reaccionado.

En general, la sensibilidad y la especificidad que se pueden alcanzar con los métodos inmunológicos son muy buenas. La sensibilidad se sitúa dentro del rango de femtomoles (10^{-15}), lo que los hace idóneos para la cuantificación de hormonas esteroides, ya que como el resto de hormonas, se encuentran en concentraciones muy pequeñas en los fluidos biológicos. Por su parte, la especificidad también es elevada, lo que permite una buena discriminación entre distintos esteroides, lo cual es muy importante en estos compuestos debido a que tienen una estructura muy similar (Ekins, 1987).

Las técnicas de inmunoanálisis tienen un buen límite de sensibilidad, que varía según la técnica utilizada, el tipo de muestra y la hormona analizada (Tabla 2).

Autor y año	Sensibilidad	Hormona	Tipo muestra
Munro y Stabenfeldt, 1984	0,25pg/pocillo	Progesterona	Plasma
Munro y Stabenfeldt, 1985	0,15pg/ml	Cortisol	Plasma
Palme y Möstl, 1997	0,8pg/pocillo	Cortisol	Heces
Morrow <i>et al.</i> , 2000	5pg/pocillo	Cortisol	Orina
Graham <i>et al.</i> , 2001	15pg/pocillo	Progesterona	Heces
Morrow <i>et al.</i> , 2002	0,8 pg/pocillo	Cortisol	Heces
Pelletier <i>et al.</i> , 2003	0,05 ng/ml	Testosterona	Heces
Kretzschmar <i>et al.</i> , 2004	0,4 pg/pocillo	Testosterona	Plasma
Barja <i>et al.</i> , 2008b	4,9 pg/pocillo	Testosterona	Heces
Barja <i>et al.</i> , 2008b	2,5 pg/pocillo	Progesterona	Heces
Barja <i>et al.</i> , 2008b	0,3 pg/pocillo	Estradiol	Heces
Christensen <i>et al.</i> , 2009	0,19pg/ml	Cortisol	Suero
Ganswindt <i>et al.</i> , 2010	3 pg/pocillo	Glucocorticoides	Heces
Metrione y Harder, 2011	31,2 ng/g	Corticosterona	Heces
Barrette <i>et al.</i> , 2012	25ng/pocillo	Corticosterona	Heces

Tabla 2: Resumen de algunos ejemplos de límites de sensibilidad en la determinación hormonal en diferentes tipos de muestras biológicas.

◇ **Especificidad**

Se define especificidad de una técnica como la capacidad de discriminar entre sustancias con una composición química parecida (Kanarek, 2005). Depende de distintos factores, siendo de gran importancia la naturaleza y pureza del inmunógeno utilizado para la obtención del anticuerpo, ya que de ello dependerá la especificidad del anticuerpo. También influye la pureza de los reactivos utilizados, como el antígeno marcado (Schuurs y Van Weemen, 1977).

Se valora mediante pruebas de **reacciones cruzadas** entre la hormona a analizar, cortisol por ejemplo, y otras hormonas esteroides de estructura similar, prednisolona.

La reacción cruzada se define como la concentración de esteroide problema que causa una reducción del 50% de la unión inicial al Ac (Bo), dividida por la concentración del esteroide que presenta la reacción cruzada y que causa la misma reducción de la unión al Ac (50%) (Abraham, 1975) y se expresa en porcentaje (%).

$$RC = \frac{\text{Hormona problema 50\%}}{\text{Esteroides similar 50\%}} \times 100$$

◇ **Precisión**

La precisión de una técnica se puede definir como el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas repetidas procedentes de la misma muestra homogénea, en condiciones preestablecidas (Bergmeyer, 1983; Kanarek, 2005).

Se evalúa a través de la repetibilidad, que se calcula a partir de los coeficientes de variación (CV), expresados en porcentaje (%), obtenidos de dos formas (Bergmeyer, 1983; Chaloner-Larsson *et al.*, 1998):

- Precisión **intraensayo**: obtenida del análisis de varias réplicas consecutivas en un mismo ensayo.
- Precisión **interensayo**: la que se obtiene mediante el análisis de una misma muestra en distintos ensayos y/o durante días diferentes.

Generalmente para su estudio, se incluyen muestras con distintas concentraciones de la sustancia a analizar, obteniendo diferentes grados de precisión en función de que la concentración sea baja, media o alta.

En las técnicas de inmunoanálisis los coeficientes de variación no suelen ser superiores al 15%, siendo la variación interensayo generalmente mayor que la intraensayo. Para asegurar una buena precisión de los resultados obtenidos es recomendable que los coeficientes de variación se encuentren por debajo del 10%.

◇ **Exactitud**

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor real de la hormona y el valor medido (Chaloner-Larsson *et al.*, 1998; Derzko, 2005). Por tanto, dependerá de la especificidad inmunológica de la técnica, de la pureza de los reactivos, del correcto manejo de las muestras y de la utilización de estándares apropiados (Schuurs y Van Weemen, 1977).

Puede valorarse mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de concentraciones conocidas o por el coeficiente de correlación entre la técnica de inmunoanálisis:

- **Recuperación:** los estudios de recuperación se hacen añadiendo a muestras blancas concentraciones conocidas de hormona, calculando posteriormente el porcentaje de recuperación a partir de los valores observados y esperados en cada una de las muestras (Chaloner-Larsson *et al.*, 1998). Resultados entre un 85-115 % indicarían una buena recuperación.

$$\frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100$$

- **Correlación:** se evalúa a partir del coeficiente de correlación (R), cuyo valor oscila entre -1 y 1 (correlaciones negativas o positivas respectivamente), considerándose que un valor R igual o superior a 0,75 es una correlación de buena a excelente (Colton, 1979). Sin embargo, algunos autores calculan el coeficiente de regresión (R²), que tiene valores entre 0 y 1.

◇ **Paralelismo**

Consiste en comparar la curva estándar de la hormona a determinar con curvas estándar a las que se le añade muestra libre de esteroides (Illera *et al.*, 2003). La utilidad consiste en comprobar si los componentes de la muestra (saliva, heces, etc.) produce interferencia en el ensayo desplazando la curva estándar. Si se observara una pérdida de paralelismo, sería necesario extraer las muestras antes de analizarlas (Plikaytis *et al.*, 1994; Chacón, 2004).

◇ **Linealidad**

La linealidad mide el grado en que la respuesta analítica respecto a la concentración de la sustancia a determinar, se ajusta a una función lineal (Harris, 2007). O dicho de otra manera, es la capacidad de un ensayo de generar resultados directamente proporcionales a la concentración de la hormona en la muestra (Chaloner-Larsson *et al.*, 1998).

Una medida de linealidad superficial, pero frecuente, es el coeficiente de regresión (R^2) que es el coeficiente de correlación (R) al cuadrado, el cual debe ser lo más próximo posible al valor 1, que indicaría un buen ajuste lineal. También puede expresarse como la pendiente de la línea de regresión y su varianza (Chaloner-Larsson *et al.*, 1998; Harris, 2007).

La linealidad de la curva estándar afectará al rango de cuantificación de la hormona analizada y por tanto, a la fiabilidad del ensayo (Kanarek, 2005).

3.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En la búsqueda de técnicas para mejorar la habilidad de separar moléculas estrechamente relacionadas, se desarrolló un sofisticado sistema de separación, purificación y detección, conocido como cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (Rizzi, 1998). Esta técnica, consiste en la modificación de una columna cromatográfica que trabaja a altas presiones, para separar en base a las diferentes solubilidades que presentan las moléculas, en los solventes empleados en las columnas de lavado y su afinidad por las sustancias de las que están hechas las columnas (Berger y Nixon 2001; Norris, 2007).

Existen muchos métodos cromatográficos (de fase reversa, de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, de filtración en gel, de afinidad, etc.) y todos están basados en la afinidad de las sustancias a analizar por las diferentes fases: estacionaria (unión irreversible a un transportador) y la otra, móvil. A la columna se aplica una mezcla de moléculas en un solvente particular, el cual es recogido en alícuotas según va saliendo por el fondo, de forma que todas las moléculas de un mismo tipo deberán salir en la misma alícuota. La determinación de qué alícuota contiene un determinado tipo de molécula, dependerá de su afinidad por el tipo de columna frente a su afinidad por el tipo de solvente utilizado (Norris, 2007). A mayor afinidad que presenten las moléculas a una de esas fases, mayor tiempo permanecerá en ella, permitiendo la separación de mezclas complejas en compuestos individuales. El tiempo que permanece una sustancia en la columna es característico de esa sustancia, por eso, cada sustancia puede ser detectada y cuantificada, midiendo su tiempo de retención y evaluando sus características físico-químicas (Berger y Nixon 2001).

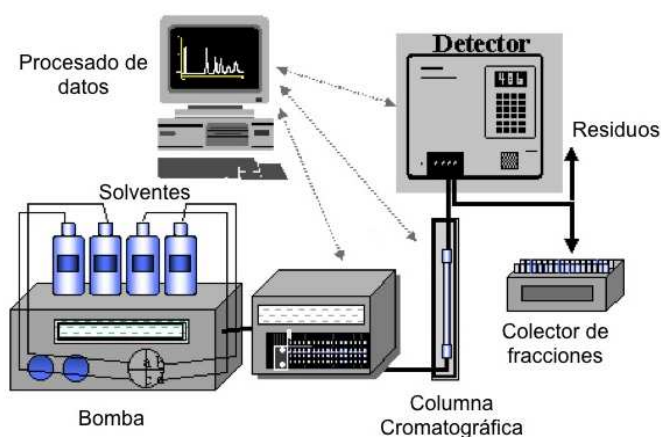
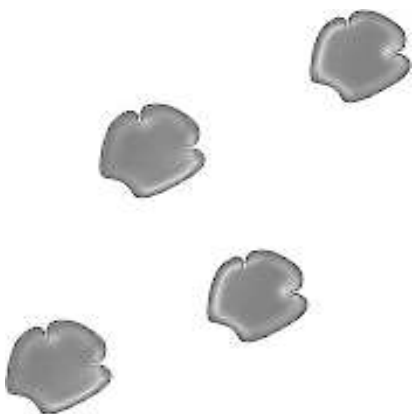


Imagen 2: Esquema básico del mecanismo típico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Esta técnica permite a los investigadores identificar y cuantificar moléculas individuales en diversas mezclas, lo que permite determinar cuantitativamente todos los esteroides y sus metabolitos en una misma muestra simultáneamente (Norris, 2007).



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

III. MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANIMALES Y HÁBITAT

Para la elaboración de este estudio de Tesis Doctoral hemos contado con un total de 15 ejemplares de rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) alojados en tres hábitats diferentes: 3 rinocerontes pertenecientes al Zoo de Madrid bajo condiciones de cautividad total; 4 rinocerontes en semi-cautividad pertenecientes al Bioparc de Valencia; y 8 rinocerontes en su hábitat natural (estudiados *in situ* en una reserva natural de Sudáfrica). De este modo, hemos podido realizar una amplia comparación de los distintos factores (ambientales, sociales, hormonales, reproductivos, etc.) que podrían estar afectando a dicha especie, en función de las condiciones del hábitat en que se encuentran.

En la clasificación de los distintos tipos de hábitat estudiados en este proyecto, se han valorado las distintas características de los recintos de día (lugar en que los animales pasan la mayor parte del tiempo) obviando los cobijos nocturnos (donde pasan la noche) pues son muy similares en condiciones de cautividad. Para dicha valoración, además de la observación de determinadas conductas (peleas, comportamiento reproductor, excitamiento, tranquilidad, etc.) se han tenido en cuenta las dimensiones del recinto, la vegetación (presencia/ausencia), la posibilidad de interacciones intra y/o interespecíficas, la alimentación y el manejo de los animales.

1.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo)

Hemos considerado como "cautividad total" o "completa" a aquel recinto en el que las condiciones del animal cubrían un espacio bastante reducido, sin contacto directo con otras especies animales, tan sólo, de haberla, con individuos de su misma especie. En nuestro estudio, dichas condiciones se asemejan notablemente a las existentes en el Parque Zoológico de Madrid, cuya colaboración ha sido indispensable para la realización de este trabajo.

Los tres rinocerontes blancos alojados en este Zoo, se dividen en una pareja reproductora y una "Hembra Vieja". Los rinocerontes se encuentran alojados en un espacio reducido, con escasa o nula vegetación y en ausencia de interacción con otras especies animales (Imagen 3).



Imagen 3: Recinto de día de la pareja reproductora de rinoceronte blanco del Zoológico de Madrid (Mayo 2010).

◇ **Marina:** hembra adulta de aproximadamente 15 años en la actualidad. En diciembre del 2007, cuando tenía unos 10 años, se le practicó una inseminación artificial (IA) que dio lugar, tras 16 meses de gestación, a una saludable cría en abril del 2009. Convive en el mismo recinto de día con su cría y el macho reproductor, y aunque suele ser tranquila, a veces se producen pequeños enfrentamientos entre ella y el macho, pues ha mostrado ser un poco dominante.



Marina, mayo 2010



Macho, mayo 2010

◇ **Macho:** Se introdujo en el parque en el año 1971, y aunque no se conoce con exactitud su edad, se calcula que pueda tener alrededor de 40 años. De carácter tranquilo y conducta poco territorial, es el único rinoceronte macho en todo el parque. Pasa el día con Marina y su cría, con escasos y leves enfrentamientos entre ellos.

◊ **Hembra Vieja:** es la hembra de rinoceronte de mayor edad del parque. Se introdujo el mismo año que el macho (1971) y a sus aproximadamente 40 años, se encuentra alojada en un recinto separado de la pareja reproductora pero manteniendo contacto visual y olfativo. Presenta una conducta bastante apática, a pesar de que se intenta enriquecer ambientalmente su recinto con distintos juguetes y troncos.



Hembra vieja, mayo 2010

1.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)

Para nuestro estudio, las condiciones de "semi-cautividad" o "cautividad parcial" representan aquellas que aún estando el animal bajo cuidado humano y en un recinto cerrado, se intentan reproducir, en la medida de lo posible, las condiciones que se dan en su entorno natural.

Estas características, se cumplen en el Bioparc de Valencia, donde los rinocerontes disponen de amplios recintos donde mantienen contacto intra e interespecífico con especies típicas de la sabana africana (cebras, diversos antílopes y distintos tipos de aves, entre otros). Además, el recinto posee mayores dimensiones que el Zoo de Madrid y la vegetación, entre otros enriquecimientos, es también similar a la encontrada en su hábitat natural (Imagen 4).



Imagen 4: Recinto de día los rinocerontes del Bioparc de Valencia (Octubre 2009).

Con la indispensable colaboración del Bioparc de Valencia, se estudiaron a sus 4 ejemplares de rinoceronte blanco:

♦ **Nombula:** hembra salvaje de unos 7 años de edad aproximadamente. Su característica más distinguible es la forma de la giba, más redondeada y grande que la de Maiai. Además su cuerno primario es más estrecho y el secundario más pequeño, respecto a los de su compañera. Parece actuar como la hembra "dominante" del grupo con el que convive en su recinto de día.



Nombula, octubre 2009



Maiai, octubre 2009

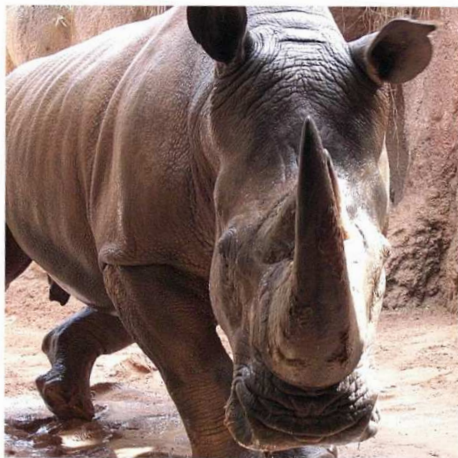
♦ **Maiai:** hembra salvaje de unos 6 años de edad. Comparte el cobijo nocturno con Nombula. Su giba parece estar dividida en dos, su cuerno primario tiene una base más ancha y su cuerno secundario está más desarrollado que el de Nombula.

♦ **Cirilo:** macho adulto reproductor, de unos 20 años de edad. Duerme en un cobijo separado, pero durante el día, convive con las dos hembras en el mismo recinto (además de con otras especies animales). Su cuerno es bastante ancho pero corto. Parece acatar las "órdenes" de Nombula con bastante tranquilidad.



Cirilo, octubre 2009

♦ **Rómulo:** macho adulto de unos 35 años de edad. Representa un claro ejemplo de comportamiento repetitivo o estereotipado. Proviene de un circo ruso en



Rómulo, octubre 2009

el que desarrolló una fuerte estereotipia que consiste en caminar persistentemente haciendo círculos. Desde su traslado al Bioparc y mediante distintas técnicas de enriquecimiento, se intenta conseguir que, al menos, durante algunos minutos al día, camine en línea recta descubriendo otros lugares del recinto. Debido a su manifiesta agresividad con los individuos de su especie, se mantiene en un recinto separado al resto, a una distancia muy corta del otro grupo, para poder mantener contacto visual y olfativo.

Gracias a diversos tipos de enriquecimiento, se ha conseguido que su estereotipia se suavice, actualmente formando un recorrido en forma de "ocho", con algunas líneas rectas, que le permiten investigar mejor otras zonas de su recinto. En este parque, es considerado como el macho "encelador", para activar los mecanismos reproductores de Cirilo mediante competencia reproductiva. Su enorme cuerno, es una de sus características más claras para su identificación.



1.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

Las condiciones más cercanas a un estado completamente salvaje y natural, las encontramos en una reserva privada de Sudáfrica, que con sus aproximadamente 10.000 hectáreas (100.000.000 m²) alberga multitud de especies tanto animales como vegetales y permite a los rinocerontes disponer libremente de su espacio y tiempo.

Gracias a la ayuda y colaboración de todo el equipo de la Reserva de Mabula (Mabula Private Game Reserve, Sudáfrica) hemos trabajado con 8 de sus 22 ejemplares de rinoceronte blanco salvajes. La selección de individuos se basó principalmente en la "facilidad" para encontrarlos e identificarlos, además de su edad y estado reproductivo para la correcta elaboración de este estudio. La identificación se centró esencialmente en características morfológicas individuales fácilmente reconocibles, como la forma y el tamaño de los cuernos, cantidad de pelo en orejas y cola, además de otras particularidades que se describen a continuación:

◇ **Cow TDI:** hembra de 13 años que camina junto a su cría (hembra de unos 3 años y medio). Reconocible por su enorme y característico cuerno primario, muy largo y afilado.



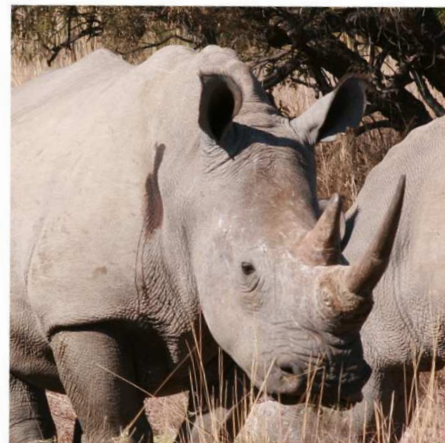
TDI: clips en orejas



TDI con cría, enero 2011

Presenta un clip sencillo en la base de su oreja derecha y otro en la zona superior de su oreja izquierda.

◇ **Rodgie:** hembra de 10 años. Camina junto a su cría (un macho de unos 5 años) y otros 2 machos (Bull 15.3.1 y Bull 17.4.1). Su rasgo más característico es su clip marcado en forma de "M" en la oreja izquierda. Además, su cuerno primario tiene una base ancha que rápidamente se estrecha, siendo su cuerno secundario también bastante estrecho.



Rodgie, junio 2010

♦ **Cow 7:** hembra de 30 años. Gran cuerno característico de forma curvada hacia abajo, casi paralelo al suelo, caminando siempre con sus crías, un macho de aproximadamente 5 años y una cría hembra de 18 meses. Falleció en Marzo del 2011, por causas naturales.

Siendo una de las hembras más prolíficas de la reserva, habiendo parido 7 crías hasta la fecha, su delicado estado físico y de salud estaba condicionando el desarrollo de su última cría. Durante los primeros meses de vida de la cría, en su etapa de amamantamiento, Cow 7 sufría



"Rabbit", junio 2010



Cow 7 con cría, junio 2010

una fuerte mastitis, que la obligaba a rechazar a su cría cuando ésta se acercaba a mamar. Debido a la carencia de leche materna, la cría comenzó muy pronto a alimentarse de hierbas y lo que encontraba a su paso por la reserva. Se encontraba en un lamentable estado de salud que se reflejaba tanto en su condición física como en su apático comportamiento.

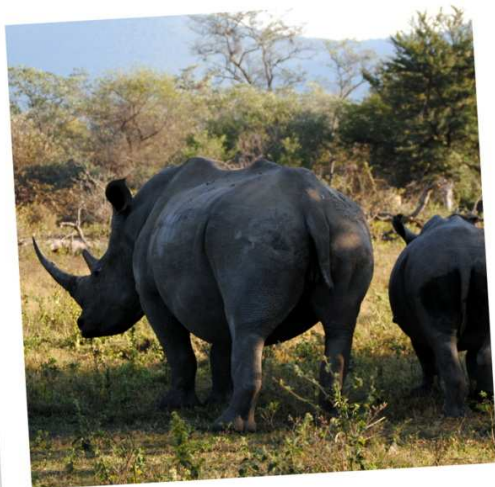
Previa revisión veterinaria y tras varios intentos de alimentación fallidos, la única solución factible que quedaba para mantenerla con vida y mejorar su salud era separarla de su madre para poder ser alimentada adecuadamente

con leche materna artificial. Dicha separación, habituó a la cría al cuidado humano y aunque permanece aislada en la reserva, actualmente está en trámites para ser vendida a otra reserva.



Cow 17, Julio 2010

♦ **Stompstert:** hembra de 21 años que camina junto a su cría (hembra de unos 18 meses de edad aproximadamente). Muy reconocible por que su rabo está "cortado" y por su clip sencillo en la base de la oreja izquierda.



Stompstert y cría, junio 2010

♦ **Cow 17:** hembra adulta de 30 años que camina junto a su cría (hembra de aproximadamente 5 años de edad). Perdió su cuerno tras una fuerte pelea, haciéndola fácilmente reconocible. Además, sus orejas presentan numerosos cortes. Tiene un carácter muy curioso y a veces poco amigable, escasas veces se encuentra caminando junto a más hembras.



Stompstert, junio 2010

Es una de las hembras más escurridizas y menos sociables, se hacía muy difícil encontrarla, lo que impedía enormemente una mínima pauta de recogida de muestras.

◇ **Bull 17.6:** único macho adulto reproductor y territorial de 9 años de edad. Camina solo la mayor parte del tiempo, marcando territorio a su paso según los diferentes estímulos que recibe. Se acerca a las hembras cuando percibe olfativamente el celo, pudiendo caminar junto a la misma hembra varios días seguidos. Además de ser fácilmente reconocible por su comportamiento, tiene un cuerno muy ancho y largo, además de unos clips en forma de "M" en la zona inferior de ambas orejas.



Bull 17.6, enero 2011



Bull 17.4.1, julio 2010

◇ **Bull 17.4.1:** macho de 7 años, que camina junto a Rodgie y su cría. Su cuerno secundario presenta un ligero y característico abultamiento. En las últimas etapas del estudio, empezó a caminar solo y a marcar territorio. Unos meses después de finalizar el estudio, fue vendido a otra reserva para evitar peleas con el otro macho e impedir más nacimientos en una reserva no lo suficientemente grande como para albergar a más de 22 rinocerontes en buenas condiciones.

◊ **Bull 15.3.1:** macho de 7 años que también camina junto a Rodgie y su cría. No suele separarse de este grupo y casi nunca se le ve caminando solo. Su cuerno primario es ligeramente estrecho y el secundario es redondeado, presentando un hundimiento longitudinal.



2. COMPORTAMIENTO

Para evaluar los comportamientos específicos de cada rinoceronte en su hábitat, se utilizaron unas tablas con los códigos básicos de las conductas observadas, ligeramente distintas según el hábitat de estudio.

Dichos comportamientos, fueron comparados con los niveles de las distintas hormonas analizadas en heces (glucocorticoides, andrógenos, progestágenos y estrógenos) teniendo en cuenta que en el rinoceronte existe un retraso de entre 24-48 horas hasta que se produce la excreción de los esteroides (Schwarzenberger *et al.*, 1996a).

2.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo)

En este hábitat, tan solo se apuntaron detalles básicos, como la duración del amamantamiento de la cría o alguna pelea puntual entre la pareja (Marina y el macho). Sin embargo, no disponemos de la información detallada diaria para cada uno de estos animales.

2.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)

En el Bioparc, se utiliza un código para la monitorización del comportamiento reproductor del rinoceronte, que el cuidador anota diariamente (Tabla 3):

CÓDIGO	ESTADO
1	NORMAL Y TRANQUILOS
2	NERVIOSOS
3	MUY NERVIOSOS Y EXCITADOS
4	SILBIDOS Y OTRAS VOCALIZACIONES
5	SECRECIÓN VAGINAL "ANÓMALA"
6	CAMBIO EN EL ASPECTO DE LA ORINA
7	HINCHAZÓN GENITAL

Tabla 3: Código para la monitorización del comportamiento reproductor del rinoceronte blanco (Bioparc).

Se realizó una adaptación de dicha tabla de comportamiento, en la que se eliminaron los códigos para el "cambio en el aspecto de la orina" e "hinchazón vaginal", pues en ningún caso aparecieron dichos códigos anotados por los cuidadores, además, se separaron los códigos según el sexo del rinoceronte (Tabla 4).

CÓDIGO	COMPORTAMIENTO HEMBRAS	CÓDIGO	COMPORTAMIENTO MACHOS
1	NORMAL Y TRANQUILAS	1	NORMAL Y TRANQUILOS
2	NERVIOSAS	2	NERVIOSOS
3	MUY NERVIOSAS Y EXCITADAS	3	MUY NERVIOSOS Y EXCITADOS
5	SECRECIÓN VAGINAL "ANÓMALA"	4	SILBIDOS Y OTRAS VOCALIZACIONES

Tabla 4: Códigos de los comportamientos observados en los rinocerontes en semi-cautividad (adaptada de la original del Bioparc).

Debe tenerse en cuenta, que son muchos los cuidadores que estuvieron anotando dichos comportamientos para la realización de este estudio, por lo podrían haberse dado anotaciones subjetivas según el cuidador o cambios en el comportamiento del animal en función de su "cariño" por el cuidador.

2.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

De los múltiples comportamientos observados en los rinocerontes en libertad, los resumimos de forma similar a la tabla utilizada en los rinocerontes en semi-cautividad, añadiendo ciertos códigos, adaptados de la tabla de Owen-Smith (1973), como por ejemplo "comportamiento agonístico (agresivo o defensivo)", "comportamiento olfativo" o "comportamiento territorial" (Imagen 5) y separados en función del sexo del animal, pudiendo darse uno o más de los códigos descritos, para un mismo animal (Tabla 5).

CÓDIGO	COMPORTAMIENTO HEMBRAS	CÓDIGO	COMPORTAMIENTO MACHOS
1	NORMAL Y TRANQUILAS	1	NORMAL Y TRANQUILOS
2	NERVIOSAS	2	NERVIOSOS
5	COMPORTAMIENTO AGONÍSTICO	3	EXCITADOS
6	SECRECIÓN VAGINAL	5	COMPORTAMIENTO AGONÍSTICO
7	COMPORTAMIENTO OLFATIVO	7	COMPORTAMIENTO OLFATIVO
8	COMPORTAMIENTO TERRITORIAL (Marcaje)	8	COMPORTAMIENTO TERRITORIAL (Marcaje)
9	HERIDA O ENFERMEDAD VISIBLE	9	HERIDA O ENFERMEDAD VISIBLE

Tabla 5: Códigos de los comportamientos observados en las hembras y los machos de los rinocerontes en libertad (Reserva).

Las conductas observadas que presentaron todos los rinocerontes en libertad se juntaron en dos grupos según la siguiente tabla (6), para el análisis final de los resultados: en el grupo **0** se incluyó solo el comportamiento "normal y tranquilo", mientras que en el grupo **1** entraron todos aquellos comportamientos que difieren del grupo 0.

CÓDIGO	COMPORTAMIENTO	GRUPO
1	Normal y tranquilo	0
2,9	Alterado (nervioso)	1
6,3	Comportamiento sexual	1
5	Comportamiento agonístico (defensivo o agresivo)	1
7,8	Comportamiento territorial	1

Tabla 6: Comportamientos observados en los rinocerontes en libertad (Reserva) agrupados para el análisis estadístico.



Imagen 5: Marcas características de comportamiento territorial realizadas por el macho territorial en la Reserva. Izquierda: esparcimiento de heces. Derecha: dispersión de orina en ráfagas.

3. RECOGIDA DE MUESTRAS FECALES

La recogida de muestras fecales se ha realizado a lo largo de dos años (2009-2011), durante diferentes etapas y principalmente cubriendo las estaciones de invierno y verano en los distintos hábitats del estudio.

3.1. Zoo de Madrid

Las muestras fecales correspondientes a los rinocerontes del Zoológico de Madrid, se recogieron, gracias a la ayuda de todo el equipo y sus cuidadores, durante parte del 2009 y todo el 2010. Incluyendo además todas las muestras de Marina, correspondientes al 2007 y 2008 durante su gestación (antes, durante y después). Las muestras han sido recogidas durante todos los meses posibles, evitando periodos críticos en la gestación de la hembra.

- Las muestras de Marina se recogieron desde el 1 de Junio de 2007 hasta el 29 de Noviembre de 2010, con periodos intermedios en que no pudieron ser recogidas. Siendo el único animal del estudio en el que hemos podido monitorizar su gestación, las muestras las separamos en tres periodos distintos:
 - Antes de la gestación: corresponde a las muestras entre junio y septiembre de 2007. Un total de 35 muestras recogidas cada cuatro días aproximadamente.
 - Durante la gestación: un total de 55 muestras recogidas una vez por semana desde abril del 2008, hasta abril del 2009.

- Después de la gestación: desde junio hasta noviembre de 2009, haciendo un total de 41 muestras, recogidas cada cuatro días aproximadamente.
 - Además se recogieron un total de 46 muestras, dos veces por semana aproximadamente, desde mayo hasta noviembre del 2010, que corresponde al mismo periodo que los otros dos animales de este hábitat.
- Las muestras de la Hembra Vieja se recogieron dos veces por semana aproximadamente, desde Mayo a Noviembre del 2010 (coincidiendo con la recogida de muestras de Marina) haciendo un total de 46 muestras.
 - Las muestras del Macho, se recogieron durante el mismo periodo obteniendo un total de 37 muestras.

En cautividad, la mayoría de las condiciones en las que se encuentran los animales están perfectamente controladas: la cantidad y variedad de comida se mantiene prácticamente constante durante todo el año (principalmente se basa en pienso, heno y alfalfa), los cobijos donde duermen cada noche, su recinto de día, sus cuidadores, etc. Existe variabilidad meteorológica, pero cuando las condiciones son muy adversas, los animales no llegan a salir a su recinto de día, quedando resguardados en sus cobijos.

En este hábitat, los animales mantienen una rutina diaria a lo largo de todo el año, aunque a veces se les intenta distraer con algún tipo de enriquecimiento (conos, troncos, etc.) para hacer de su día a día, algo diferente. La única diferencia en su rutina diaria pudiera ser la cantidad de público que les observa en sus recintos de día, ya que no mantienen relaciones con otras especies animales y no se enfrentan a ningún reto especial, su alimento está asegurado, su cobijo también y su "territorio" es siempre el mismo.

3.2. Bioparc de Valencia

Se realizó una estancia de un mes en el Bioparc para obtener las muestras fecales y los datos conductuales de cada individuo, así como para enseñar a los cuidadores la forma de realizar la toma de muestras y etiquetado de las mismas en base a la obtención de las muestras durante todo el año.

Las muestras fecales, correspondientes a la primera deposición diaria, fueron recogidas dos veces por semana desde mayo del 2009 a mayo del 2010 haciendo un total de 286 muestras, de las cuales, 62 pertenecen a Nombula, 69 a Maiai, 70 a Rómulo y 85 a Cirilo.

Las condiciones en semi-cautividad se mantienen bastante estables a lo largo del año: cuidadores, comida (pienso, heno y alfalfa), cobijos, recintos de día, especies animales con las que conviven, etc. La variabilidad de las condiciones meteorológicas, hace que a veces, los animales no salgan a su recinto de día, manteniéndose resguardados en su cobijo cuando las condiciones son menos favorables.

En este hábitat, los animales mantienen una rutina diaria a lo largo de todo el año. Salen a la misma hora a su recinto de día y entran en sus cobijos a la misma hora cada noche. En sus recintos de día, es cuando se pueden encontrar con distintos tipos de retos mediante las relaciones que mantienen con las especies con las que conviven.

3.3. Reserva de Mabula (Sudáfrica)

En Sudáfrica, se realizaron dos estancias de 3 meses cada una, en la Reserva de Mabula, para poder realizar el muestreo durante sus dos épocas principales, invierno y verano: Junio-Agosto 2010 y Diciembre 2010-Febrero 2011, respectivamente. En dicha reserva conviven aproximadamente 22 ejemplares de rinoceronte blanco con otras especies de la sabana africana, dispersos en unas 10.000 hectáreas. Previa correcta identificación del individuo, todas las muestras fecales frescas fueron recogidas *in situ* durante las primeras horas de la mañana, siempre que las condiciones lo permitían, anotando en todo momento aquellos datos conductuales observados.

Debido a la imposibilidad de programar una pauta concreta de recogida de muestras en un estudio de estas características, y a la dificultad añadida de poder conseguir muestras de todos los individuos con una determinada pauta, no se pudo seguir un patrón regular.

Para la recogida de todas estas muestras, previa localización e identificación de cada uno de los animales del estudio, se esperó hasta el momento de la defecación y se recogió la muestra fecal lo más rápido posible. Una vez obtenida, se identificaba y se guardaba en un congelador portátil, para salir en la búsqueda del siguiente animal. Es por esto que las muestras fueron recogidas a diferentes horas y no todas corresponden a la primera deposición de la mañana.

Las muestras que obtuvimos se resumen en la siguiente tabla (Tabla 7):

RINOCERONTE	Nº MUESTRAS TOTALES
COW 7	19
COW 17	14
COW RODGIE	21
COW STOMPSTERT	12
COW TDI	15
BULL 17.6	23
BULL 15.3.1	25
BULL 17.4.1	28
TOTAL	157

Tabla 7: Número de muestras fecales totales de cada rinoceronte en libertad.

En la Reserva Sudafricana, los rinocerontes se enfrentan a múltiples retos diarios, entre los cuales destacan la búsqueda de comida, agua y cobijo, así como la competencia reproductora y desafíos sociales. Además, las condiciones climatológicas sufren una gran variación entre sus dos principales épocas del año, invierno y verano. Cabe destacar que en Sudáfrica, el invierno o "estación seca", cubre aproximadamente los meses entre Abril y Septiembre, época en la cual, los animales tienen más dificultades a la hora de encontrar alimento y cobijo. Es una época de conflictos, tanto intra- como interespecíficos, principalmente asociados a la búsqueda de alimento, ya que conviven con multitud de especies herbívoras con las que existe mucha competencia. Las pequeñas plantas anuales y las hierbas que cubren la sabana africana están secas y no les aportan nutrientes suficientes y las pocas plantas comestibles existentes, obligan a los animales a estar más agrupados de lo habitual. Es por esto, que para mantener a los rinocerontes en buen estado

físico (así como a otras especies valiosas como los búfalos), se aporta un suplemento alimenticio (alfalfa), cuyo propósito no es otro que evitar la falta de nutrientes y alimento que conllevarían un empeoramiento de la condición general del animal. Para que dicha suplementación no termine "habituando" al animal, se cambian constantemente las zonas de suplementación evitando además aglomeraciones y peleas.

Durante el verano sudafricano o "estación lluviosa", correspondiente a los meses comprendidos entre Noviembre y Marzo, los rinocerontes encuentran alimento sustancioso y agua casi en cualquier rincón de la reserva. Debido a esto, los animales se encuentran más dispersos por la Reserva, en pequeños grupos familiares de 2-3 individuos, caminando los machos de forma generalmente solitaria y territorial. Diversos tipos de plantas ya crecidas y frondosas les brindan además un buen cobijo donde pasar la noche.

Debido a las grandes diferencias entre los distintos hábitats estudiados, se realizaron diversas anotaciones durante cada etapa del estudio respectivamente, intentando cubrir lo mejor posible todas las variables que pudieran estar influyendo en nuestro estudio: climatología, interacciones intra e interespecíficas, reacciones ante los distintos enriquecimientos, comportamiento (sonidos, interacción), etc.

4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS FECALES

Todas las muestras fecales obtenidas de los tres hábitats del estudio fueron congeladas a -20°C después de su recolección, hasta su secado, procesamiento y análisis.

4.1. Liofilizado de las muestras

Las muestras fecales congeladas pertenecientes a los parques zoológicos españoles, fueron secadas en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria (UCM) mediante un liofilizador (Telstar Lyoquest-85, España).

Para ello, las muestras fueron homogeneizadas e introducidas en pequeños viales previamente identificados y cubiertos con tapones de liofilizar. Posteriormente, se colocaron en las bandejas del liofilizador y se programaron las condiciones del liofilizado:

- Tiempo: 48 horas
- Presión de vacío: 0,010 mBar
- Temperatura: 45°C.

Al finalizar el tiempo de liofilizado, los tapones se cerraron al vacío, hasta la etapa de extracción y análisis.

Las muestras congeladas procedentes de Sudáfrica, fueron transportadas en congeladores portátiles hasta la Universidad de Medicina Veterinaria de Pretoria donde se usó un liofilizador (*Freeze Dryer*, Instruvac, Air & Vacuum Technologies, Sudáfrica), con el fin de secar las muestras y utilizando el mismo protocolo y las mismas condiciones de liofilización que en el caso anterior y también los viales fueron tapados al vacío, de forma que las muestras fueron fácilmente transportadas en condiciones estables hasta España, para realizar los análisis posteriores.



Imagen 6: Liofilizador utilizado en Sudáfrica (izquierda); liofilizador utilizado en España (derecha).

4.2. Protocolo de extracción de heces

4.2.1. Protocolo para la extracción de glucocorticoides y progestágenos

Los extractos fecales se obtuvieron mediante la técnica de extracción de heces que tienen estandarizada y validada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Viena, Austria (*Veterinärmedizin Universität Wien*) y que incluye los siguientes pasos:

1.- Pesado de las muestras: se pesaron exactamente 0,2 g de heces secas en tubos de cristal de centrífuga con su identificación correspondiente.

2.- A cada muestra se le añadió 0,8 ml de agua destilada y 5 ml de metanol y se agitaron en vórtex durante 30 segundos cada una.

3.- En grupos de 40 tubos, se colocaron en el agitador eléctrico (*Agitateur Microtitration 86247*, Bioblock Scientific, Heidolph, Alemania) durante 30 minutos, para conseguir una buena homogenización.

4.- Centrifugado de las muestras en la centrífuga (Hettich Zentrifugen Universal 320R, Alemania) a 1500 xg durante 10 minutos.

5.- Se tomó 1 ml del sobrenadante que se pasó a viales de vidrio previamente identificados para cada muestra.

6.- Se introdujeron los viales en el evaporador bajo una corriente de nitrógeno en estado gaseoso (Turbovap LV Evaporator, Zymak, USA).

7.- El extracto seco, se almacenó en lugar seco a T^a ambiente, hasta su reconstitución para el análisis hormonal.

8.- Las muestras se reconstituyeron en 1 ml de metanol y fueron agitadas en vórtex durante 30 segundos para el análisis hormonal.

4.2.2. Protocolo para la extracción de andrógenos y estrógenos

Los extractos fecales se obtuvieron mediante la técnica de extracción de heces basada y adaptada del protocolo americano original de Brown y colaboradores (2005), describiendo las siguientes fases:

1.- Pesado de las muestras: se pesaron exactamente 0,2 g de heces secas en tubos de cristal de centrífuga con su identificación correspondiente.

2.- A cada muestra se le añadió 0,5 ml de agua destilada y 4,5 ml de etanol absoluto (EtOH) y se agitaron en vórtex durante 30 segundos cada una.

3.- En grupos de 40 se pusieron en el agitador eléctrico (*Agitateur Microtitration* 86247, Bioblock Scientific, Heidolph, Alemania) durante 30 minutos, para conseguir una buena homogenización.

4.- Centrifugado de las muestras en la centrífuga (Hettich Zentrifugen Universal 320R, Alemania) a 1500 xg durante 20 minutos.

5.- Se separó el sobrenadante a una segunda tanda de tubos que se introdujeron en un baño de agua a 100°C, hasta su completa evaporación.

6.- En la primera tanda de tubos, se volvieron a añadir 0,5 ml de agua destilada y 4,5 ml de etanol absoluto (EtOH), para repetir los pasos 2, 3 y 4. El sobrenadante obtenido se pasó a los tubos de la primera tanda, que se encontraban completamente evaporados, se agitaron 30 segundos y se volvieron a introducir en un baño de agua a 100°C para que se volvieran a evaporar.

7.- Tras una completa evaporación, se añadieron 3 ml de etanol absoluto, se agitaron durante 30 segundos en el vórtex y se llevaron al sonicador (*Ultrasons-H*, J.P. Selecta, España) durante 15 minutos.

8.- Después de sonicar los tubos, se llevaron de nuevo a un baño de agua a 100°C para lograr su evaporación.

9.- Finalmente, se reconstituyeron las muestras: se añadió 1 ml de metanol a los tubos evaporados que se volvieron a llevar al sonicador durante 15 minutos. De esta forma, conseguimos el extracto final de las heces que se pasó a tubos *ependorf* identificados, que se guardaron en el congelador a -20°C hasta su análisis.

5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Se realizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la identificación de los glucocorticoides mayoritarios en las muestras fecales de rinoceronte blanco.

5.1. Preparación de las muestras fecales

Se realizaron varios pools correspondientes a las muestras tanto de machos como de hembras de cada hábitat. Además se incluyeron dos pools de Marina, uno correspondiente a las muestras de antes del parto y otro con las muestras de después del parto.

Las muestras se eluyeron con 5ml de metanol al 80% para eliminar posibles contaminantes.

5.2. Análisis HPLC

El HPLC empleado, utilizó una columna C-18 (Novapak C₁₈ column (3,9x150mm), Millipore Corporation, Milford, USA) con una columna protectora (*Mini-Guard column C₁₈*) conectado a un colector de fracciones.

Las muestras fecales se separaron mediante un gradiente lineal de metanol del 50 al 75% durante los primeros 40 minutos que pasó al 100% de metanol hasta el minuto 55. Se recogieron 95 fracciones en total.

Las fracciones obtenidas fueron reconstituidas en tampon fosfato y la inmunorreactividad del cortisol fue cuantificada mediante la técnica EIA que se detallará a continuación.

6. ANÁLISIS HORMONALES

Para la determinación de la concentración hormonal de estrógenos y andrógenos, se analizaron las muestras mediante ELISA de competición desarrollado en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), que validamos específicamente para la especie de este estudio. Los niveles hormonales se expresan en ng/g de heces secas.

Los glucocorticoides y progestágenos fueron analizados mediante un ELISA de competición con marcador biotina-estreptavidina, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Viena, Austria (*Veterinärmedizin Universität Wien*) tras una estancia de 6 semanas y bajo la tutela del Prof. Dr. Franz Schwarzenberger.

6.1. Determinación de la concentración de estrógenos y andrógenos en heces

El análisis hormonal utilizado para la determinación de estrógenos (sulfato de estrona) y andrógenos (testosterona) en heces, se basa en la competición que se establece entre la hormona libre sin marcar (muestra problema, de concentración desconocida, o estándar de concentración conocida) y la hormona marcada con una enzima (peroxidasa), por unirse a un anticuerpo fijado previamente a una fase sólida.

En esta técnica se mide la fracción de hormona marcada con la enzima que se une al anticuerpo prefijado en la fase sólida, mediante la cuantificación de la reacción de la enzima unida a la hormona con su sustrato unido a un cromógeno. En esta reacción se obtiene un producto coloreado y la absorbancia del color desarrollado es proporcional a la cantidad de hormona marcada que se ha unido al anticuerpo y, por lo tanto, inversamente proporcional a la cantidad de hormona sin marcar presente en la muestra problema.

Este ensayo comprende distintas etapas:

1) Preparación de las muestras

Se prepararon distintas diluciones de las muestras hasta conseguir la dilución óptima para el análisis hormonal según la hormona a determinar.

- Testosterona y sulfato de estrona: dilución 1:50 (10 µl muestra + 490 µl EIA *buffer* [Fosfato de sodio dihidrógeno monohidratado 0,01 M, fosfato di-sodio hidrógeno anhidro 0,01 M, cloruro de sodio 0,9 M, BSA 1%, pH=7]).

2) Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida

En esta primera fase del ensayo se tapizaron las microplacas de poliestireno de 96 pocillos con una dilución determinada del anticuerpo para la hormona a analizar. Todas las diluciones de anticuerpo se realizaron en *coating buffer* (tampón carbonato/bicarbonato 0,05M, pH=9,6). Una vez realizada la dilución óptima correspondiente según la hormona a analizar, se añadieron 100 µl de la misma en todos los pocillos de la placa dejando libre el primer pocillo (A1) para utilizarlo como blanco. Por último, las placas se sellaron con una tapa de acetato y se dejaron incubar 16 horas a 4°C.

Al día siguiente, con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo no fijado, se lavaron las placas tres veces con solución de lavado NaCl 0,15 M/Tween - 20 0,05%, utilizando un lavador automático de placas (*Anthos Washer Fluido 1WK* Modelo 24 500, Anthos Labtec Instruments, Austria).

3) Reacción de competición

En esta fase tiene lugar la reacción entre la hormona libre (muestra estándar o muestra problema) y la hormona conjugada con peroxidasa. Para ello se realizó la dilución óptima de conjugado, según la hormona a analizar, en solución *buffer* EIA y la preparación de la curva estándar:

◇ Determinación de las diluciones óptimas de trabajo: para determinar la dilución óptima de anticuerpo y conjugado para las hormonas, se enfrentaron diluciones diferentes de anticuerpo y conjugado y posteriormente se seleccionaron las diluciones que presentaron una densidad óptica de 0,6 a 0,8 a 450 nm (Munro y Stabenfeldt, 1984), eligiéndose las siguientes:

- Testosterona: anticuerpo R156/157.87 proporcionado por Coralie Munro (University of California, Davis, USA) diluido 1:8.000. Conjugado testosterona-3CMO-HRP diluido 1:40.000.
 - Sulfato de estrona: anticuerpo Jack R522-2 proporcionado también por Coralie Munro (University of California, Davis, USA) diluido 1:4.000. Conjugado E₁-3Gluc-HRP diluido 1:40.000.
- ◆ Preparación de las curvas estándar: para trazar la curva estándar de cada una de las hormonas, se partió de una solución madre de hormona esteroide de concentración conocida (2 mg/ml) a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas de la misma en etanol absoluto hasta obtener un total de 6 estándares (0,1 pg; 1 pg; 10 pg; 100 pg; 1000 pg; 10000 pg/100 µl). Se prepararon seis tubos de vidrio con 10 µl de cada uno de los estándares para posteriormente evaporar el etanol bajo una corriente de nitrógeno en estado gaseoso (Turbovap LV Evaporator, Zymak, USA). El extracto obtenido se disolvió en 500 µl de conjugado. Por último, se añadieron 50 µl de cada estándar + 50 µl de buffer EIA en los pocillos apropiados de la placa. El pocillo A1 se utilizó como blanco; a este pocillo se adicionaron 50 µl de la solución de conjugado, al igual que a los pocillos B1, C1 y D1. Estos pocillos sirven para calcular la unión máxima al anticuerpo (Bo) necesaria para el cálculo de los resultados.

Las muestras problema se prepararon en la solución de conjugado en la siguiente proporción: 50 µl de muestra se diluyeron en 250 µl de conjugado en un tubo de ensayo de cristal de 25 x 70 mm y la mezcla se homogeneizó cuidadosamente mediante vórtex. Se utilizaron 60 µl de esta solución junto con 40 µl de tampón EIA para tapizar los pocillos de la placa de poliestireno. El tiempo que transcurre en el tapizado de la placa no debe sobrepasar los 10 minutos, debido a que las variaciones de absorbancia observadas en la determinación de una misma muestra, pueden alterar la repetibilidad de la técnica de análisis.

Las muestras estándar y problema se determinaron por duplicado, de forma que se analizaron un total de 40 muestras por placa (Figura 15).

Las placas se sellaron, incubándose durante un período de 2 horas a temperatura ambiente (alrededor de 22°C).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	St.10	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
B	Bo	St.10	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
C	Bo	St.100	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
D	Bo	St.100	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
E	St.0,1	St.1000	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
F	St.0,1	St.1000	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
G	St.1	St.10000	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
H	St.1	St.10000	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40

Figura 15: Formato de microplaca de 96 pocillos (B=blanco; Bo= máxima unión; St=estándar).

4) Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos adsorbidos en la fase sólida

Se lavaron las placas en el lavador automático (tres veces) y se secaron golpeándolas enérgicamente sobre papel de filtro. De esta forma, sólo tendremos en la placa la cantidad de hormona que se haya unido al anticuerpo.

5) Adición del sustrato y del cromógeno

Como sustrato se utiliza peróxido de hidrógeno que va diluido en un tampón sustrato que lleva el cromógeno timidilbencidina (Enhanced K Blue, Neogen, USA). Se añaden 100 µl del mismo en todos los pocillos. Posteriormente, se sella y se incuba a temperatura ambiente el tiempo necesario según la hormona:

- Testosterona y sulfato de estrona: 5 minutos.

A medida que pasa el tiempo de incubación, apreciamos la aparición de un color azulado en los pocillos, de intensidad variable e inversamente proporcional en función de la concentración hormonal.

6) Frenado de las placas

Al cumplir el tiempo de incubación, se frenó la reacción enzimática añadiendo 100 µl de una solución de ácido sulfúrico al 10% en todos los pocillos de la placa. La reacción hizo que el color azul pasara a amarillo.

7) Lectura de las placas

Se basa en cuantificar la densidad óptica del color desarrollado en cada pocillo. Para ello se utilizó un lector automático EIA (Microplate Reader A4, Eurogenetics, Bélgica) con filtros de 450 y 600 nm que realiza una lectura bicromática, eliminando el color producido por una posible reacción de fondo inespecífica.

8) Procesado de los resultados

Se realiza con la ayuda de un software diseñado por el Departamento de Informática de la Universidad de California (Davis, USA). Este programa traza las curvas patrón enfrentando en el eje de abscisas las concentraciones estándar de las hormonas y en el eje de ordenadas el porcentaje de unión de las muestras con el anticuerpo. Una vez calculadas las curvas patrón, el programa calcula las concentraciones hormonales de las muestras tomando como referencia estas curvas. Para expresar las concentraciones en unidades correctas (ng/g) se introduce un factor de corrección en función de la dilución realizada.

6.2. Determinación de la concentración de progestágenos y glucocorticoides en heces

El análisis hormonal utilizado para la determinación de progestágenos (progesterona) y glucocorticoides (cortisol) en heces, posee los mismos principios básicos que el explicado anteriormente (ver apartado 4.1), con unas ligeras diferencias. En este caso, también se basa en la competición que se establece entre la hormona libre sin marcar (muestra problema, de concentración desconocida, o estándar de concentración conocida) y la hormona marcada con biotina, por unirse a un anticuerpo unido a la proteína A, fijada previamente a una fase sólida.

En esta técnica se mide la fracción de hormona marcada con biotina que se une al anticuerpo prefijado en la fase sólida a través de la proteína A, mediante la cuantificación de la reacción biotina-estreptavidina (marcada con HRP) y su sustrato unido a un cromógeno. En esta reacción se obtiene un producto coloreado y la absorbancia del color desarrollado es proporcional a la cantidad de hormona marcada que se ha unido al anticuerpo y, por lo tanto, inversamente proporcional a la cantidad de hormona sin marcar presente en la muestra problema.

El ensayo comprende las siguientes etapas:

1) Preparación de las muestras

Se prepararon distintas diluciones de las muestras con un dispensador automático (*Hamilton Microlab Dispenser*, USA) hasta que encontramos las diluciones óptimas para el análisis hormonal según la hormona a determinar.

- Cortisol y progesterona: dilución 1:50.

2) Adsorción de la proteína A a la fase sólida

En esta fase del ensayo, se tapizó cada microplaca de poliestireno de 96 pocillos con 250 μ l de una solución de 50 μ g de proteína A (*Sigma Chemical CO*, USA) disuelta en 25 ml de *coating buffer* (tampón carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH=9,6). Las placas se sellaron con una tapa de parafilm (*Pechiney Plastic Packaging*, Chicago), y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante toda la noche.

Al día siguiente, para eliminar el exceso de proteína A, se volcó el contenido de los pocillos y se rellenaron con 300 μ l del segundo *coating buffer* (tampón tris-salino: azida sódica, BSA y trishidroxí-aminometano, pH=7.5). Las placas se sellaron con una tapa de parafilm y otra de poliestireno y se dejaron incubar a temperatura ambiente toda la noche. En este punto, las placas pueden usarse a partir de las tres horas posteriores a su preparación y en un plazo máximo de 4 semanas.

Al día siguiente, se lavaron las placas tres veces con un lavador automático de placas (*Bio-Tek Instruments ELx405*, Alemania) con solución de lavado (0,5 ml Tween-20 + 2,5 l agua doblemente destilada) y se golpearon enérgicamente sobre papel de filtro hasta eliminar por completo cualquier gota o burbuja.

3) Preparación de muestras y estándares

Con ayuda del dispensador automático, se añadió *buffer EIA* (tampón tris-salino con albúmina de suero bovina (BSA), Tween-80, cloruro sódico y trishidroxiaminometano, pH=7.5) a los pocillos A1 y B1 (blancos) y a los pocillos C1 y D1 (Bo=máxima unión). A los pocillos consecutivos, se añadieron los 7 estándares (realizados previamente mediante diluciones seriadas desde los 500 pg hasta los 2 pg de hormona por 0,01 ml) y un control de concentración alta y otro control de concentración baja. En el resto de pocillos se añadieron 50 µl de las muestras por duplicado.

4) Adición del anticuerpo

A todos los pocillos excepto a los blancos (que se les puso *buffer EIA*), se añadió 100 µl de la dilución del anticuerpo y 100 µl de esteroide marcado con biotina. Por último, se volvieron a tapar las placas con parafilm y la tapa de poliestireno y se dejaron incubar en agitación a 4°C durante toda la noche.

5) Reacción estreptavidina-biotina

Se lavaron las placas tres veces en el lavador automático y se secaron golpeándolas enérgicamente sobre papel de filtro. Añadimos 250 µl de la solución enzimática de estreptavidina marcada con HRP a todos los pocillos, tapamos e incubamos la placa en agitación durante 45 minutos a 4°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, volvemos a lavar tres veces la placa, para eliminar todo aquellos que no se haya unido.

6) Adición del sustrato y del cromógeno

Añadimos 250 µl de sustrato a todos los pocillos (tampón acetato de sodio (10 mmol/l) diluido en tetrametilbencidina, dimetilsulfóxido y peróxido de hidrógeno). Volvemos a tapar la placa e incubamos en agitación durante 45 minutos a 4°C.

A medida que pasa el tiempo de incubación, apreciamos la aparición de un color azulado en los pocillos, de intensidad variable e inversamente proporcional en función de la concentración hormonal.

7) Frenado de las placas

Al cumplir el tiempo de incubación, se frenó la reacción enzimática añadiendo 50 µl de una solución de ácido sulfúrico diluido al 20% en todos los pocillos de la placa. La reacción hizo que el color azul pasara a amarillo.

8) Lectura de las placas y procesado de los resultados

Se basa en cuantificar la densidad óptica del color desarrollado en cada pocillo. Para ello se utilizó un lector automático (*Bio-Tek Instruments ELx808*, Alemania) con filtros de 450 y 620 nm que realiza una lectura bicromática, eliminando el color producido por una posible reacción de fondo inespecífica. Además, el lector está conectado a un ordenador donde manda y procesa las lecturas realizadas. Este programa traza las curvas patrón enfrentando en el eje de abscisas las concentraciones estándar de las hormonas y en el eje de ordenadas el porcentaje de unión de las muestras con el anticuerpo. Una vez calculadas las curvas patrón, el programa calcula las concentraciones hormonales de las muestras tomando como referencia estas curvas. Para expresar las concentraciones en unidades correctas (ng/g) se introduce un factor de corrección en función de la dilución realizada.

6.3. Parámetros de validación de las técnicas inmunoenzimáticas

La validación de la técnica EIA para las hormonas analizadas se realizó de acuerdo a lo descrito por Munro y colaboradores (1991) para los estrógenos y andrógenos; de acuerdo a lo descrito por Schwarzenberger y colaboradores (1996b) para los progestágenos; y de acuerdo a lo descrito por Palme y Möstl (1997) y Touma y colaboradores (2003), para los glucocorticoides. Los métodos de validación se realizaron mediante la determinación de una serie de parámetros:

- **Sensibilidad:** Se calculó mediante dos métodos: primero, límite de detección, que es la concentración hormonal que la técnica puede distinguir de cero. Se calculó a partir de la media de los pocillos cero (B_0), menos dos desviaciones estándar de la media en 10 ensayos consecutivos ($S = B_0 - 2 \times DE$). Segundo, concentración de la hormona a determinar que produjo el 50% de la unión máxima de hormona marcada al anticuerpo ($S=B_0/2$).

- **Especificidad:** Se valoró mediante pruebas de reacciones cruzadas entre las hormonas a determinar y otras hormonas esteroideas de estructura similar. La reacción cruzada se calculó como la concentración de hormona problema que causaba una reducción del 50% de la unión inicial al anticuerpo ($RC = [Hormona\ problema\ 50\% / esteroide\ similar\ 50\%] \times 100$).
- **Precisión:** se realizó calculando los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo. El coeficiente intra-ensayo se calculó analizando 10 veces un pool de muestras dentro de un mismo ensayo. El coeficiente inter-ensayo se calculó analizando 10 veces un pool de muestras en ensayos consecutivos.
- **Exactitud:** Se valoró mediante los porcentajes de recuperación, añadiendo a las muestras, cantidades conocidas de hormona, calculando posteriormente el porcentaje de recuperación a partir de los valores observados y esperados para cada hormona.
- **Linealidad:** se realizaron diluciones seriadas de un pool de extractos de heces y se compararon con la curva estándar para determinar la linealidad en un determinado rango de concentraciones.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Una vez obtenidos todos los datos de los niveles hormonales de cada individuo del estudio, se procesaron con el paquete estadístico SPSS 19.0 (IBM *Statistical Package for the Social Sciences*, USA, 2010) y algunos gráficos se realizaron con SigmaPlot V.11 (*Systat Software*), ambos para *Windows*.

7.1. Variables estadísticas empleadas

La base de datos utilizada incluía los resultados de las medias de los análisis hormonales además de los datos separados por individuo, hábitat, hormona analizada y fecha/hora de recogida de la muestra.

Cada hábitat fue tratado como una variable categórica así como el sexo de los individuos y las estaciones de invierno y verano para determinar las posibles variaciones hormonales estacionales para cada hábitat.

Las variables del estudio hormonal (glucocorticoides, progestágenos, andrógenos y estrógenos), fueron tratadas como variables continuas.

- **Cautividad:** se analizaron los datos conjuntos de los tres rinocerontes correspondientes a este hábitat. Además se estudió cada individuo por separado para la realización de un perfil hormonal individual, así como el estudio detallado de Marina durante su gestación.
- **Semi-cautividad:** los cuatro rinocerontes alojados en el Bioparc, se estudiaron en su conjunto además de analizarse también por separado para la realización de un perfil hormonal individual.
- **Libertad:** de los ocho rinocerontes estudiados en este hábitat, se estudiaron en conjunto todas las hembras y todos los machos, pues el limitado número de muestras correspondientes a cada individuo, imposibilitó la realización de un análisis estadístico fiable para los perfiles hormonales individuales.

7.2. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis descriptivo de las variables continuas se usó el valor medio y el error estándar de la media. Los resultados fueron expresados en forma de media (ng/g de heces secas) \pm error estándar de la media.

Para evaluar la relación de las variables *estación*, *sexo* y *hábitat* con las concentraciones hormonales, se analizaron los valores medios de cada sujeto mediante el empleo de estadística no paramétrica. Para evaluar el efecto de la **estación** se utilizó el test de *Wilcoxon* para muestras dependientes. Para evaluar el efecto del **sexo** se utilizó la prueba *U de Mann-Whitney* para muestras independientes. Para evaluar el efecto del **hábitat** se utilizó el ANOVA por rangos de *Kruskall-Wallis*, si dicho análisis revelaba un efecto significativo se utilizó la prueba *U de Mann-Whitney* para las comparaciones por pares corrigiendo el nivel de significación mediante el test de *Bonferroni*. Por otro lado, estábamos también interesados en evaluar la interacción entre las variables *estación* y *sexo*; y *estación* y *hábitat*. Para ello se creó la variable cambio estacional para cada hormona, mediante la resta de los valores de invierno menos los valores de verano, comparando las diferencias en dicha variable en cada uno de los factores sexo y hábitat con la prueba correspondiente (test de *Wilcoxon* y de *Kruskall-Wallis*, respectivamente). Finalmente la relación existente entre las variables continuas fue evaluada empleando la correlación de *Pearson*.

Además, se realizó un análisis individual de cada sujeto mediante el estudio de los cambios longitudinales de sus concentraciones hormonales a lo largo de todo el período de estudio y las correlaciones entre éstas (correlación de *Pearson*). Además se evaluó el cambio estacional (invierno-verano) de cada sujeto mediante un ANOVA paramétrico de un factor seguido de las pruebas correspondientes *post hoc* para comparaciones múltiples (test de *Bonferroni*).

Para el análisis estadístico del comportamiento, se compararon los niveles de las distintas variables hormonales en los días posteriores a que ocurriera algún evento distinto al comportamiento "normal y tranquilo" con los datos de los días posteriores en los que ocurriera un suceso tranquilo, mediante la prueba *T de Student*.

Por otro lado, para la determinación del sexo gonadal, se han ajustado tres modelos de regresión logística binaria para evaluar la capacidad predictiva de las concentraciones de andrógenos y estrógenos sobre el sexo del sujeto. En primer lugar, se emplearon las medias hormonales de los sujetos ($n=15$) para modelar la variable sexo. Con los parámetros obtenidos, en un segundo paso se clasificó cada una de las 572 muestras (304 y 268 de hembras y machos respectivamente), evaluando la clasificación correcta. Los tres modelos evaluados fueron:

- 1) Modelo I: incorporaba las concentraciones de andrógenos y estrógenos;
- 2) Modelo II: incluía además, la interacción entre ambas variables;
- 3) Modelo III: incluía la razón entre las concentraciones de andrógenos y estrógenos.

El nivel de confianza de todos los análisis estadísticos utilizados fue del 95%, considerándose significativos los valores de $p < 0,05$.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

MATERIAL Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS HORMONAL

Las concentraciones de glucocorticoides y progestágenos fueron analizadas en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena (*Veterinärmedizin Universität Wien, Austria*) donde además, se validó el metabolito del cortisol para la especie, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados de las concentraciones están expresados en nanogramos por gramo (ng/g) de heces secas.

Las concentraciones de andrógenos y estrógenos se analizaron en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria de la UCM. Los resultados de las concentraciones están expresados en nanogramos por gramo (ng/g) de heces secas.

1.1. Glucocorticoides

La validación de los glucocorticoides analizados se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que incluyó pooles de machos y hembras para cada hábitat. Se realizó el estudio de Marina (Zoo de Madrid), mediante pooles de los meses de antes y después del parto, para determinar qué metabolito de cortisol era el principal que se obtiene de las muestras de heces de rinoceronte blanco.

Se observó un pico del primer metabolito inmunorreactivo de cortisol a los 8 minutos aproximadamente, este pico se produce en todos los pooles de muestras y otro pico más pequeño alrededor de los 30 minutos (Gráfico 1). El metabolito de cortisol que se identificó fue el 5 α -pregnano-3 β , 11 β , 21-triol-20-ona, analizado en los análisis posteriores (EIA).

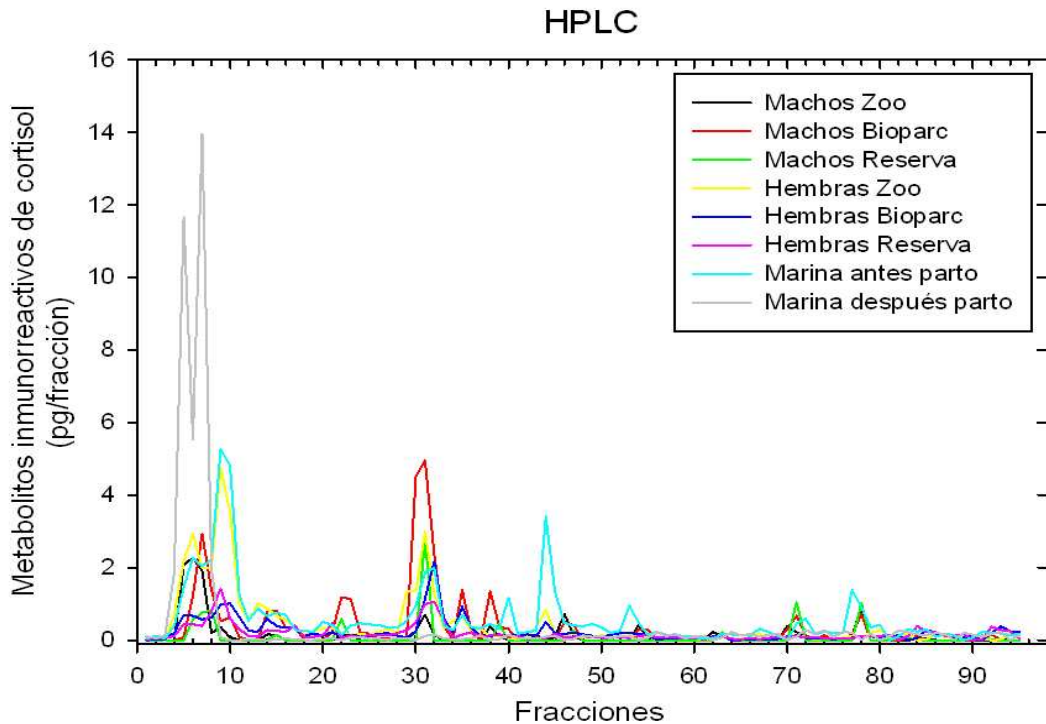


Gráfico 1: Resultados de HPLC de los glucocorticoides encontrados en heces de rinoceronte blanco.

◆ **Parámetros de validación del EIA:**

- Sensibilidad: el límite de detección de la técnica para los glucocorticoides fue de 0,8 pg/pocillo.
- Especificidad: la reactividad cruzada del anticuerpo con otros esteroides fue: 5 α -pregnano-3 β , 11 β , 21-triol-20-ona 100%; 5 α -pregnano-3 β , 11 β , 20 β , 21-tetrol 110%; 5 α -pregnano-3 β , 11 β , 17 α , 21-tetrol-20-ona 45%; 5 α -androstano-3 β , 11 β -diol-17-ona 230%; cortisol y corticosterona < 1%.
- Precisión: el coeficiente de variación (CV) intra e interensayo para el cortisol fue de 14 y 9,1 % respectivamente.
- Linealidad: en la determinación de glucocorticoides en las diluciones seriadas de pools de heces de rinoceronte frente a la curva estándar, obtuvimos una buena linealidad y paralelismo entre la dilución 1:10 y 1:100.

1.1.1. Relación glucocorticoides y estrés

Para poder establecer una relación entre los niveles de glucocorticoides que pueden ser considerados como indicadores de estrés agudo, y ante la imposibilidad de realizar un test de estimulación con ACTH, monitorizamos el perfil hormonal de una de las hembras de nuestro estudio (Marina, Zoo de Madrid) que fue inseminada artificialmente (IA) en el mes de diciembre del 2007. Se estudiaron todos los meses posibles (antes, durante y después) de su gestación, para relacionar la concentración de los niveles de los glucocorticoides fecal durante este periodo y los medidos durante el parto, evento natural estresante, y poder así establecer qué concentraciones de glucocorticoides son indicadoras de estrés.

Encontramos diferencias significativas en las medias de las concentraciones de glucocorticoides entre el periodo de gestación con respecto a los meses anteriores a la IA y después del parto, así como diferencias significativas entre los meses de antes de la gestación y después del parto. Además, se muestran las medias de estas tres etapas y su error estándar (Gráfico 2).

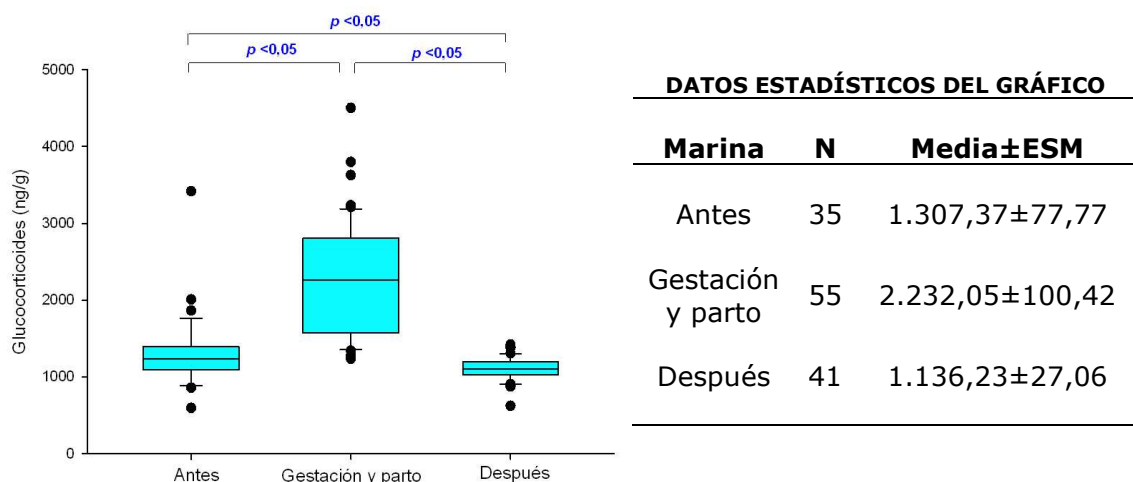


Gráfico 2: Media de la concentración de glucocorticoides (ng/g), antes, durante y después de la gestación y el parto (p = Nivel de significación). Datos estadísticos: valor medio de la concentración de glucocorticoides (ng/g) y error estándar de la media (ESM), antes, durante y después de la gestación (N=Tamaño muestral).

Durante los días posteriores al parto de Marina, encontramos un pico de glucocorticoides (4.502,7 ng/g) correspondiente al día del parto (Gráfico 3).

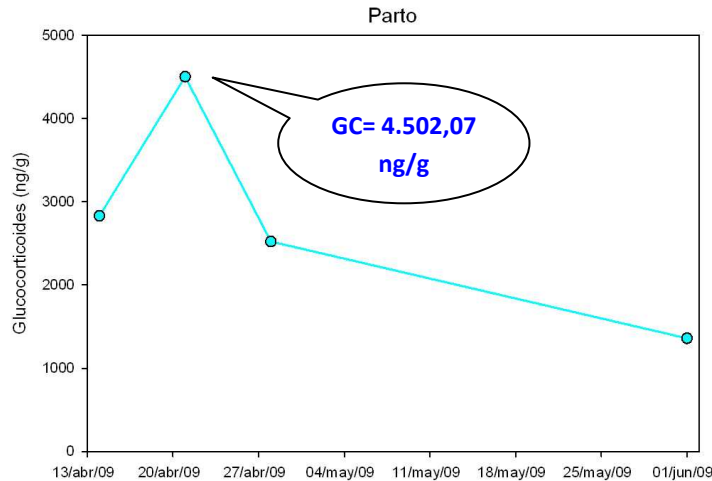


Gráfico 3: Perfil hormonal de las concentraciones de glucocorticoides (ng/g), antes, durante y después del parto de Marina.

1.2. Progestágenos

Los progestágenos (5β -pregano- 3α -ol- 20 -ona), fueron analizados en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena (Austria) pues lo han validado previamente para la especie del estudio (Schwarzenberger *et al.*, 1996b).

1.2.1. Relación progestágenos y gestación

Para poder establecer una relación entre los niveles de progestágenos que podrían indicar la gestación de una hembra, monitorizamos el perfil hormonal de Marina, antes (Gráfico 5), durante (Gráfico 6) y después de su gestación (Gráfico 7), para comparar la concentración de los niveles de los metabolitos de progestágenos en heces durante la gestación y poder así establecer una relación entre las concentraciones de progestágenos y la identificación de hembras gestantes.

Encontramos diferencias significativas en las medias de las concentraciones de progestágenos entre el periodo de gestación con respecto a los meses de antes de la IA y los meses postparto (Gráfico 4).

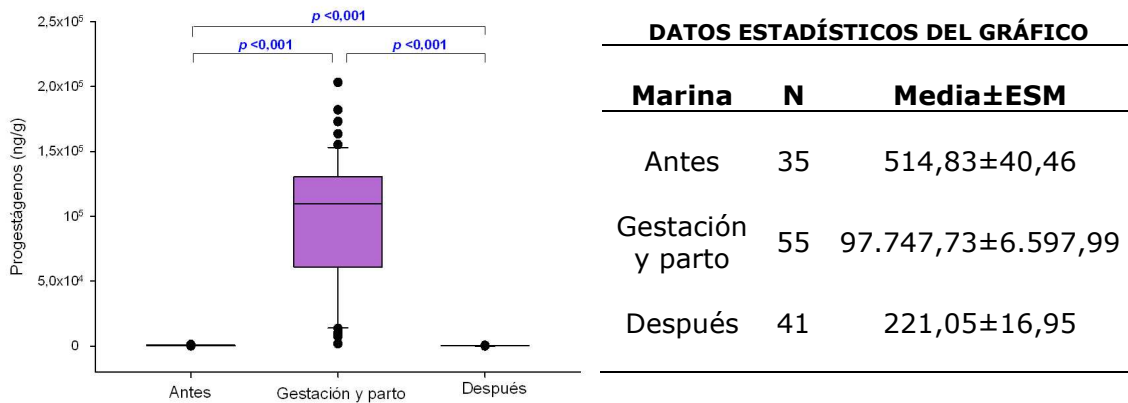
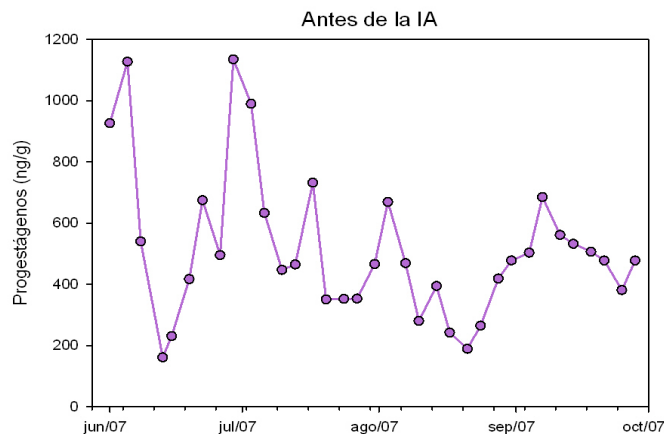
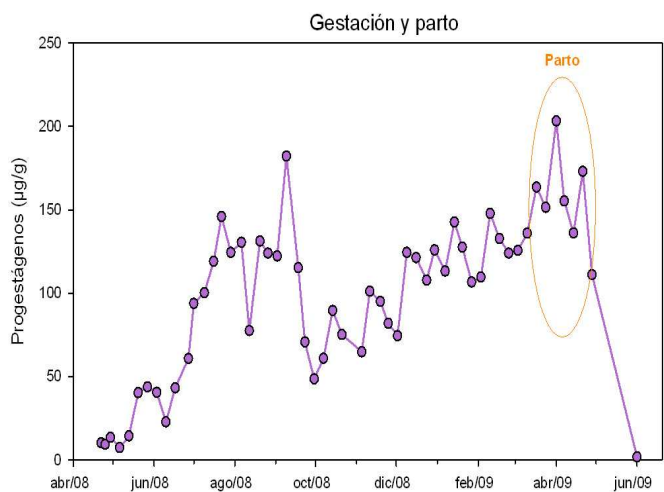


Gráfico 4: Media de la concentración de progesterona (ng/g), antes, durante y después de la gestación y el parto. Tabla: valor medio de la concentración de progesterona (ng/g) y error estándar de la media (ESM), antes, durante y después de la gestación.



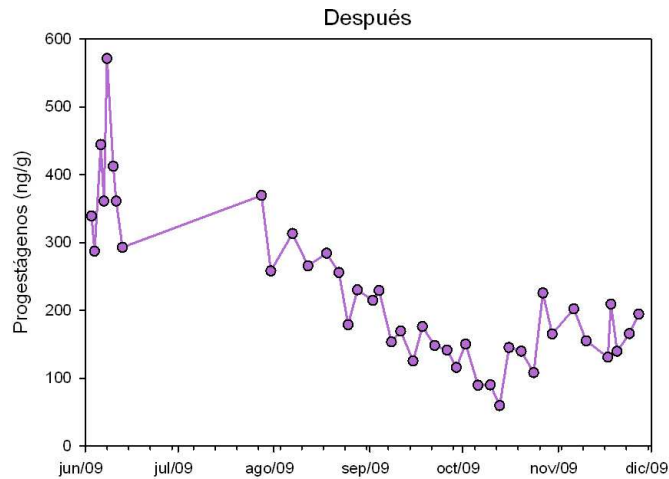
El valor medio de la concentración de progesterona durante este periodo se mantiene alrededor de 500 ng/g de heces secas (datos estadísticos en Gráfico 4). La inseminación artificial se le practicó el 07 de diciembre de 2007.

Gráfico 5: Perfil hormonal de la concentración de progesterona (ng/g) antes de la inseminación artificial (IA) de Marina.



El valor medio de los niveles de progesterona se eleva unas 200 veces con respecto al periodo anterior a la IA, situándose alrededor de 100.000 ng/g (100 µg/g) de heces secas (datos estadísticos en Gráfico 4). Los niveles de progesterona empiezan a caer unos días después del parto.

Gráfico 6: Perfil hormonal de la concentración de progesterona (ng/g) durante la gestación y el parto de Marina.



El valor medio de la concentración de progestágenos durante los meses posteriores al parto, baja hasta situarse alrededor de 300 ng/g de heces secas (datos estadísticos en Gráfico 4).

Gráfico 7: Perfil hormonal de la concentración de progestágenos (ng/g) después de la gestación y parto de Marina.

1.3. Andrógenos y estrógenos

Los resultados de las concentraciones de andrógenos y estrógenos de todas las muestras fecales de los rinocerontes blancos de este estudio, fueron analizados en el laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria (UCM).

◆ Parámetros de validación:

- Sensibilidad: el límite de detección de la técnica para los andrógenos fue de 4,9 pg/pocillo y para los estrógenos 2,9 pg/ pocillo.
- Especificidad: la reactividad cruzada del anticuerpo de testosterona con otros esteroides fue: 4-androsten-17 β -ol-3-ona (testosterona: 100%), 5- α -dihidrotestosterona 20%, 5- β -dihidrotestosterona 5%, androstenediona 11,5%, androstenediol 3,5%, androstenelona 3,21%, 5- α -androstan-3- α 1% y estradiol 1%. La reactividad cruzada del anticuerpo de sulfato de estrona con otros esteroides fue: sulfato de estrona (100%), glucurónido de estrona (70%), estradiol-17 β (9,8%).
- Precisión: el coeficiente de variación (CV) intra e interensayo para los andrógenos fue de 4,32 y 7,87 % respectivamente. En el caso de los estrógenos fue de 8,89 y 10,22 % respectivamente.
- Exactitud: El porcentaje de recuperación para los andrógenos fue de un 86,70%, mientras que para los estrógenos fue de 89,50%.

- Linealidad: en la determinación de andrógenos en las diluciones seriadas de pools de heces de rinoceronte frente a la curva estándar, obtuvimos una buena linealidad ($R^2=0,994$) y paralelismo entre la dilución 1:10 y 1:50 (Gráfico 8a). En el caso del sulfato de estrona, la linealidad fue buena también ($R^2= 0,993$) desde la dilución 1:10 hasta la 1:50 (Gráfico 8b).

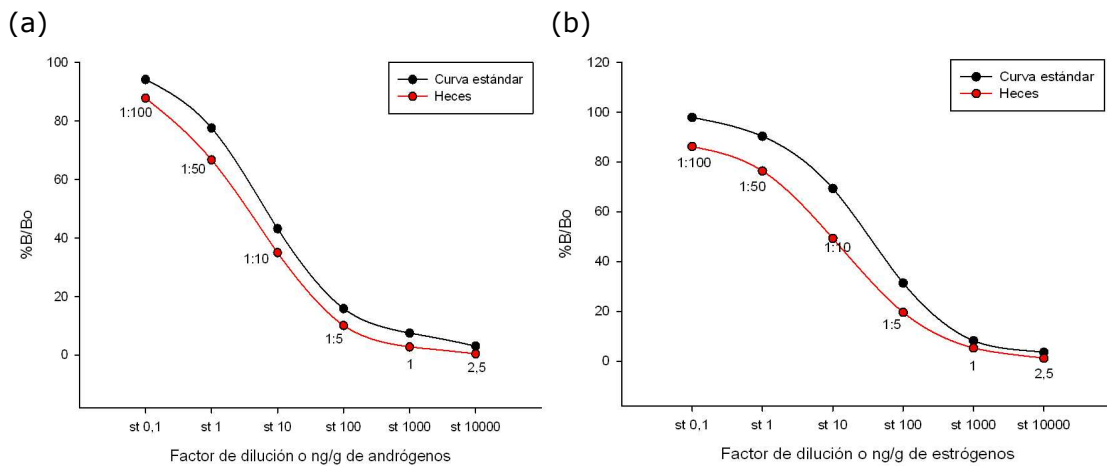


Gráfico 8: Determinación de la concentración de andrógenos (a) y estrógenos (b), en diluciones seriadas de pools de heces de rinoceronte.

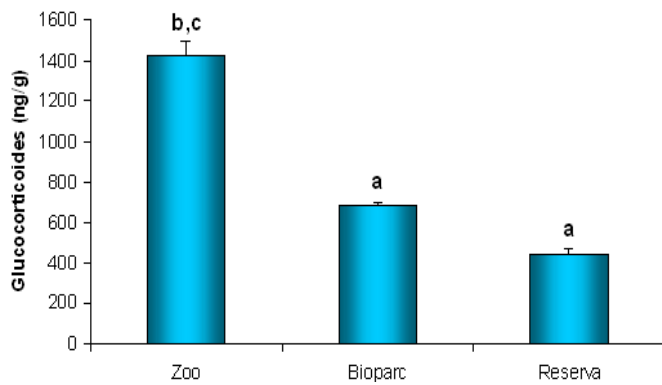
2. ANÁLISIS GENERAL

Se han analizado un total de 703 muestras, de las cuales 131 fueron utilizadas para los perfiles hormonales de glucocorticoides y progestágenos de Marina anteriormente explicados. Las 572 muestras restantes de rinoceronte blanco, fueron las analizadas para determinar las distintas concentraciones hormonales en función de las distintas variables del estudio (129 muestras de los 3 rinocerontes del Zoo de Madrid; 286 muestras de los 4 rinocerontes del Bioparc de Valencia; 157 muestras correspondientes a 8 rinocerontes de la Reserva de Sudáfrica).

2.1. Glucocorticoides

En el análisis realizado para la comparación de las medias de la concentración de glucocorticoides respecto al hábitat del estudio, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los rinocerontes del Zoo (cautividad) respecto a los de la Reserva (libertad), existiendo además una tendencia ($p=0,72$) entre los rinocerontes mantenidos en cautividad y semi-cautividad (Bioparc) (Gráfico 9).

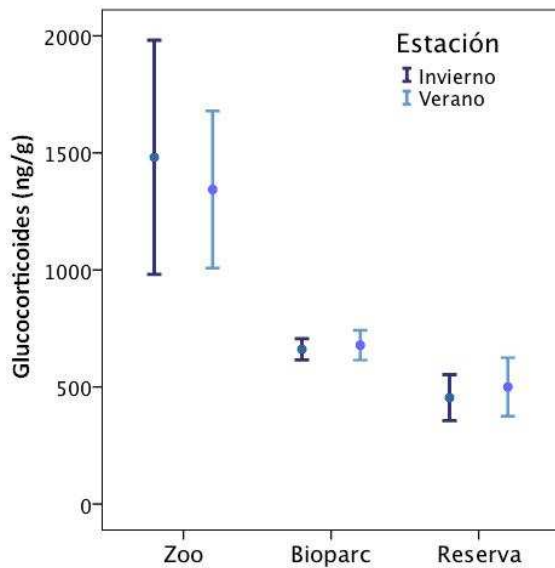
IV. Resultados



DATOS ESTADÍSTICOS DEL GRÁFICO		
Hábitat	N	Media ± ESM
Zoo	3	1.428,79±66,91
Bioparc	4	687,25±12,54
Reserva	8	446,38±27,86

Gráfico 9: Comparación de la media de la concentración de glucocorticoides (ng/g) entre los tres hábitats estudiados. Zoo (a): cautividad; Bioparc (b): semi-cautividad y Reserva (c): libertad. Datos estadísticos: valor medio de la concentración de glucocorticoides (ng/g) de los rinocerontes blancos según el hábitat estudiado (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

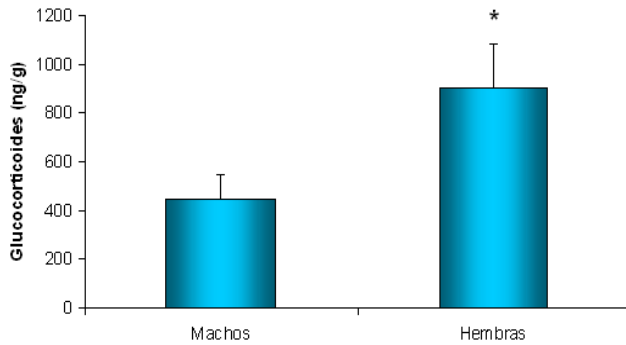
El análisis de los resultados de las concentraciones de glucocorticoides entre el factor hábitat y el factor estación, no revela diferencias estadísticamente significativas, siendo la media muy parecida entre ambas estaciones para cada hábitat del estudio (Gráfico 10).



DATOS ESTADÍSTICOS DEL GRÁFICO			
Hábitat	Estación	N	Media±ESM
Zoo	Invierno	3	1.481,30±500,25
	Verano		1.343,54±335,47
Bioparc	Invierno	4	660,98±45,21
	Verano		678,40±63,97
Reserva	Invierno	8	454,36±98,22
	Verano		500,26±124,84

Gráfico 10: Concentración de glucocorticoides entre invierno y verano en los tres hábitats del estudio. Datos estadísticos: valor medio de la concentración de glucocorticoides (ng/g) de los rinocerontes blancos según el hábitat y la estación (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

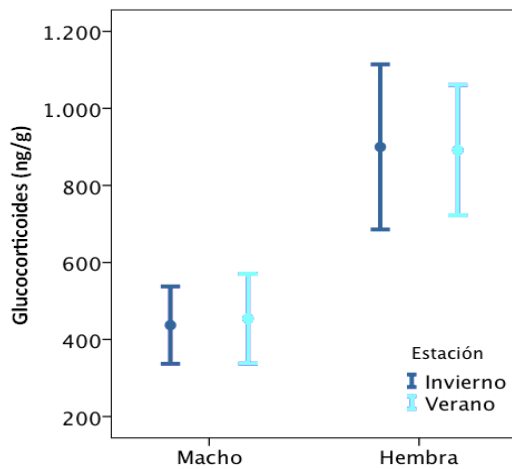
Encontramos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glucocorticoides según el sexo de los rinocerontes, siendo casi el doble en la hembras (Gráfico 11).



DATOS ESTADÍSTICOS DEL GRÁFICO		
Sexo	N	Media ± ESM
Machos	6	445,98±105,65
Hembras	9	901,77±187,27

Gráfico 11: Media de la concentración de glucocorticoides en machos y hembras (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media; *= $p < 0,05$).

En la comparación del factor sexo con la estación, observamos que tanto los machos como las hembras, presentan unas concentraciones de glucocorticoides muy similares tanto en invierno como en verano (Gráfico 12).

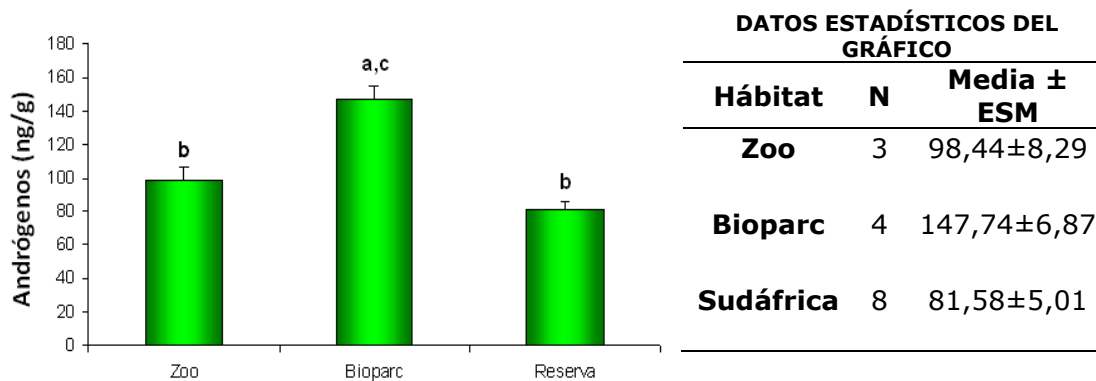


DATOS ESTADÍSTICOS DEL GRÁFICO			
Sexo	Estación	N	Media±ESM
Machos	Invierno	6	437,22±100,47
	Verano		453,92±116,45
Hembras	Invierno	9	899,93±214,39
	Verano		891,41±169,18

Gráfico 12: Concentración de glucocorticoides entre las estaciones de invierno y verano según el sexo de los rinocerontes. Datos estadísticos: valor medio de la concentración de los glucocorticoides (ng/g) de los rinocerontes según el sexo y la estación (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

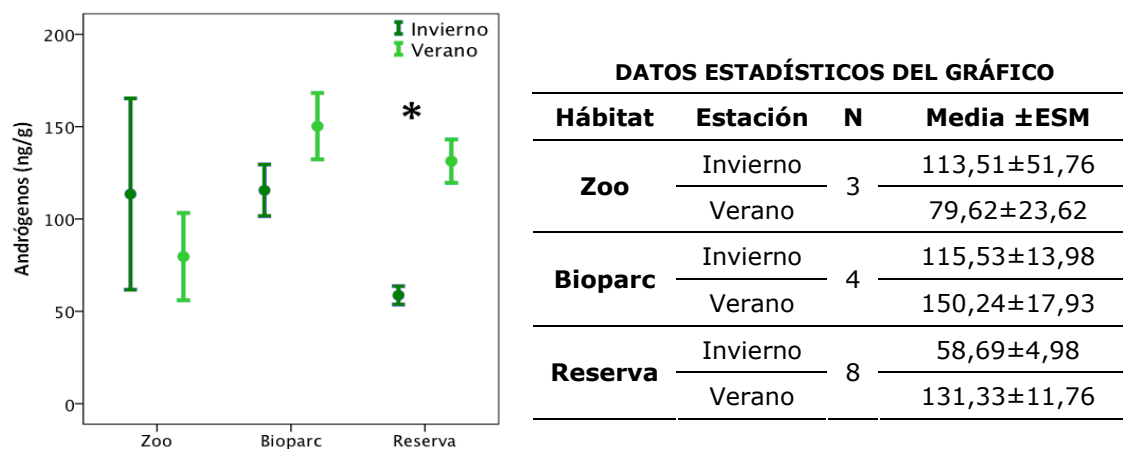
2.2. Andr6genos

La media de la concentraci6n de los andr6genos en los tres h6bitats del estudio, son significativamente diferentes entre los rinocerontes en cautividad y los rinocerontes en semi-cautividad, as6 como entre los rinocerontes en semi-cautividad y libertad. Sin embargo no encontramos diferencias significativas en los resultados de los rinocerontes en cautividad respecto a los que se encuentran en libertad (Gr6fico 13).



Gr6fico 13: Comparaci6n de la concentraci6n de andr6genos (ng/g) entre los tres h6bitats estudiados. Zoo: cautividad; Bioparc: semi-cautividad y Sud6frica: libertad. Datos estadísticos: valor medio de la concentraci6n de andr6genos (ng/g) de los rinocerontes blancos seg6n el h6bitat estudiado (N=Tamaño muestral; ESM=Error est6ndar de la media).

Los resultados de la media de los andr6genos en invierno y en verano, no son significativamente diferentes en el Zoo y la Reserva, sin embargo, en los rinocerontes de la reserva, el valor es estad6sticamente superior durante el verano sudafricano (Gr6fico 14).



Gr6fico 14: Concentraci6n de los andr6genos entre invierno y verano en los tres h6bitats del estudio. Datos estadísticos: valor medio de la concentraci6n de andr6genos (ng/g) de los rinocerontes blancos seg6n el h6bitat y la estaci6n (N=Tamaño muestral; ESM=Error est6ndar de la media).

No encontramos diferencias significativas en la concentración de los andrógenos entre machos y hembras aunque la media es superior en los machos (Gráfico 15).

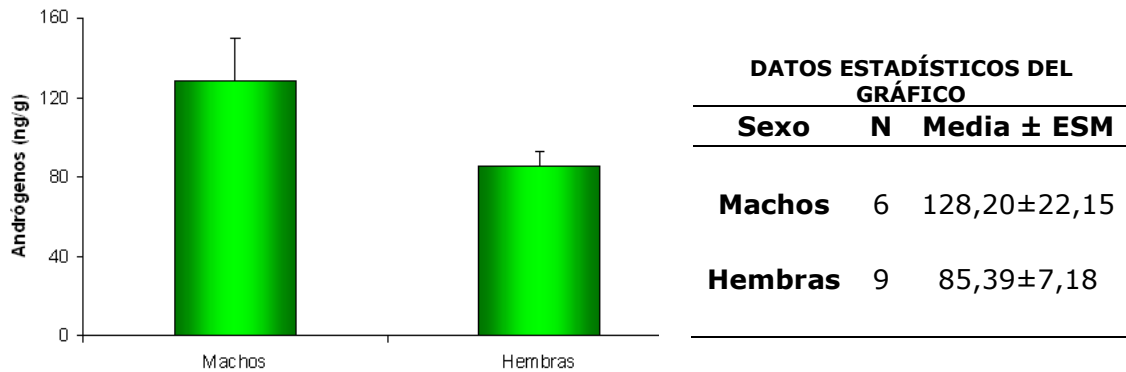


Gráfico 15: Media de la concentración de andrógenos en machos y hembras (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

Durante los meses de verano, la concentración de los andrógenos es significativamente superior, tanto en machos como en hembras (Gráfico 16).

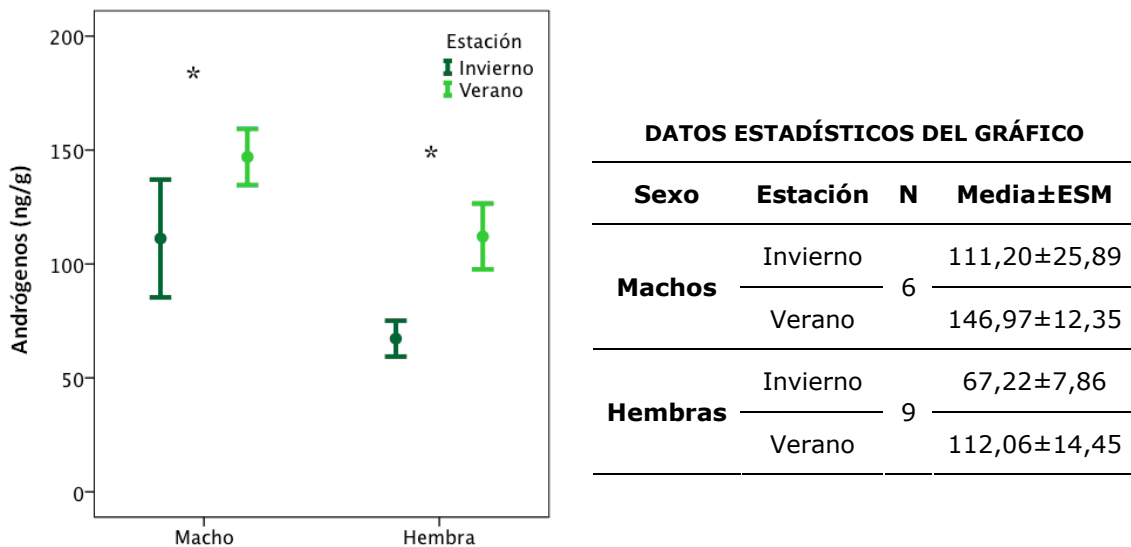


Gráfico 16: Concentración de andrógenos entre las estaciones de invierno y verano según el sexo de los rinocerontes. Datos estadísticos: valor medio de la concentración de los andrógenos (ng/g) de los rinocerontes según el sexo y la estación (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

2.3. Progestágenos

Los resultados de las medias de la concentración de los metabolitos de progestágenos en distintos hábitats, muestran diferencias significativas entre los rinocerontes mantenidos en cautividad con los rinocerontes en semi-cautividad y los rinocerontes en libertad, pero no se encontraron diferencias significativas entre los rinocerontes en semi-cautividad y libertad (Gráfico 17).

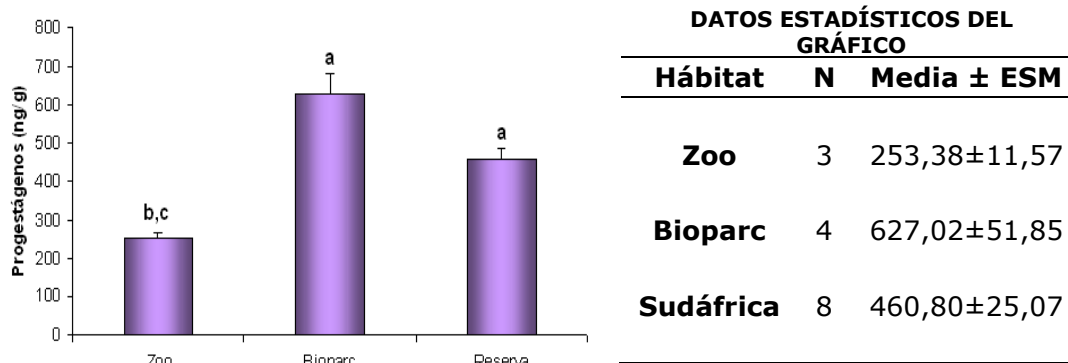


Gráfico 17: Comparación de la concentración de progestágenos (ng/g) entre los tres hábitats estudiados. Zoo (a): cautividad; Bioparc (b): semi-cautividad y Reserva (c): libertad (NS=No significativo). Datos estadísticos: Valor medio de la concentración de progestágenos (ng/g) de los rinocerontes blancos según el hábitat estudiado (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

En el análisis de los progestágenos respecto al factor estación en los tres hábitats del estudio, encontramos medias muy similares para ambas estaciones tanto en el Zoo como en el Bioparc. Sin embargo, en los rinocerontes de la Reserva, la media es significativamente superior durante el invierno sudafricano (Gráfico 18).

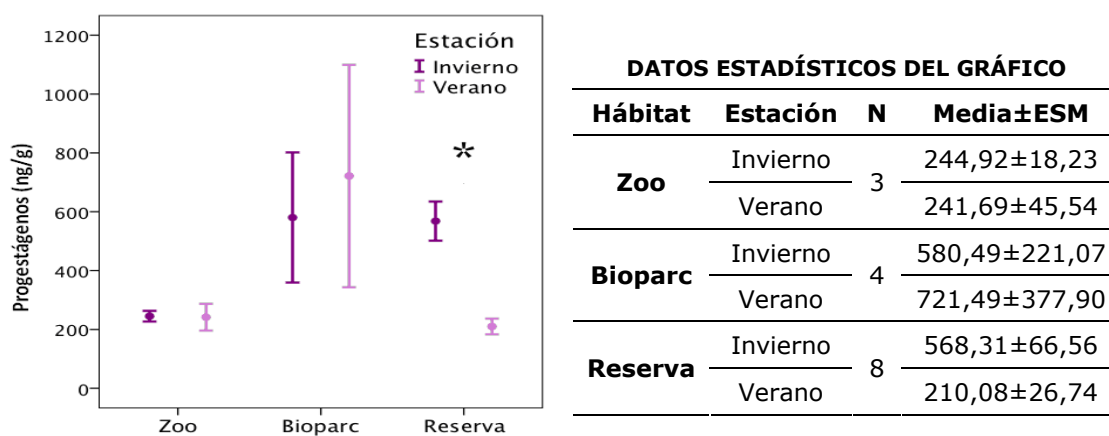


Gráfico 18: Concentración de progestágenos entre invierno y verano en los tres hábitats del estudio (*= $p < 0,05$). Datos estadísticos: valor medio de la concentración de progestágenos (ng/g) según la estación y el hábitat estudiado (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

La concentración de los progestágenos no difiere significativamente entre machos y hembras, siendo la media muy similar para ambos sexos (Gráfico 19).

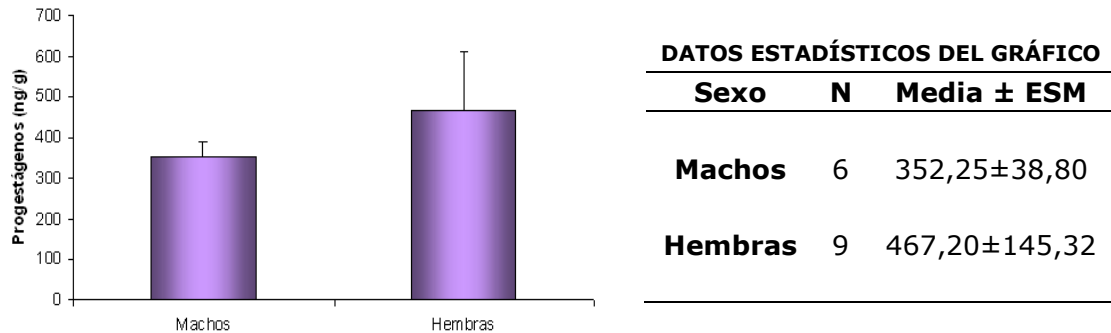


Gráfico 19: Media de la concentración de progestágenos en machos y hembras (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

Entre las estaciones de invierno y verano, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de los progestágenos ni en los machos ni en las hembras. Sin embargo, para ambos sexos, la concentración es superior durante los meses de invierno (Gráfico 20).

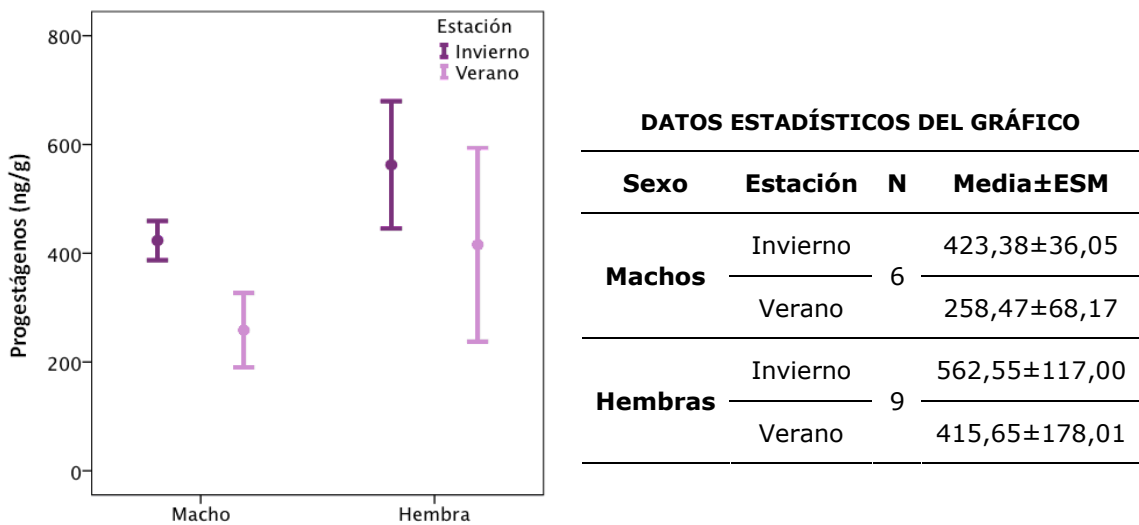


Gráfico 20: Concentración de progestágenos entre las estaciones de invierno y verano según el sexo de los rinocerontes. Datos estadísticos: valor medio de la concentración de los progestágenos (ng/g) de los rinocerontes según el sexo y la estación (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

2.4. Estrógenos

En los análisis de la concentración de estrógenos, encontramos diferencias significativas entre los rinocerontes del Zoo y los de la Reserva, así como entre los rinocerontes del Bioparc y la Reserva. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los rinocerontes del Zoo y los del Bioparc (Gráfico 21).

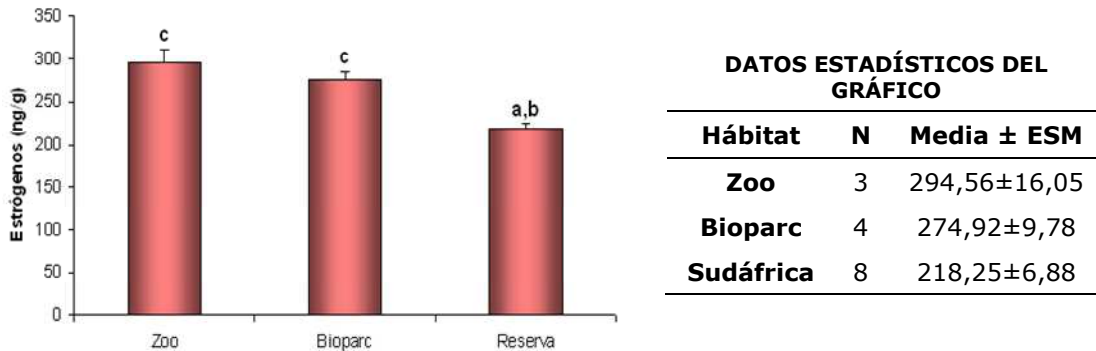


Gráfico 21: Comparación de la concentración de estrógenos (ng/g) entre los tres hábitats estudiados. Zoo (a): cautividad; Bioparc (b): semi-cautividad y Reserva (c): libertad. Datos estadísticos: valor medio de la concentración de estrógenos (ng/g) de los rinocerontes blancos según el hábitat estudiado (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

En los rinocerontes del Bioparc, la concentración de estrógenos es similar tanto en invierno como en verano. Sin embargo, observamos diferencias significativas en las concentraciones de los rinocerontes del Zoo y de la Reserva, siendo estadísticamente superior en verano para los rinocerontes en cautividad y en invierno para los rinocerontes en libertad (Gráfico 22).

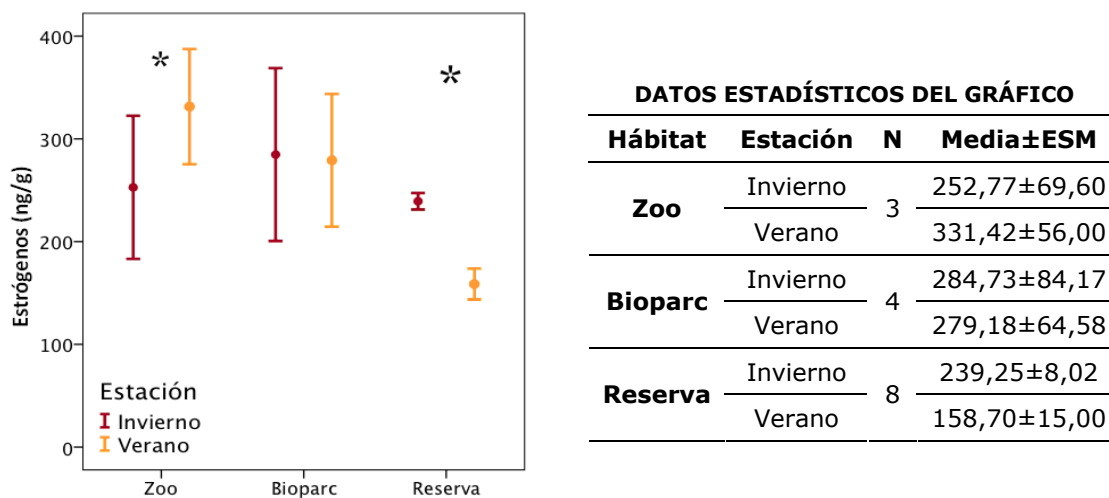
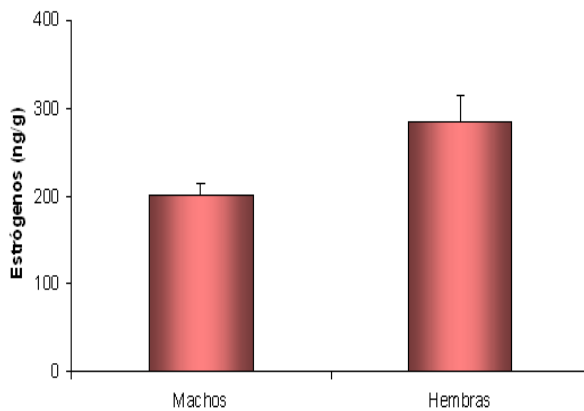


Gráfico 22: Concentración de estrógenos entre invierno y verano en los tres hábitats del estudio. Datos estadísticos: valor medio de la concentración de estrógenos (ng/g) de los rinocerontes blancos según el hábitat estudiado (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

La concentración de estrógenos no difiere significativamente entre machos y hembras de rinoceronte, siendo la media superior en las hembras (Gráfico 23).

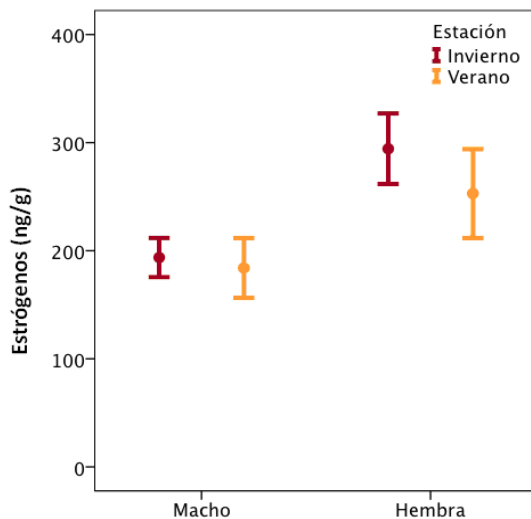


DATOS ESTADÍSTICOS DEL GRÁFICO

Sexo	N	Media ± ESM
Machos	6	200,02±14,90
Hembras	9	285,06±29,71

Gráfico 23: Media de la concentración de estrógenos en machos y hembras (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

La media de la concentración de estrógenos tanto en machos como en hembras, no es significativamente diferente entre invierno y verano (Gráfico 24).



DATOS ESTADÍSTICOS DEL GRÁFICO

Sexo	Estación	N	Media±ESM
Machos	Invierno	6	193,69±18,11
	Verano		184,06±27,76
Hembras	Invierno	9	294,35±32,68
	Verano		252,91±41,19

Gráfico 24: Concentración de estrógenos entre las estaciones de invierno y verano según el sexo de los rinocerontes. Datos estadísticos: valor medio de la concentración de estrógenos (ng/g) de los rinocerontes según el sexo y la estación (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

2.5. Determinación del sexo gonadal

Para la determinación del sexo gonadal, se emplearon tres modelos de regresión logística binaria con el fin de evaluar la capacidad predictiva de las concentraciones de andrógenos y estrógenos sobre el sexo del individuo. Los modelos se estimaron con las medias de cada sujeto (n=15) y posteriormente, con los parámetros de los modelos ajustados, se procedió a determinar el sexo esperado para cada una de las muestras individuales obtenidas (Tabla 8).

Modelo	Clasificación de los sujetos			Clasificación de las muestras			Punto de corte para macho*
	Hembras	Machos	Total	Hembras	Machos	Total	
I	88,9%	50,0%	73,3%	80,7%	68,3%	74,9%	A > 0,47 E
II	88,9%	83,3%	86,7%	76,0%	72,9%	74,6%	A > 1,46 E - 222
III	88,9%	83,3%	86,7%	70,0%	64,1%	67,3%	A > (49,5 - 0,26E) / (0,24 - 0,001E)

Tabla 8: Modelos de regresión logística binaria para evaluar la capacidad predictiva de las concentraciones de andrógenos y estrógenos sobre el sexo del individuo (*= probabilidad del 50%: hembra<50%>macho; A= andrógenos; E= Estrógenos).

Los resultados muestran una mejor predicción del modelo I y del modelo II (74,9 y 74,6% respectivamente), por lo que se descartó el modelo III. Dado que los modelos permiten predecir el sexo de los individuos a través las concentraciones relativas de andrógenos y estrógenos, las características individuales de cada animal pueden hacer que en las muestras de determinados sujetos sea más sencillo atribuir el sexo del individuo que en otros. Para evaluar esto, calculamos los porcentajes de clasificación de las muestras de cada individuo, pudiendo realizar así un análisis más detallado y discutir los posibles factores que podrían estar implicados (Tabla 9).

Sujeto	Nº de muestras	Modelo I	Modelo II
		Porcentaje	Porcentaje
Marina	46	71,7	45,7
Hembra Vieja	46	89,1	91,3
Nombula	62	80,6	80,6
Maiai	69	91,3	91,3
Cow 7	19	81,3	81,3
Cow 17	14	76,9	76,9
Stompstert	12	50,0	41,7
Rodgie	21	76,2	66,7
TDI	15	66,7	66,7
Macho	37	58,8	52,9
Rómulo	70	98,6	98,6
Cirilo	85	85,7	85,7
Bull 15.3.1	25	28,0	48,0
Bull 17.4.1	28	14,8	33,3
Bull 17.6	23	31,8	50,0

Tabla 9: Porcentaje de clasificación de las muestras obtenidas de cada sujeto por los modelos I y II.

Como podemos observar en la tabla 9, cada modelo presenta variación individual en los resultados de la determinación del sexo en base a la concentración de andrógenos y estrógenos, obteniendo mayores o menores porcentajes de aciertos según el animal.

3. GLUCOCORTICOIDES

3.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo)

En los resultados de los análisis de las concentraciones de glucocorticoides en las heces de los rinocerontes del Parque Zoológico de Madrid, encontramos diferencias significativas entre las dos hembras y entre los tres animales de este hábitat (Gráfico 29). La media de la concentración de glucocorticoides que encontramos en la Hembra Vieja, es significativamente superior al resto de rinocerontes de este hábitat (Gráfico 25).

IV. Resultados

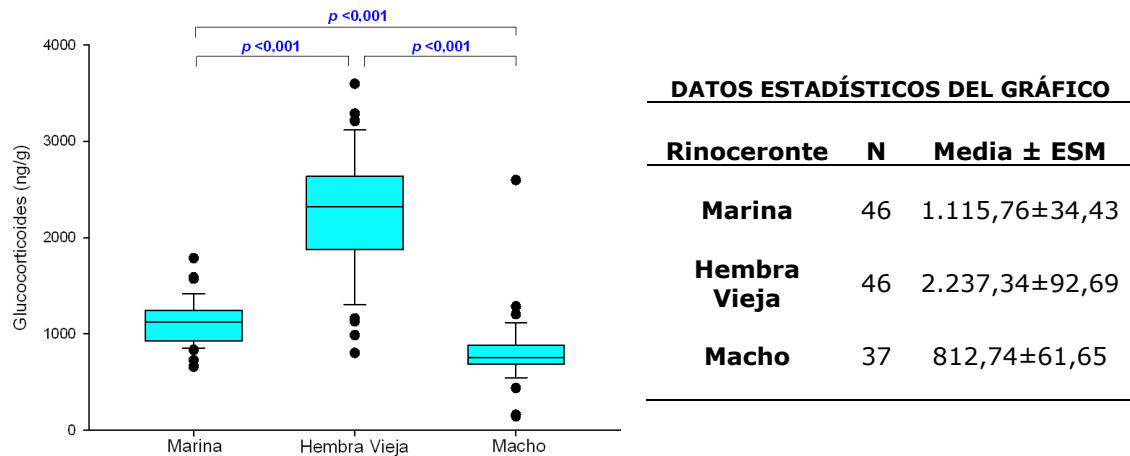


Gráfico 25: Comparación de la concentración de glucocorticoides (ng/g) entre el macho y las dos hembras de rinoceronte blanco en cautividad (p =Nivel de significación). Datos estadísticos: valor medio de la concentración de glucocorticoides en los tres rinocerontes del Zoo (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

En estos tres rinocerontes, no se ha observado ningún tipo de comportamiento territorial ni dominante. Solo hay un macho y las dos hembras se encuentran separadas, por lo que tampoco se ha observado ningún comportamiento reproductivo destacable en ninguno de los animales.

En el perfil hormonal de la concentración de glucocorticoides que presentan los rinocerontes mantenidos en cautividad (Zoo), observamos como los niveles de la Hembra Vieja son los más elevados, mientras que los de Marina y el macho, son similares (Gráfico 26). No encontramos ninguna correlación significativa entre los distintos perfiles hormonales de glucocorticoides.

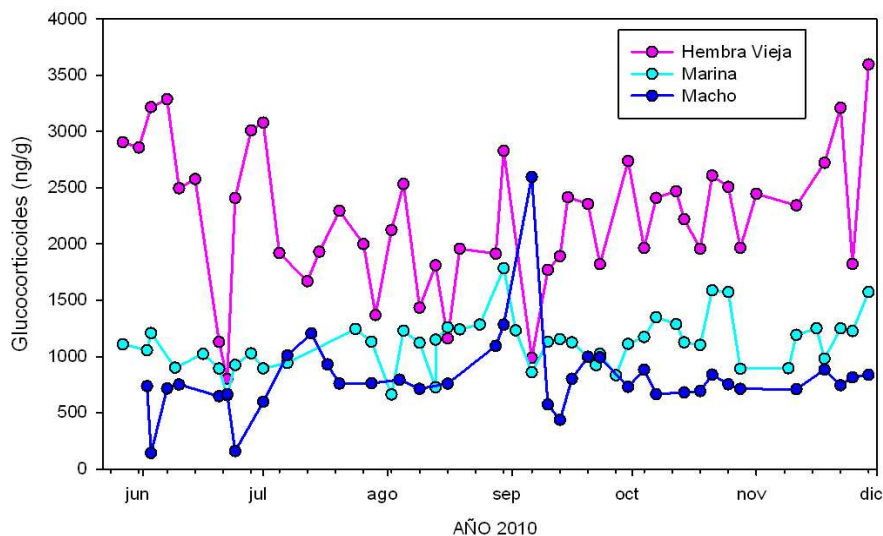


Gráfico 26: Perfil hormonal de los glucocorticoides de las hembras (izquierda) y el macho (derecha) del Zoo de Madrid (cautividad).

3.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)

En los resultados de los análisis de las concentraciones de los glucocorticoides en las heces de los rinocerontes del Bioparc de Valencia, no encontramos diferencias significativas entre las dos hembras (Gráfico 27 a, Tabla d), sin embargo, encontramos diferencias significativas entre los dos machos (Gráfico 28 b, Tabla d), siendo Cirilo el que presenta una media superior de glucocorticoides.

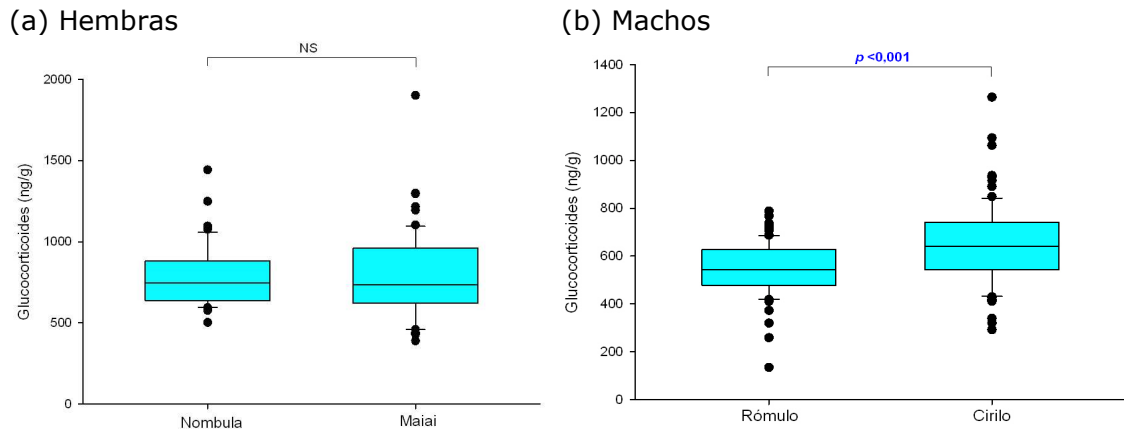


Gráfico 27: Diferencia de la media de glucocorticoides entre las dos hembras (a), Nombula y Maiai y entre los dos machos (b), Rómulo y Cirilo, en semi-cautividad (NS=No significativo, p =Nivel de significación).

	Nombula	Maiai	Cirilo	Rómulo	Rinoceronte	N	Media±ESM
Nombula	--	NS	***	***	Nombula	62	790,17±23,13
Maiai	NS	--	***	***	Maiai	69	790,12±31,14
Cirilo	***	***	--	***	Cirilo	85	645,44±18,32
Rómulo	***	***	***	--	Rómulo	70	545,46±13,62

Datos estadísticos del gráfico 27: Nivel de significación en la comparación de la media de la concentración de glucocorticoides entre los cuatro rinocerontes en semi-cautividad (c); Valor medio de la concentración de glucocorticoides de cada rinoceronte en semi-cautividad (d) (NS= no significativo; ***= $p < 0,001$; N=Número de muestras; ESM=error estándar de la media).

Se ha observado cierta dominancia de una de las hembras, Nombula, sobre la otra (Maiai), inclusive sobre el macho que convive con ellas (Cirilo). Rómulo es el macho que se encuentra separado por ser muy agresivo con el resto de rinocerontes y que además presenta una desarrollada estereotipia.

IV. Resultados

Los perfiles hormonales de la concentración de los glucocorticoides de las dos hembras, muestran bastante similitud, siendo Nombula la que mantiene unos niveles más estables, mientras Maiai presenta más cambios puntuales (Gráfico 28).

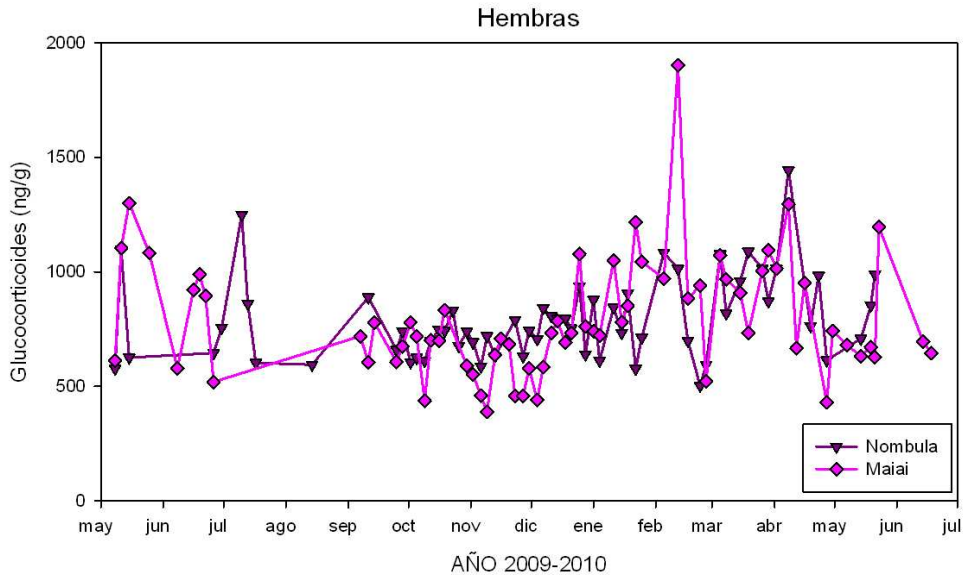


Gráfico 28: Perfil hormonal de los glucocorticoides de las hembras de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).

En los machos, es Rómulo el que mantiene unos niveles de glucocorticoides inferiores a los de Cirilo. Además, el perfil de Cirilo presenta más picos de variación hormonal (Gráfico 29).

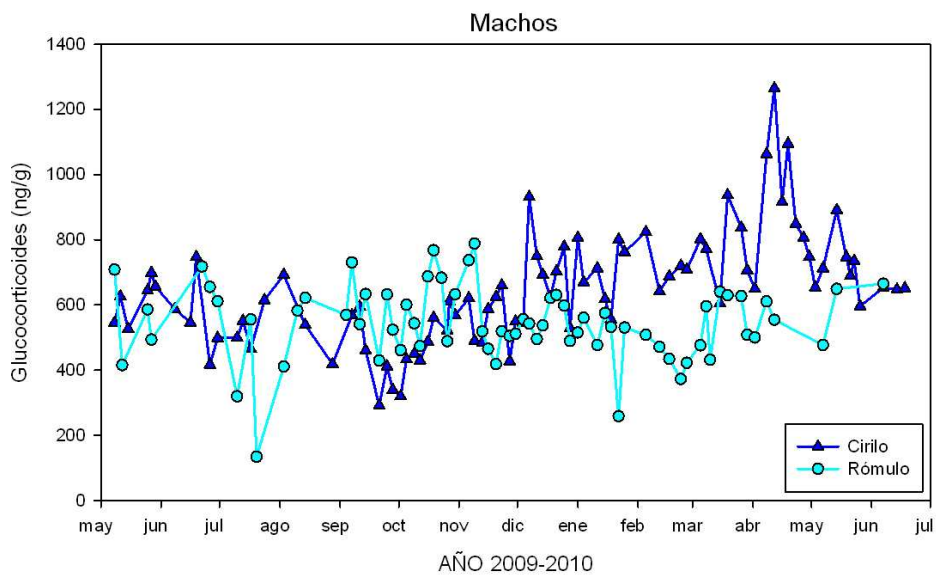


Gráfico 29: Perfil hormonal de los glucocorticoides de los machos de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).

Las correlaciones obtenidas entre estos rinocerontes se detallan en la tabla 10, donde se muestra una correlación positiva estadísticamente significativa entre los tres rinocerontes que conviven juntos (Nombula, Maiai y Cirilo).

GLUCOCORTICOIDES					
Nombula/ Maiai	Nombula/ Rómulo	Nombula/ Cirilo	Maiai/ Rómulo	Maiai/ Cirilo	Rómulo/ Cirilo
Corr.+ (*)	NS	Corr.+ (*)	Corr.- (*)	Corr.+ (*)	NS

Tabla 10: Resumen de la correlación entre la concentración de glucocorticoides y los distintos rinocerontes del Bioparc. Corr.+ = Correlación positiva; Corr.- = Correlación negativa (NS= No significativo; *= $p < 0,05$).

3.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

Los resultados de las concentraciones de glucocorticoides son significativamente diferentes entre casi todos los individuos que se encuentran en libertad. Los valores para las hembras se muestran en el gráfico 30 (a) y la estadística comparativa entre ellas en la tabla 11. Los valores obtenidos para los machos se detallan en el gráfico 30 (b) con sus correspondientes niveles de significación entre ellos.

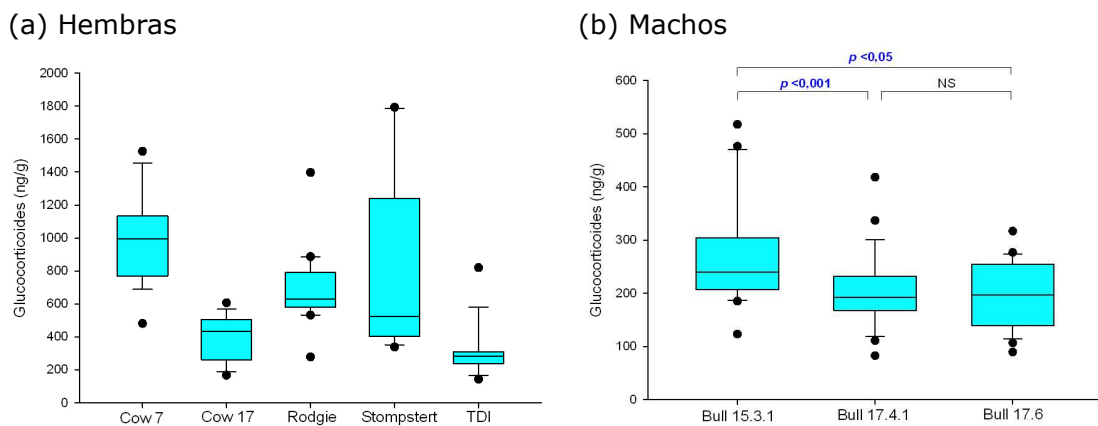


Gráfico 30: Diferencia de la media de glucocorticoides entre las cinco hembras (a) y los tres machos (b) en libertad (p =Nivel de significación; NS=No significativo).

	COW 7	COW 17	RODIE	STOMPSTERT	TDI
COW 7	--	***	***	NS	***
COW 17	***	--	***	*	NS
RODIE	***	***	--	NS	***
STOMPSTERT	NS	*	NS	--	***
TDI	***	NS	***	***	--

Tabla 11: Diferencias estadísticas entre la media de glucocorticoides de las cinco hembras en libertad (NS= No significativo; *= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$).

Entre los machos, destaca Bull 15.3.1 con una media de glucocorticoides superior a los otros dos machos. Entre las hembras, Cow 7 y Stompstert son las que tienen una media de glucocorticoides superior. Los valores del valor medio de la concentración de glucocorticoides para cada animal de este hábitat, se muestran en la siguiente tabla (Tabla 12):

Rinoceronte	N	Media±ESM
Bull 15.3.1	25	268,38±19,16
Bull 17.4.1	28	203,25±13,03
Bull 17.6	23	200,63±12,57
Cow 7	19	989,12±62,76
Cow 17	14	388,93±37,65
Cow Rodgie	21	692,51±46,98
Cow Stompstert	12	797,88±156,05
Cow TDI	15	314,07±40,32

Tabla 12: Valor medio de la concentración de glucocorticoides de cada uno de los rinocerontes en libertad (N=Tamaño muestral; ESM= Error estándar de la media).

Se observó el comportamiento en libertad de todos los rinocerontes de este hábitat confirmando la existencia de un solo macho territorial (Bull 17.6). También se vieron diversos grupos de rinocerontes que acostumbraban a caminar juntos. Rodgie, su cría, Bull 17.4.1 y Bull 15.3.1 formaban el grupo más numeroso que rara vez se encontraban caminando separados. En los últimos meses de este estudio, Bull 17.4.1 comenzó su vida en solitario, empezando también a marcar territorio. Las madres, siempre acompañadas de sus crías (las que tenían), a veces se encontraban en grupo. Una de las hembras más solitarias a lo largo del estudio, fue Cow Stompstert, que coincide con el escaso número de muestras obtenido.

Los perfiles hormonales de las hembras para las dos estaciones se detallan en el gráfico 31, donde podemos observar que entre ellas, Cow TDI es la que mantiene sus niveles más constantes durante prácticamente todo el estudio, mientras que Cow 7 es la que presenta la mayor concentración.

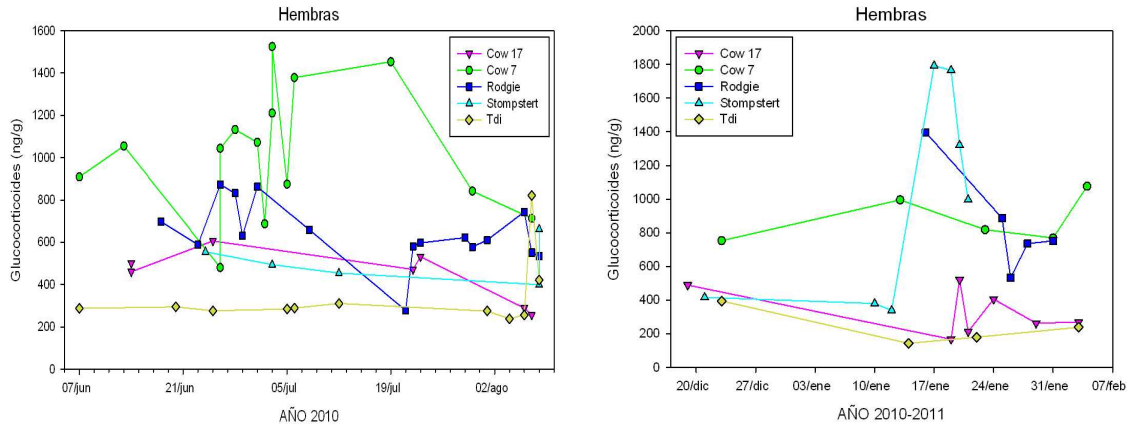


Gráfico 31: Perfil hormonal de los glucocorticoides de las cinco hembras en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva).

En los perfiles hormonales de los machos para las dos estaciones, observamos concentraciones muy similares entre ellos durante el invierno, siendo más variables en verano (Gráfico 32).

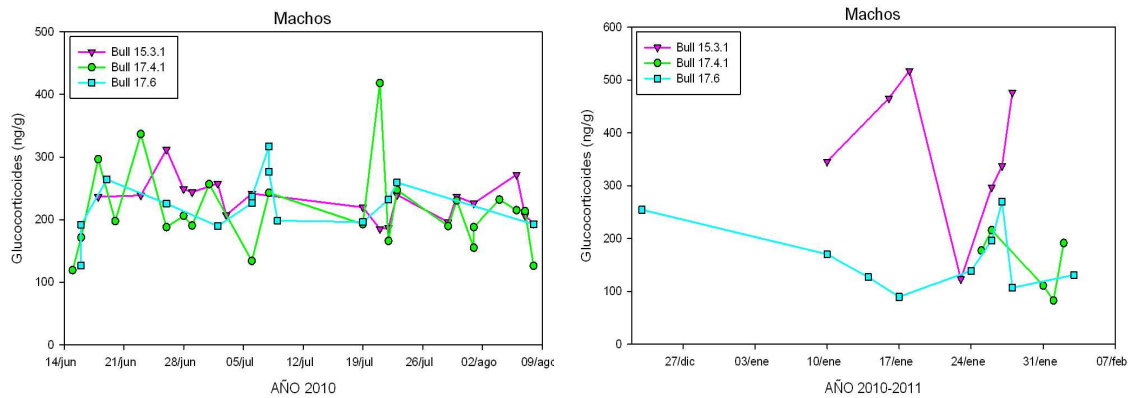


Gráfico 32: Perfil hormonal de los glucocorticoides de los tres machos en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva).

Los resultados de las correlaciones de los glucocorticoides de los rinocerontes en libertad, solo fueron significativos para los animales que aparecen en la siguiente tabla (Tabla 13):

GLUCOCORTICOIDES			
Stompstert/ TDI	Stompstert/ Bull 15.3.1	Bull 17.6/ Bull 17.4.1	Bull 17.6/ Rodgie
Corr.+ (*)	Corr.- (*)	Corr.+ (*)	Corr.- (*)

Tabla 13: Resumen de la correlación de la concentración de glucocorticoides entre los distintos rinocerontes de la Reserva (Corr.+ = Correlación positiva; Corr.- = Correlación negativa; *= $p < 0,05$).

4. ANDRÓGENOS

4.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo)

La media de los resultados de la concentración de los andrógenos es estadísticamente diferente entre los tres rinocerontes de este hábitat, siendo el macho el que presenta la mayor concentración de andrógenos (Gráfico 33).

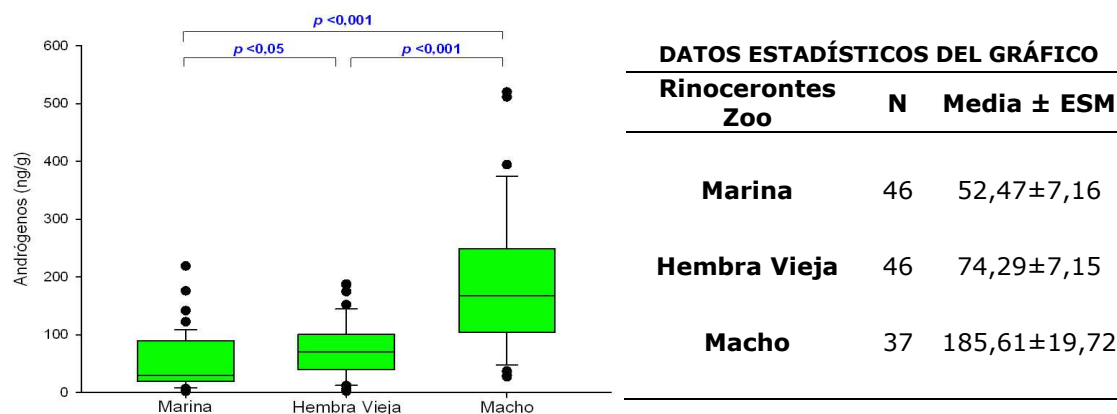


Gráfico 33: Comparación de la concentración de andrógenos (ng/g) entre los tres rinocerontes mantenidos en cautividad (p =Nivel de significación). Datos estadísticos: valor medio de la concentración de andrógenos de cada rinoceronte mantenido en cautividad (N =Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

Los perfiles hormonales de las hembras y el macho se representan en el gráfico 34, donde observamos una correlación negativa estadísticamente significativa entre Marina y la Hembra Vieja ($p < 0,05$).

La Hembra Vieja presenta concentraciones significativamente diferentes entre invierno ($39,03 \pm 10,55$ ng/g) y verano ($75,38 \pm 10,84$ ng/g), al igual que Marina (invierno: $88,47 \pm 14,47$ ng/g; verano: $40,99 \pm 11,70$ ng/g).

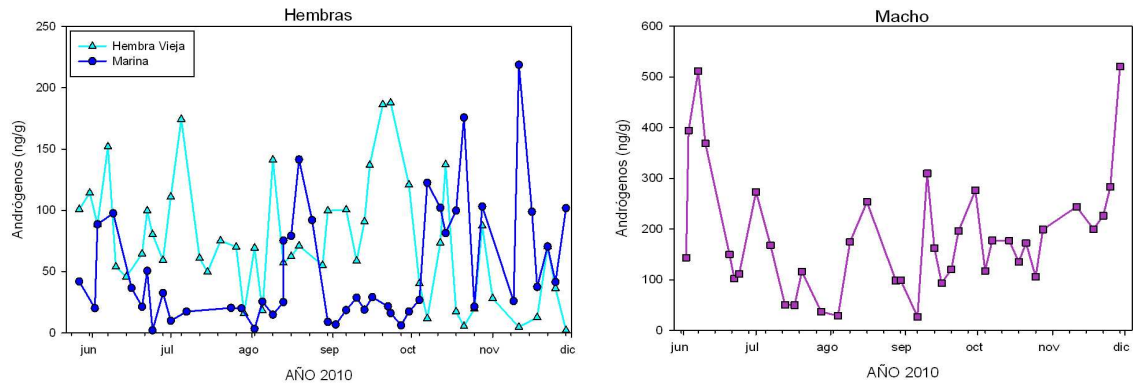
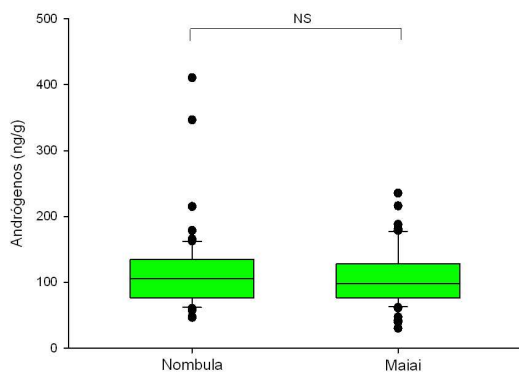


Gráfico 34: Perfil hormonal de los andrógenos de las dos hembras (izquierda) y el macho (derecha) mantenidos en cautividad (Zoo).

4.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)

En los resultados de la concentración de andrógenos entre las dos hembras y los dos machos, no encontramos diferencias significativas (Gráfico 35 a y b). Sin embargo, encontramos diferencias significativas entre los distintos animales de este hábitat, independientemente del factor sexo (Tabla 14).

(a) Hembras



(b) Machos

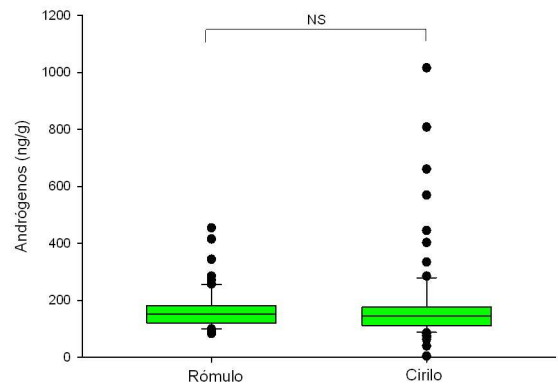


Gráfico 35: Comparación de la concentración de andrógenos (ng/g) entre Nombula y Maiai (a) y Rómulo y Cirilo (b) (NS= No significativo).

(c)

	Nombula	Maiai	Cirilo	Rómulo
Nombula	--	NS	***	***
Maiai	NS	--	***	***
Cirilo	***	***	--	NS
Rómulo	***	***	NS	--

(d)

Rinocerontes Bioparc	N	Media ± ESM
Nombula	62	113,90±7,73
Maiai	69	106,28±5,08
Rómulo	70	164,52±8,33
Cirilo	85	180,43±16,50

Tabla 14: Nivel de significación en la comparación de la media de la concentración de andrógenos entre los cuatro rinocerontes en semi-cautividad (NS= no significativo; ***= $p < 0,001$). Datos estadísticos del gráfico 35: valor medio de la concentración de andrógenos de cada rinoceronte en semi-cautividad (N=Número de muestras; ESM=error estándar de la media).

El perfil hormonal de las dos hembras es similar, siendo Nombula la que presenta una media de andrógenos más elevada (Gráfico 36).

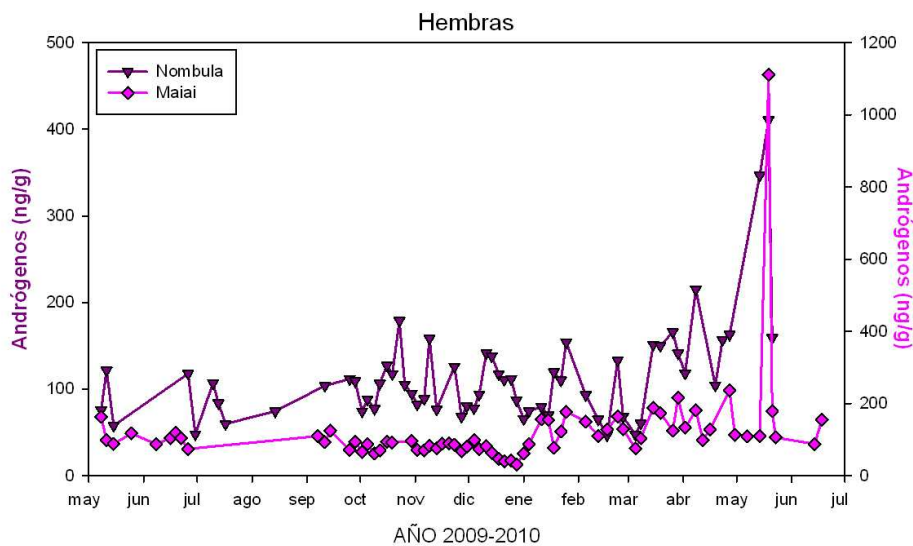


Gráfico 36: Perfil hormonal de los andrógenos de las hembras de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).

En el caso de los machos, es Cirilo el que tiene más elevados y estables los niveles de andrógenos mientras Rómulo presenta más variabilidad (Gráfico 37).

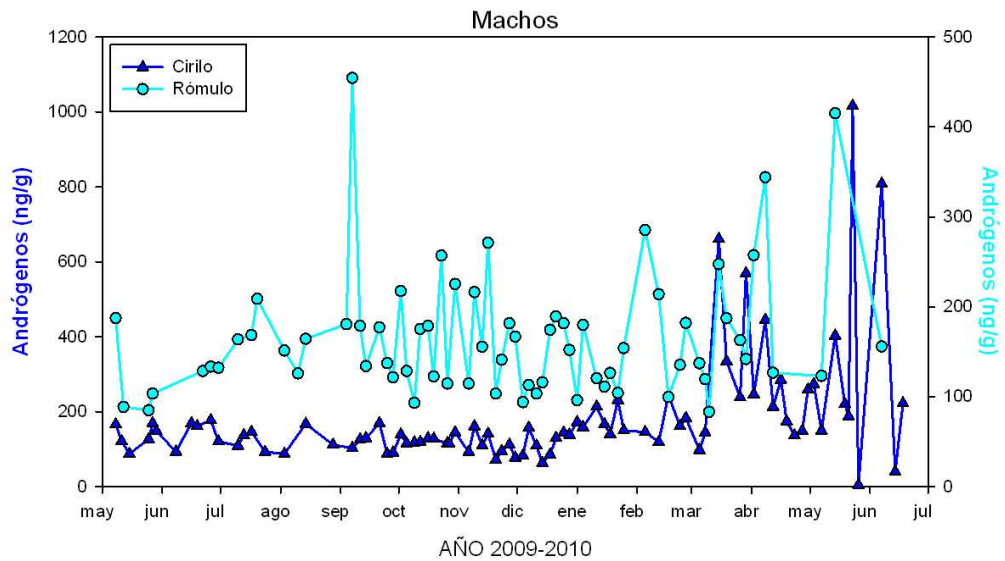


Gráfico 37: Perfil hormonal de los andrógenos de los machos de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).

Existen correlaciones hormonales estadísticamente significativas entre los tres rinocerontes que viven juntos (Tabla 15).

ANDRÓGENOS					
Nombula/ Maiai	Nombula/ Rómulo	Nombula/ Cirilo	Maiai/ Rómulo	Maiai/ Cirilo	Rómulo/ Cirilo
Corr.+ (***)	NS	Corr.+ (*)	NS	Corr.+ (*)	NS

Tabla 15: Resumen de la correlación de la concentración de andrógenos entre los distintos rinocerontes del Bioparc (Corr.+ = Correlación positiva; Corr.- = Correlación negativa; NS= No significativo; *= $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$).

4.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

La media de la concentración de andrógenos entre las distintas hembras estudiadas en este hábitat no difiere significativamente entre unas y otras (Gráfico 38a). En cuanto a los resultados de los machos, tampoco encontramos diferencias significativas entre ninguno de ellos (Gráfico 38b).

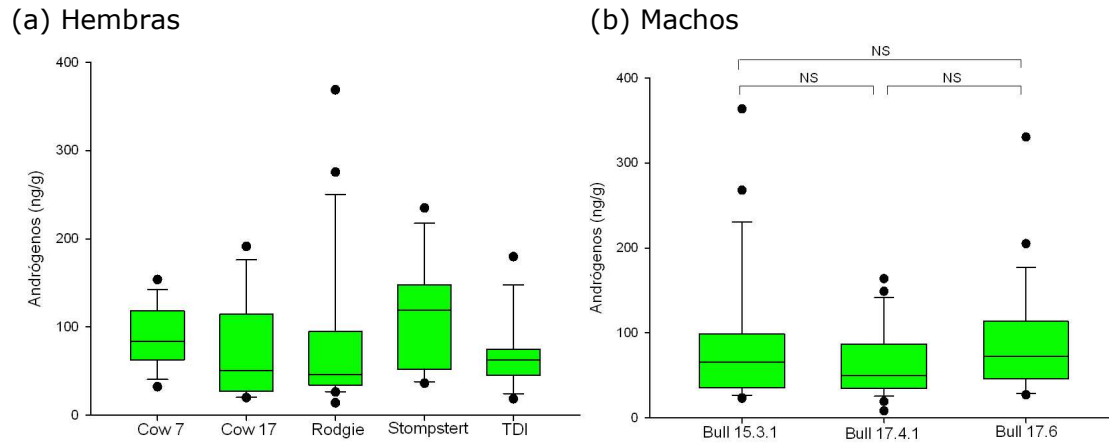


Gráfico 38: Comparación entre invierno y verano de la media de la concentración de andrógenos (ng/g) de cada hembra (a) y cada macho (b) de los rinocerontes en libertad (NS= No significativo).

Los resultados de la media de la concentración de andrógenos para cada rinoceronte mantenido en libertad, se muestran en la siguiente tabla (Tabla 16) junto al error estándar de la media (ESM). Cow Rodgie es la hembra que presenta la concentración más elevada, mientras que en los machos, es Bull 17.6.

Rinoceronte	N	Media±ESM
Bull 15.3.1	25	86,12±16,15
Bull 17.4.1	28	65,92±8,09
Bull 17.6	23	86,61±14,14
Cow 7	19	86,66±8,10
Cow 17	14	72,09±14,81
Cow Rodgie	21	81,65±19,19
Cow Stompstert	12	113,03±17,88
Cow TDI	15	68,11±10,26

Tabla 16: Valor medio de la concentración de andrógenos (ng/g) de cada uno de los rinocerontes en libertad (N=Tamaño muestral; ESM= Error estándar de la media).

En los perfiles hormonales de las hembras (Gráfico 39) y de los machos (Gráfico 40) en invierno y verano, cabe destacar cierta similitud de perfiles entre algunos individuos.

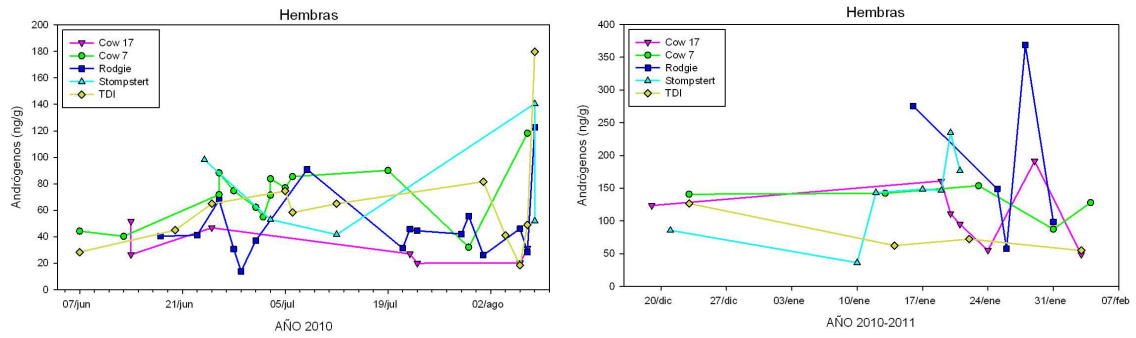


Gráfico 39: Perfil hormonal de los andrógenos de las cinco hembras en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva).

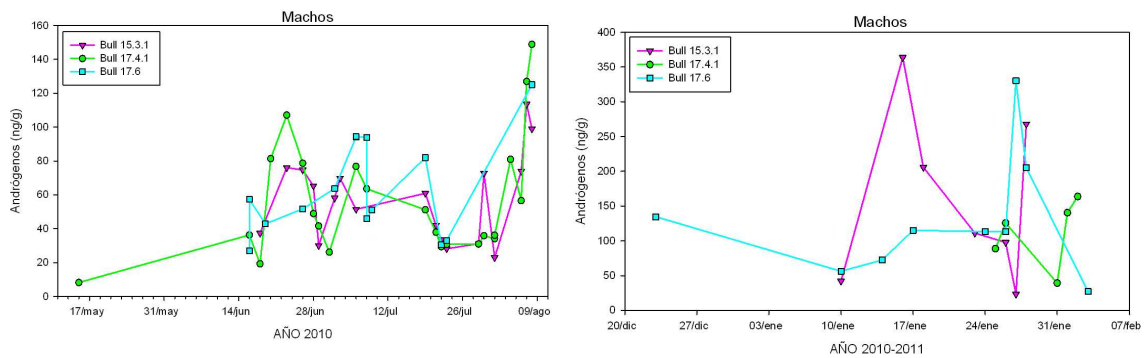


Gráfico 40: Perfil hormonal de los andrógenos de los tres machos en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva).

Por ello, observamos correlaciones positivas estadísticamente significativas entre los siguientes rinocerontes (Tabla 17):

ANDRÓGENOS					
Bull 15.3.1/ Bull 17.6	Stompstert/ Cow 17	Stompstert/ Cow 7	Cow 7/ Rodgie	Cow 7/ Bull 17.6	Bull 15.3.1/ Rodgie
Corr.+ (*)	Corr.+ (*)	Corr.+ (*)	Corr.+ (*)	Corr.+ (*)	Corr.+ (***)

Tabla 17: Resumen de la correlación en la concentración de andrógenos entre los distintos rinocerontes de la Reserva (Corr.+ = Correlación positiva; Corr.- = Correlación negativa; NS= No significativo; *= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$).

5. PROGESTÁGENOS

5.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo)

En los resultados de los análisis de las concentraciones de los progestágenos en las heces de los rinocerontes del Zoo de Madrid, encontramos diferencias significativas entre las dos hembras y entre la Hembra Vieja y el macho, no existiendo diferencias significativas entre Marina y el macho (Gráfico 41).

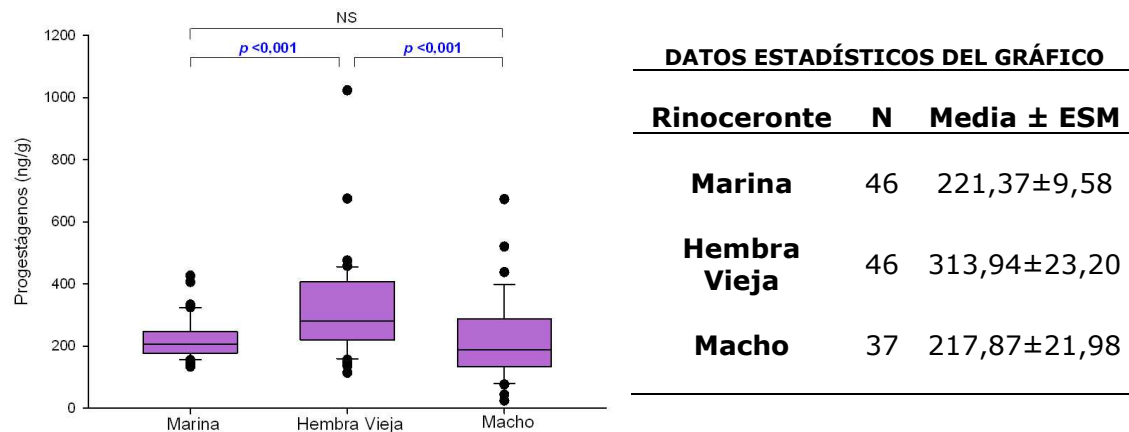


Gráfico 41: Comparación de la concentración de progestágenos (ng/g) entre el macho y las dos hembras de rinoceronte blanco en cautividad (p =Nivel de significación). Datos estadísticos: valor medio de la concentración de progestágenos en los tres rinocerontes del Zoo (N =Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

Los perfiles de los progestágenos de las dos hembras se muestran en el gráfico 42, donde podemos observar ocho ciclos hormonales de la Hembra Vieja que se producen con una media de $21,00 \pm 1,68$ días y seis en Marina, con una media de $27,20 \pm 2,25$ días.

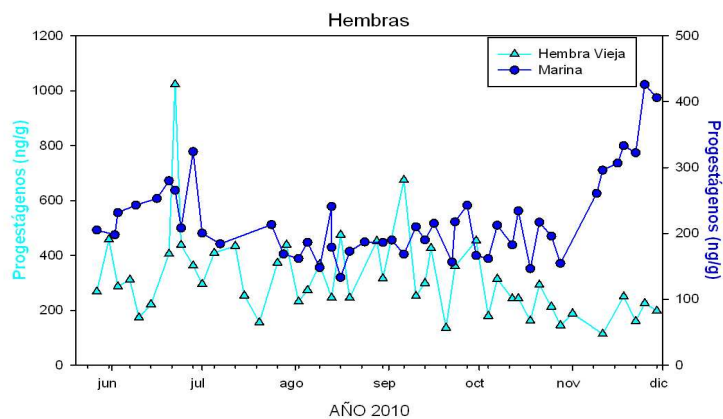


Gráfico 42: Perfil hormonal de los progestágenos de las dos hembras (izquierda) y el macho (derecha) mantenidos en cautividad (Zoo).

El perfil hormonal de los progestágenos para el macho, se muestran en el gráfico 43.

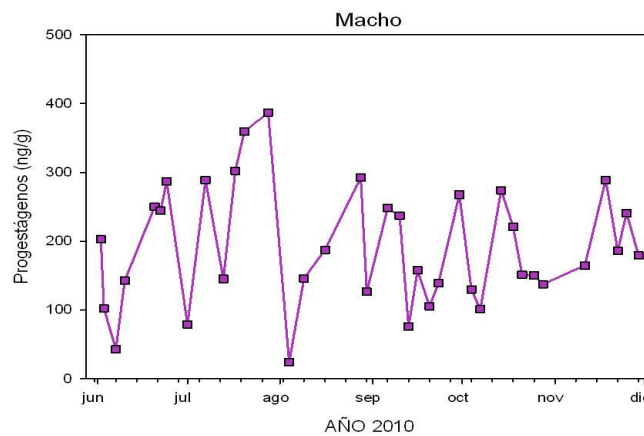


Gráfico 43: Perfil hormonal de los progestágenos del rinoceronte macho del Zoo.

No encontramos ninguna correlación estadísticamente significativa entre los perfiles hormonales de los progestágenos de los rinocerontes de este hábitat.

5.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)

En los resultados de los análisis de las concentraciones de los progestágenos en las heces de los rinocerontes del Bioparc de Valencia, encontramos diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las dos hembras (Gráfico 44a), siendo la media de la concentración de Nombula aproximadamente cinco veces superior a la de Maiai. También encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos machos (Gráfico 44b), siendo Rómulo, el que presenta una media de progestágenos superior a Cirilo.

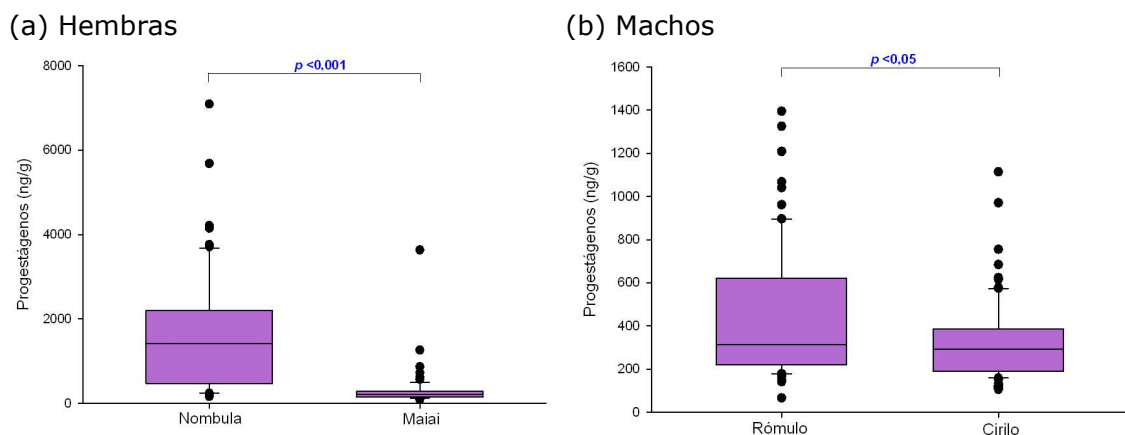


Gráfico 44: Comparación de la concentración de progestágenos (ng/g) entre Nombula y Maiai (a) y entre Rómulo y Cirilo (b) (p =Nivel de significación).

IV. Resultados

En la siguiente tabla (Tabla 18) se muestran las diferencias significativas encontradas entre los distintos animales de este hábitat. La concentración de los progestágenos es significativamente diferente entre todos los individuos.

	(c)				(d)		
	Nombula	Maiai	Cirilo	Rómulo	Rinocerontes Bioparc	N	Media ± ESM
Nombula	--	***	***	***	Nombula	62	1.608,83±177,42
Maiai	***	--	***	***	Maiai	69	306,14±53,96
Cirilo	***	***	--	*	Rómulo	70	441,97±36,70
Rómulo	***	***	*	--	Cirilo	85	323,75±19,77

Tabla 18: Nivel de significación en la comparación de la media de la concentración de progestágenos entre los cuatro rinocerontes en semi-cautividad (*= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$). Datos estadísticos del gráfico 44: valor medio de la concentración de progestágenos de cada rinoceronte en semi-cautividad (N=Número de muestras; ESM=error estándar de la media).

Con el perfil hormonal de las dos hembras del Bioparc, observamos como Nombula presenta ciclos con una media de $32,90 \pm 3,37$ días, mientras Maiai no cicla con regularidad ($94,33 \pm 29,58$ días) encontrando tan sólo picos puntuales de progestágenos en determinados días (Gráfico 45). Existiendo además, una correlación positiva estadísticamente significativa entre ambas ($p < 0,01$).

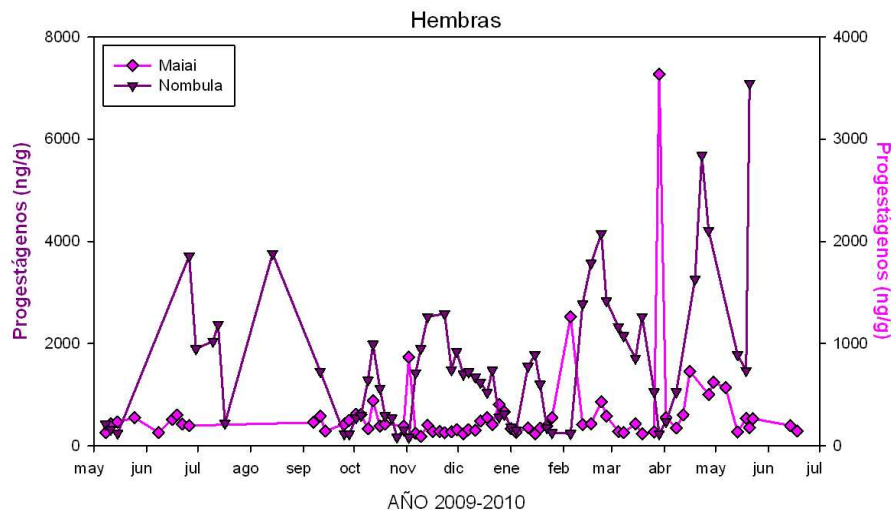


Gráfico 45: Perfil hormonal de los progestágenos de las hembras de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).

En los perfiles de los machos, observamos cómo Rómulo tiene una media superior de progestágenos durante el verano (569,07 ± 76,68 ng/g) respecto al invierno (403,73 ± 56,73 ng/g) justo al contrario que Cirilo, cuya media es superior en invierno (484,11 ± 46,08 ng/g) que en los meses de verano (255,90 ± 21,34 ng/g) (Gráfico 46).

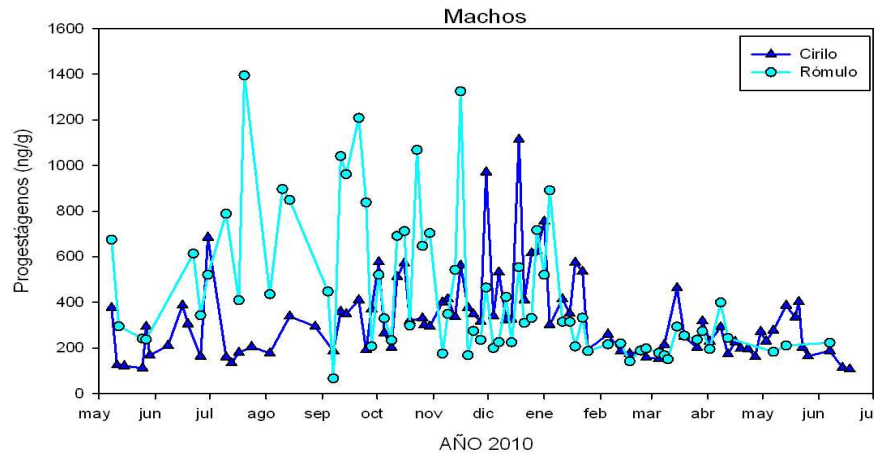
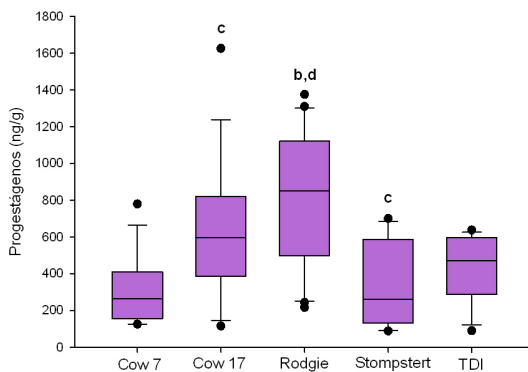


Gráfico 46: Perfil hormonal de los progestágenos de los machos de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).

5.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

La media de la concentración de progestágenos entre las distintas hembras estudiadas en este hábitat no difiere mucho entre unas y otras, encontrando diferencias significativas solo entre Rodgie y Cow 17; Rodgie y Stompstert (Gráfico 47 izquierda). En cuanto a los resultados de los machos, encontramos diferencias significativas ($p < 0,01$) entre Bull 17.4.1 y Bull 17.6 (Gráfico 47 derecha).

Hembras



Machos

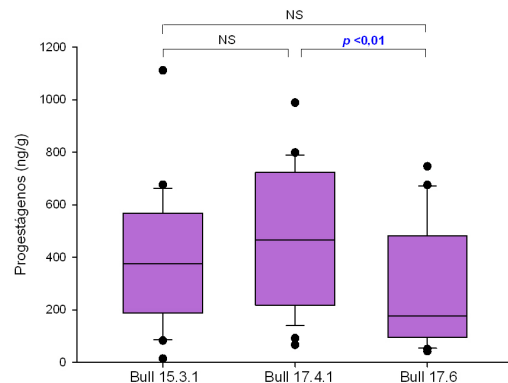


Gráfico 47: Comparación entre invierno y verano de la media de la concentración de progestágenos de cada hembra (izquierda) y cada macho (derecha) de los rinocerontes en libertad (Cow 7=a; Cow 17=b; Rodgie=c; Stompstert= d; TDI= e; NS= No significativo; p =Nivel de significación).

IV. Resultados

Los resultados de la media de la concentración de progestágenos para cada rinoceronte mantenido en libertad se muestran en la siguiente tabla (Tabla 19) junto al error estándar de la media (ESM).

Rinoceronte	N	Media ± ESM
Bull 15.3.1	25	388,70±51,08
Bull 17.4.1	28	460,71±47,98
Bull 17.6	23	280,53±47,43
Cow 7	19	392,73±60,91
Cow 17	14	234,33±53,10
Cow Rodgie	21	471,27±62,80
Cow Stompstert	12	261,61±74,62
Cow TDI	15	394,57±67,13

Tabla 19: Valor medio de la concentración de progestágenos de cada uno de los rinocerontes en libertad (N=Tamaño muestral; ESM= Error estándar de la media).

Los perfiles hormonales de la concentración de los progestágenos de las hembras en invierno y verano se detallan en el gráfico 48. Dado el escaso número de muestras no se ven ciclos claros en ninguna de las hembras en libertad (Reserva), pero sí que existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre Cow 17 y Stompstert ($p<0,01$).

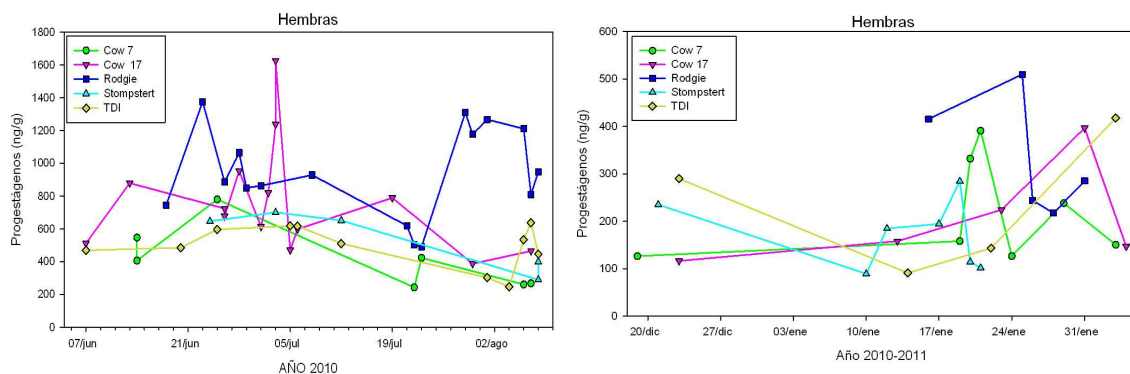


Gráfico 48: Perfil hormonal de los progestágenos en las cinco hembras en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva).

Los perfiles de los machos en invierno y verano parecen evolucionar de forma muy similar en los tres machos (Gráfico 49).

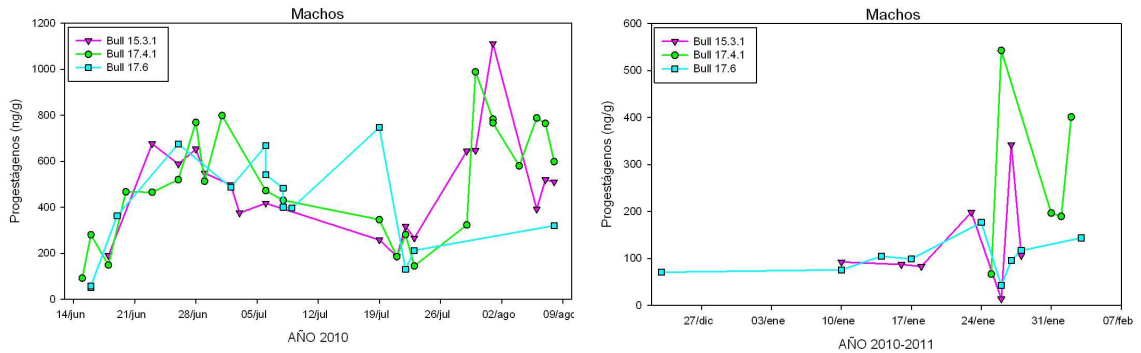


Gráfico 49: Perfil hormonal de los progestágenos en los tres machos en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva).

6. ESTRÓGENOS

6.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo)

En los resultados de los análisis de las concentraciones de los estrógenos en las heces de los rinocerontes del Zoo de Madrid, encontramos diferencias significativas entre las dos hembras y entre el Macho y la Hembra Vieja, no existiendo diferencias significativas entre Marina y el Macho (Gráfico 50).

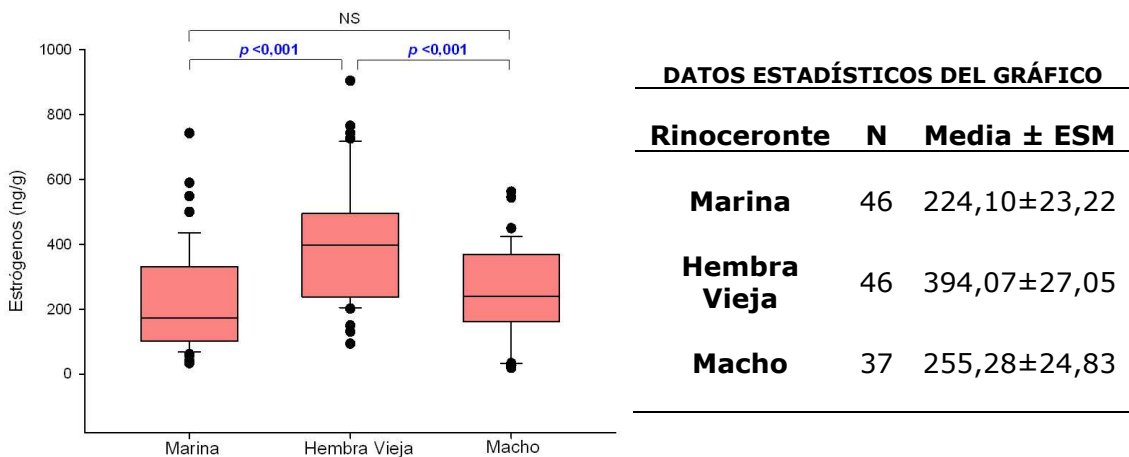


Gráfico 50: Comparación de la concentración de estrógenos (ng/g) entre el macho y las dos hembras de rinoceronte blanco en cautividad (p =Nivel de significación). Datos estadísticos: valor medio de la concentración de estrógenos (ng/g) en los tres rinocerontes del Zoo (N=Tamaño muestral; ESM=Error estándar de la media).

El perfil hormonal de la Hembra Vieja parece tener ocho ciclos con una media de $25,38 \pm 3,21$. En el perfil de Marina se pueden observar seis ciclos con una media de $26,67 \pm 6,17$ (Gráfico 51).

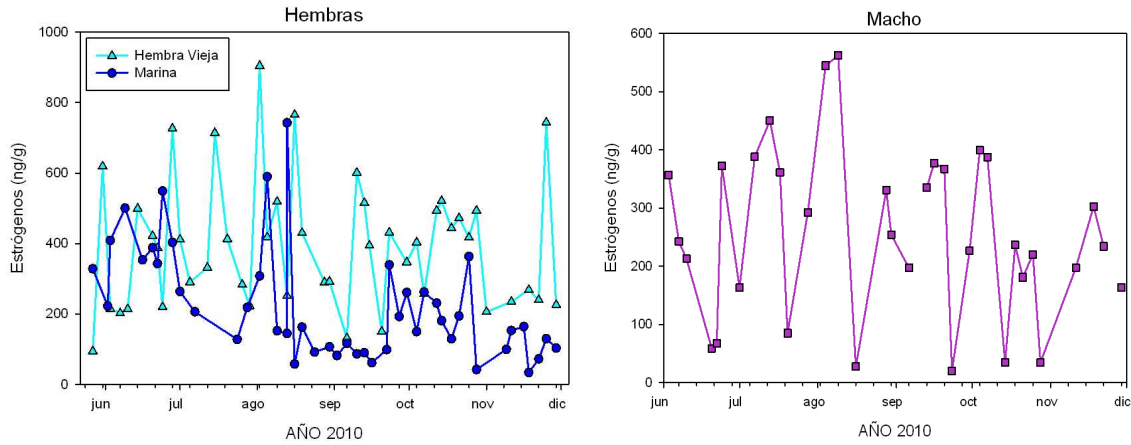


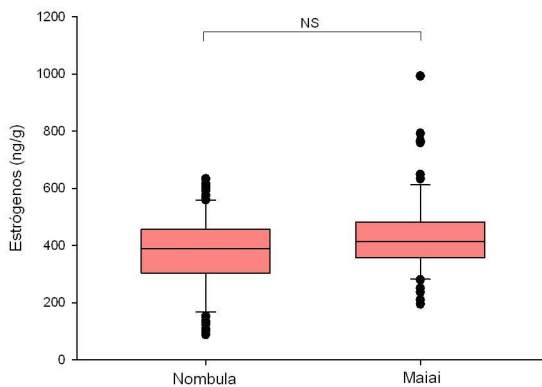
Gráfico 51: Perfil hormonal de los estrógenos de las dos hembras (izquierda) y el macho (derecha) mantenidos en cautividad (Zoo).

No encontramos ninguna correlación significativa entre los distintos perfiles hormonales de estrógenos, entre los tres rinocerontes mantenidos en cautividad.

6.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)

En los resultados de la concentración de estrógenos no encontramos diferencias significativas ni entre las dos hembras ni entre los dos machos (Gráfico 52 a y b). Sin embargo, las medias difieren significativamente entre ellos (Tabla 20 c). Las dos hembras presentan una concentración superior de estrógenos, siendo Maiai la de mayor concentración (Tabla 20 d).

(a) Hembras



(b) Machos

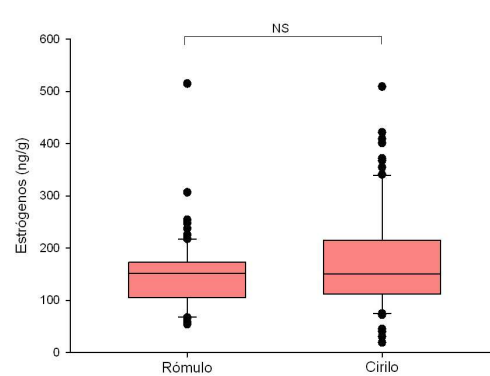


Gráfico 52: Comparación de la concentración de estrógenos (ng/g) entre Nombula y Maiai (a) y Rómulo y Cirilo (b) (NS= No significativo).

	(c)				(d)		
	Nombula	Maiai	Cirilo	Rómulo	Rinocerontes Bioparc	N	Media ± ESM
Nombula	--	NS	***	***	Nombula	62	377,66±16,73
Maiai	NS	--	***	***	Maiai	69	431,28±16,35
Cirilo	***	***	--	NS	Rómulo	70	147,87±8,21
Rómulo	***	***	NS	--	Cirilo	85	176,54±10,86

Tabla 20: Nivel de significación en la comparación de la media de la concentración de estrógenos (ng/g) entre los cuatro rinocerontes en semi-cautividad (NS= no significativo; ***= p<0,001). Datos estadísticos del gráfico 52: valor medio de la concentración de estrógenos (ng/g) de cada rinoceronte en semi-cautividad (N=Número de muestras; ESM=Error estándar de la media).

En el perfil hormonal de Maiiai para los estrógenos se aprecia cierta ciclicidad en base a la media (33,83 ± 5,55 días), pero en el gráfico los picos que se observan ocurren en los últimos meses del estudio. En Nombula se observa una ciclicidad más rítmica con un total de once ciclos y con una media entre ciclos de 31,30 ± 5,51 días (Gráfico 53).

No existe una correlación estadísticamente significativa en cuanto a la variación de estrógenos entre Nombula y Maiiai.

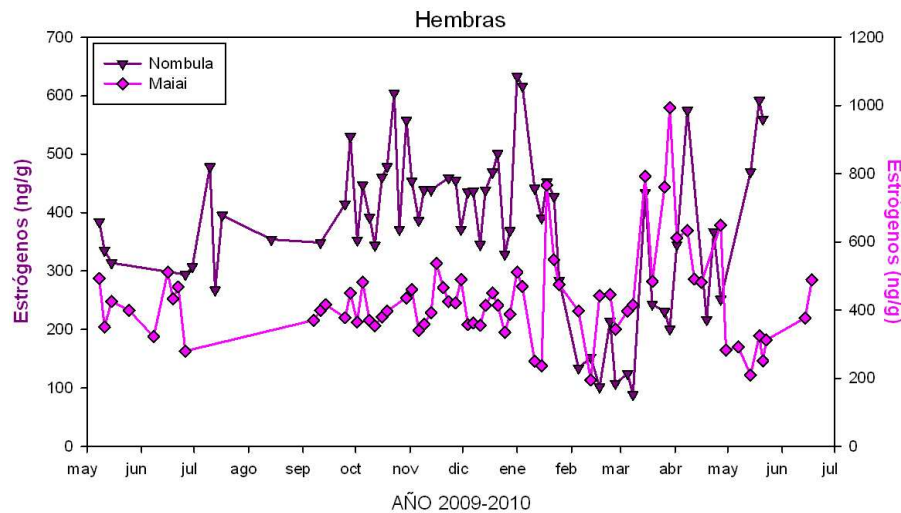


Gráfico 53: Perfil hormonal de los estrógenos de las hembras de rinoceronte mantenidas en semi-cautividad (Bioparc).

En los perfiles hormonales de los machos (Gráfico 54), observamos una media general superior en Cirilo.

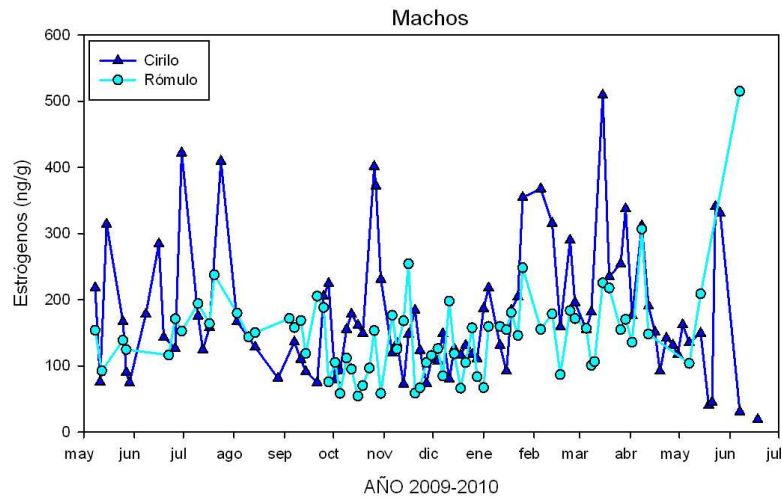
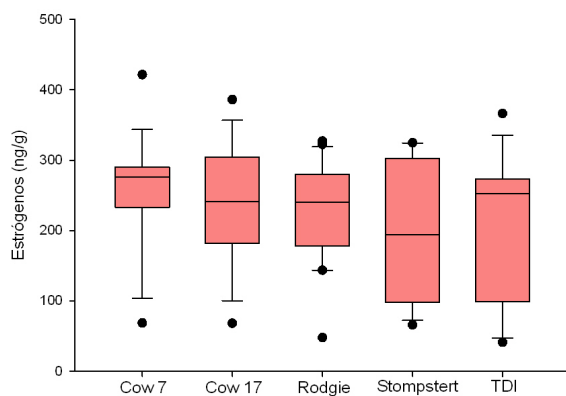


Gráfico 54: Perfil hormonal de los estrógenos de los machos de rinoceronte mantenidos en semi-cautividad (Bioparc).

6.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

La media de la concentración de estrógenos entre las distintas hembras estudiadas en este hábitat no difiere entre unas y otras (Gráfico 55 a). En cuanto a los resultados de los machos, tampoco encontramos diferencias significativas (Gráfico 55 b).

(a) Hembras



(b) Machos

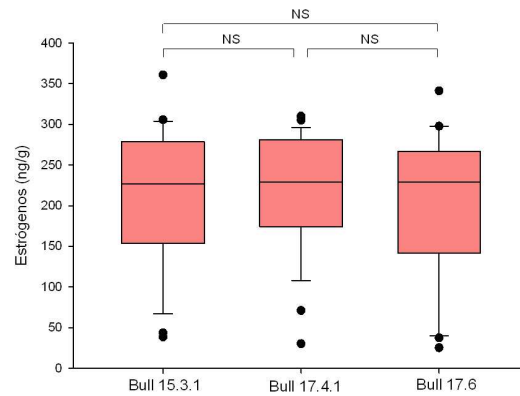


Gráfico 55: Comparación entre invierno y verano de la media de la concentración de estrógenos (ng/g) de cada hembra (a) y cada macho (b) de los rinocerontes en libertad (NS=No significativo).

Los resultados de la media de la concentración de estrógenos para cada rinoceronte mantenido en libertad, se muestran en la siguiente tabla (Tabla 21) junto al error estándar de la media (ESM). Entre las hembras, Cow 7 es la que presenta la concentración más elevada de estrógenos, y entre los machos, Bull 17.4.1.

Rinoceronte	N	Media \pm ESM
Bull 15.3.1	25	207,34 \pm 17,08
Bull 17.4.1	28	216,46 \pm 13,82
Bull 17.6	23	196,65 \pm 19,48
Cow 7	19	251,94 \pm 21,19
Cow 17	14	239,98 \pm 23,74
Cow Rodgie	21	225,80 \pm 15,57
Cow Stompstert	12	200,16 \pm 28,28
Cow TDI	15	220,53 \pm 25,91

Tabla 21: Valor medio de la concentración de estrógenos (ng/g) de cada uno de los rinocerontes en libertad (N=Tamaño muestral; ESM= Error estándar de la media).

Los perfiles hormonales para los estrógenos, tanto en hembras como en machos, parecen variar paralelamente en cada grupo de individuos (Gráfico 56 y 57). Existiendo entre Cow 17 y Stompstert; Cow 7 y Cow TDI, una correlación positiva estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

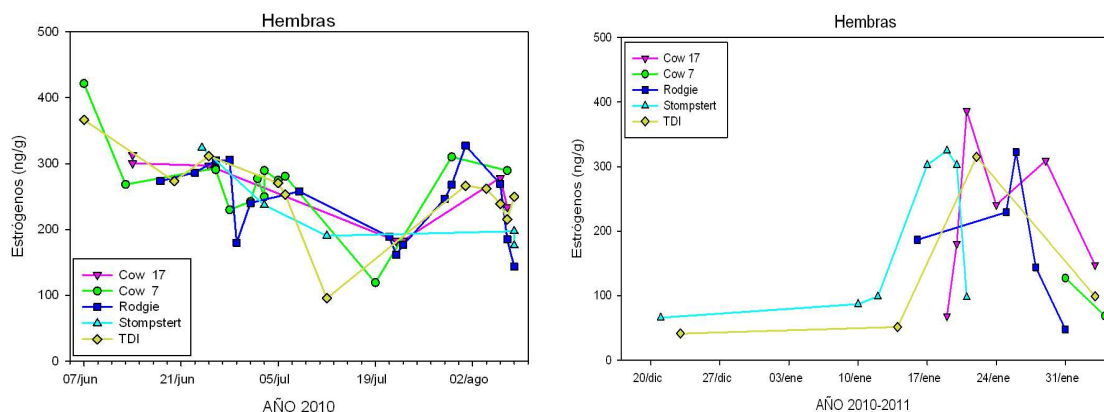


Gráfico 56: Perfil hormonal de los estrógenos en las cinco hembras en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva).

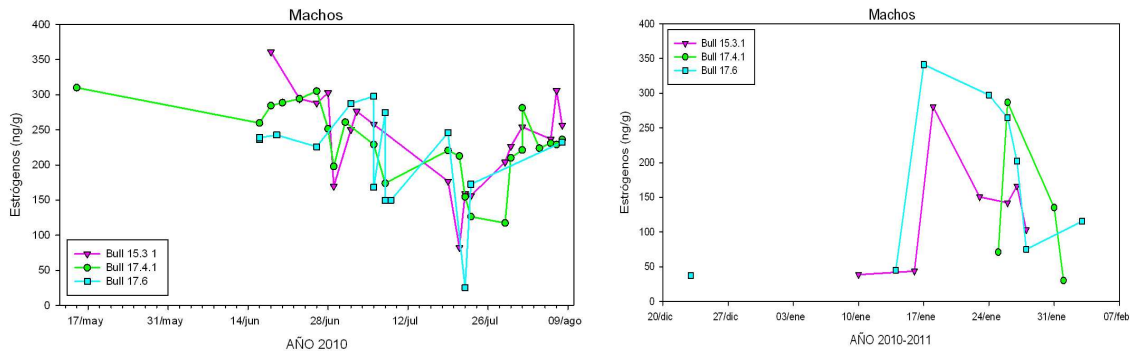


Gráfico 57: Perfil hormonal de los estrógenos en los tres machos en libertad durante el invierno (izquierda) y verano (derecha) sudafricanos (Reserva).

7. CORRELACIONES HORMONALES Y CICLOS OVÁRICOS

7.1. Hembras en cautividad (Zoo)

Analizamos las posibles correlaciones entre las hormonas estudiadas de todos los individuos mantenidos en cautividad. Tras el análisis de *Pearson*, encontramos una correlación estadísticamente significativa entre los glucocorticoides y los andrógenos en Marina, mientras que la Hembra Vieja presenta una correlación negativa significativa entre los niveles de glucocorticoides y progestágenos. En el macho, los glucocorticoides y los andrógenos están correlacionados negativamente (Tabla 22).

	MARINA	HEMBRA VIEJA	MACHO
Glucocorticoides/Progestágenos	NS	Corr. - ***	NS
Glucocorticoides /Andrógenos	Corr. + **	NS	Corr. - *
Progestágenos / Andrógenos	NS	NS	NS
Progestágenos /Estrógenos	NS	NS	NS
Andrógenos /Estrógenos	NS	NS	NS

Tabla 22: Análisis de correlación entre las distintas hormonas analizadas (Corr. + = correlación positiva; Corr. - = correlación negativa; ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$; NS= No significativo).

En el perfil hormonal de Marina, analizamos las posibles correlaciones entre los glucocorticoides y los progestágenos, antes, durante y después de la gestación, encontrando una correlación positiva estadísticamente significativa entre ambas hormonas, antes y durante la gestación, perdiendo dicha correlación durante los meses posteriores al parto (Tabla 23).

Marina	Antes	Gestación y parto	Después
Glucocorticoides/Progestágenos (Correlación de <i>Pearson</i>)	Corr. + **	Corr. + ***	NS

Tabla 23: Análisis de correlación entre los glucocorticoides y los progestágenos. Corr. + = correlación positiva; Corr. - = correlación negativa; ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$; NS= No significativo).

Dichas correlaciones las podemos observar en los siguientes gráficos (58,59 y 60).

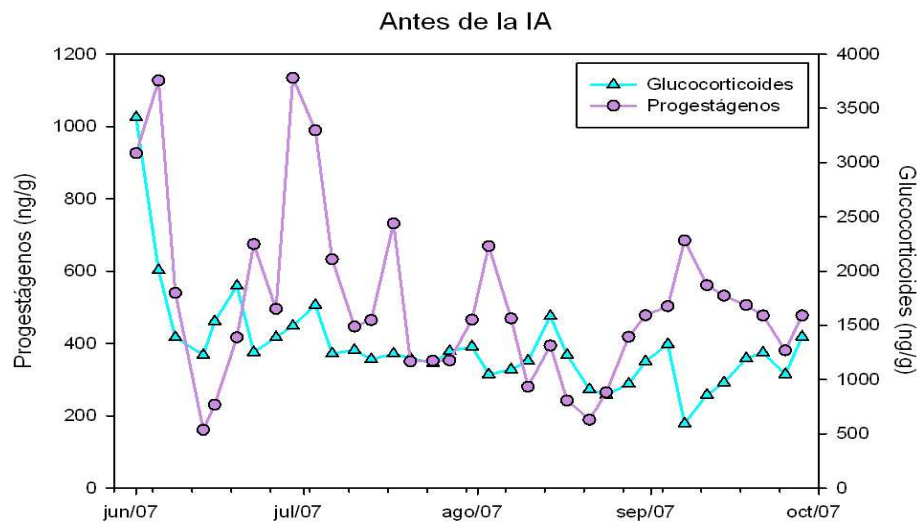


Gráfico 58: Perfil hormonal de los glucocorticoides y de los progestágenos de Marina antes de la inseminación artificial (IA).

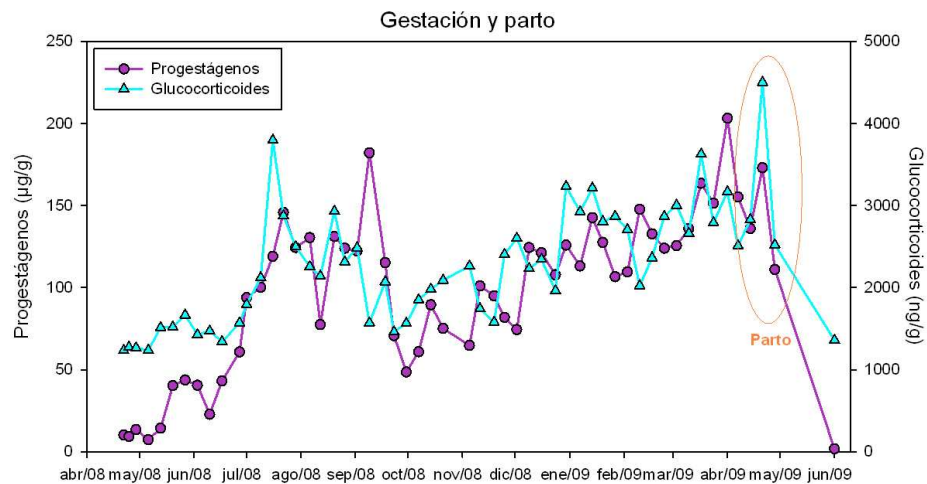


Gráfico 59: Perfil hormonal de los glucocorticoides y de los progestágenos de Marina durante la gestación y parto.

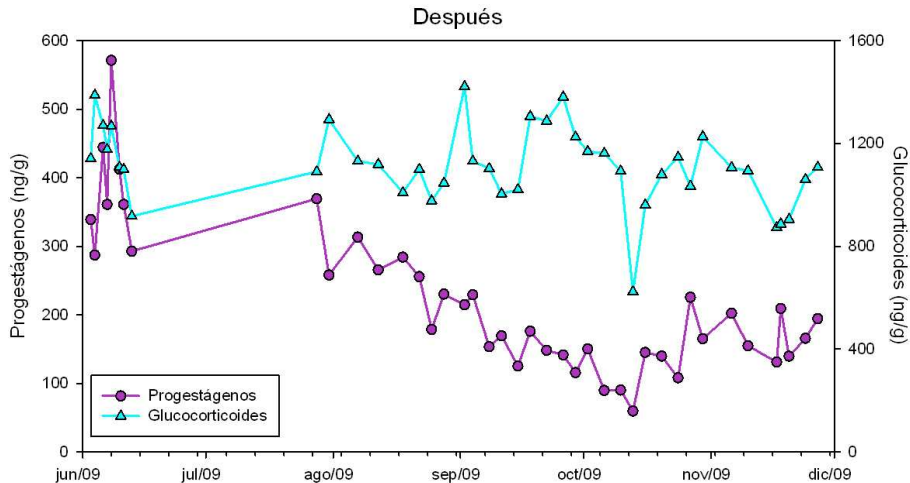


Gráfico 60: Perfil hormonal de los glucocorticoides y de los progestágenos de Marina después de la gestación.

Durante el periodo de estudio del año 2010 de Marina, vemos los seis ciclos caracterizados anteriormente comentados, con una elevación de progestágenos cada $27,20 \pm 2,25$ días y de estrógenos cada $26,67 \pm 6,17$ días (Gráfico 61).

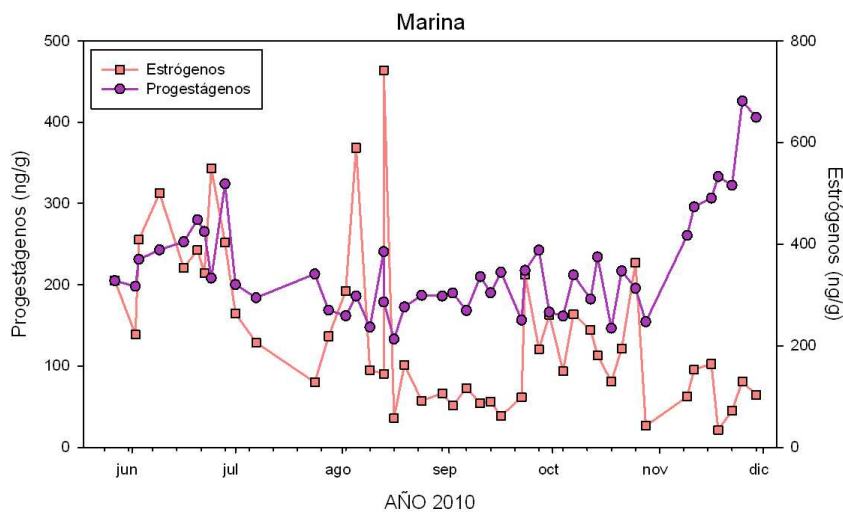


Gráfico 61: Perfil hormonal de los progestágenos y de los estrógenos de Marina durante los meses de estudio del año 2010.

En el perfil hormonal de la Hembra Vieja, observamos cierta ciclicidad, con elevaciones de estrógenos en pequeños intervalos de tiempo, y donde podemos observar los ocho ciclos hormonales que se producen con una elevación de progestágenos cada $21,00 \pm 1,68$ días y de estrógenos cada $25,38 \pm 3,21$ días (Gráfico 62).

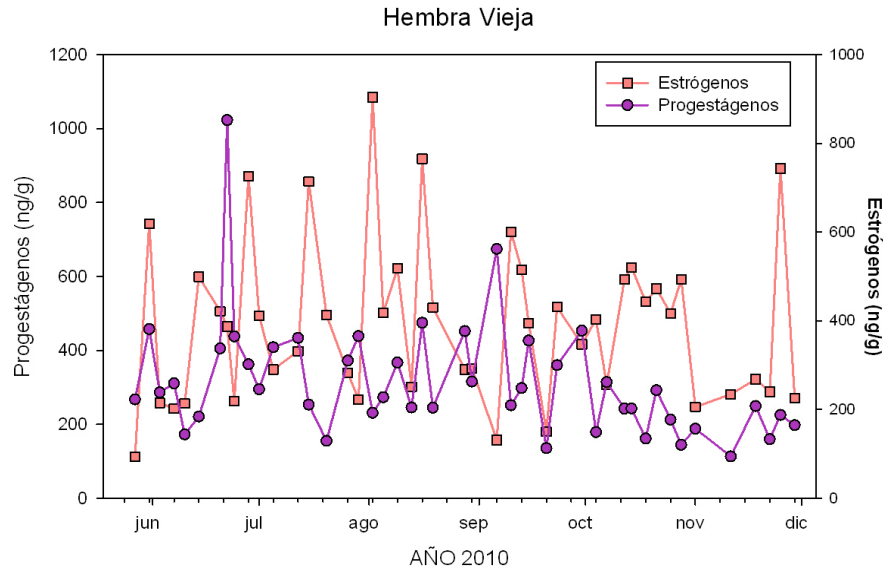


Gráfico 62: Perfil hormonal de los progestágenos y de los estrógenos de la Hembra Vieja.

7.2. Hembras en semi-cautividad (Bioparc)

Los resultados de los análisis de correlación de los rinocerontes en semi-cautividad muestran distintas correlaciones (Tabla 22) cabe destacar la correlación positiva significativa entre los andrógenos y los estrógenos que presentan los dos machos y una de las hembras (Nombula). Además, los glucocorticoides y los andrógenos están correlacionados positivamente en Cirilo y los progestágenos y los estrógenos en Maiai.

	NOMBULA	MAIAI	RÓMULO	CIRILO
Glucocorticoides/Progestágenos	NS	NS	NS	NS
Glucocorticoides /Andrógenos	NS	NS	NS	Corr. + *
Progestágenos / Andrógenos	NS	NS	NS	NS
Progestágenos /Estrógenos	NS	Corr. + ***	NS	NS
Andrógenos /Estrógenos	Corr. + *	NS	Corr. + *	Corr. + *

Tabla 24: Análisis de correlación entre las distintas hormonas analizadas. Corr. + = correlación positiva; Corr. - = correlación negativa; ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$; NS= No significativo).

En el perfil hormonal de Maiai, observamos elevaciones hormonales sin aparente regularidad con una media entre picos de progestágenos cada $94,33 \pm 29,58$ días y de estrógenos cada $33,83 \pm 5,55$ días (Gráfico 63).

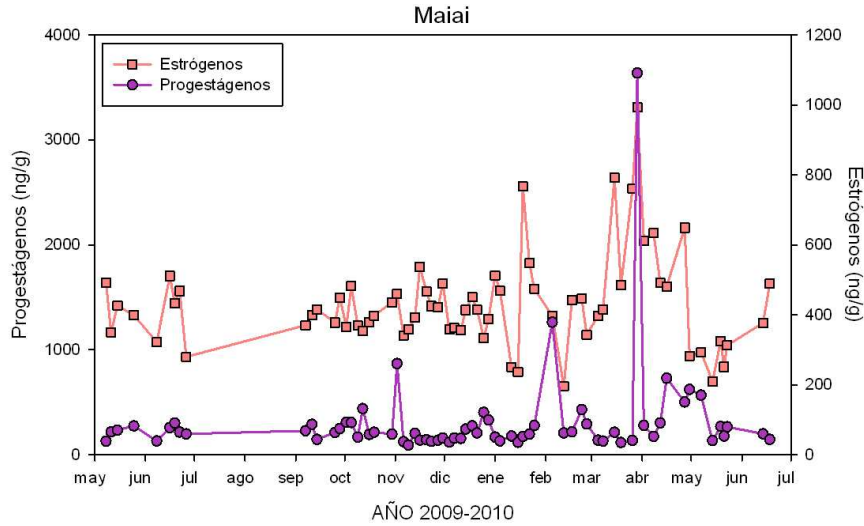


Gráfico 63: Perfil hormonal de los progestágenos y de los estrógenos de Maiai.

En el perfil de Nombula, existe cierta regularidad, sobre todo en los últimos meses del estudio (febrero-junio) con los picos de progestágenos cada $32,90 \pm 3,37$ días y de estrógenos cada $31,30 \pm 5,51$ días (Gráfico 64).

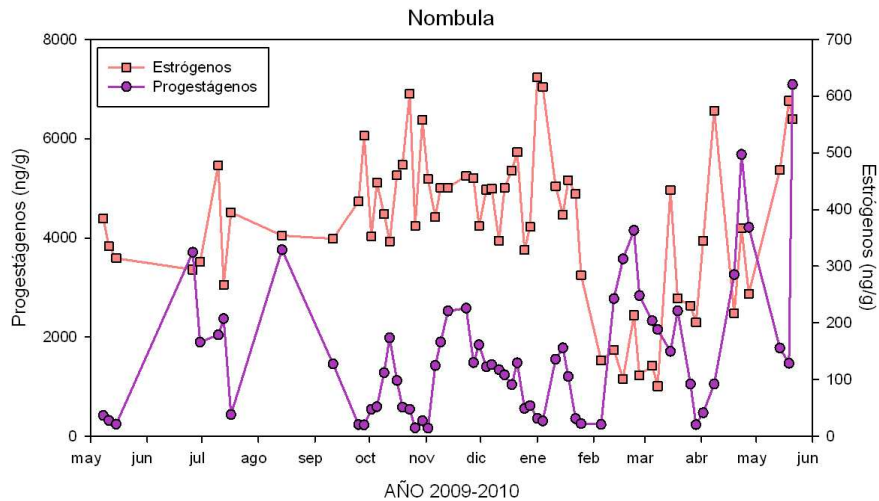


Gráfico 64: Perfil hormonal de los progestágenos y de los estrógenos de Nombula.

7.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

Los resultados de los análisis de correlación entre las distintas hormonas en los individuos en libertad se muestran en la siguiente tabla. Cabe destacar la correlación positiva estadísticamente significativa entre los glucocorticoides y los progestágenos en dos de las hembras (Cow 7 y 17); la correlación positiva entre los glucocorticoides y los andrógenos en tres individuos; la correlación positiva entre los progestágenos y los estrógenos en tres individuos y la correlación negativa entre los progestágenos y los andrógenos que coincide también en tres individuos (Tabla 25).

	COW 7	COW17	COW RODIE	COW STOMPSTERT	COW TDI	BULL 15.3.1	BULL 17.4.1	BULL 17.6
Glucocorticoides/ Progestágenos	Corr.+ *	Corr.+ *	NS	NS	NS	Corr.- *	NS	NS
Glucocorticoides/ Andrógenos	NS	NS	Corr.+ *	Corr.+ *	NS	Corr.+ ***	NS	NS
Glucocorticoides/ Estrógenos	NS	NS	NS	Corr.+ *	NS	NS	NS	NS
Progestágenos/ Andrógenos	Corr.- *	NS	Corr.- *	NS	NS	Corr.- *	NS	NS
Progestágenos/ Estrógenos	NS	NS	Corr.+ *	NS	NS	Corr.+ **	Corr.+ *	NS
Andrógenos/ Estrógenos	Corr.- *	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tabla 25: Análisis de correlación entre las distintas hormonas analizadas. Corr. + = correlación positiva; Corr. - = correlación negativa; ***= $p < 0,001$; **= $p < 0,01$; *= $p < 0,05$; NS= No significativo).

Debido al escaso número de muestras obtenido de las hembras en libertad, no es posible observar ciclos en ninguna de ellas.

8. ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO

8.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo)

De forma habitual, los rinocerontes de este hábitat presentan conductas normales y tranquilas, salvo alguna pequeña pelea puntual, sin embargo, no disponemos de tablas de comportamiento específicas de uso diario para los rinocerontes de este hábitat, tan solo contamos con los datos observacionales realizados por sus cuidadores de forma general.

Durante el estudio, el comportamiento de la Hembra Vieja fue muy tranquilo y calmado mientras que en la pareja (Marina y el macho) se han dado pequeñas peleas, donde Marina parece expresar cierta dominancia, pero nada fuera de lo normal, dentro del comportamiento habitual que presentan los rinocerontes.

El amamantamiento de la cría de Marina, duró alrededor de 5 meses, desde Mayo hasta Septiembre (2009) aproximadamente.

8.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)

Los resultados de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad, tanto en las hembras (Gráfico 65) como en los machos (Gráfico 66), reflejan una prevalencia de comportamiento "normal y tranquilo".

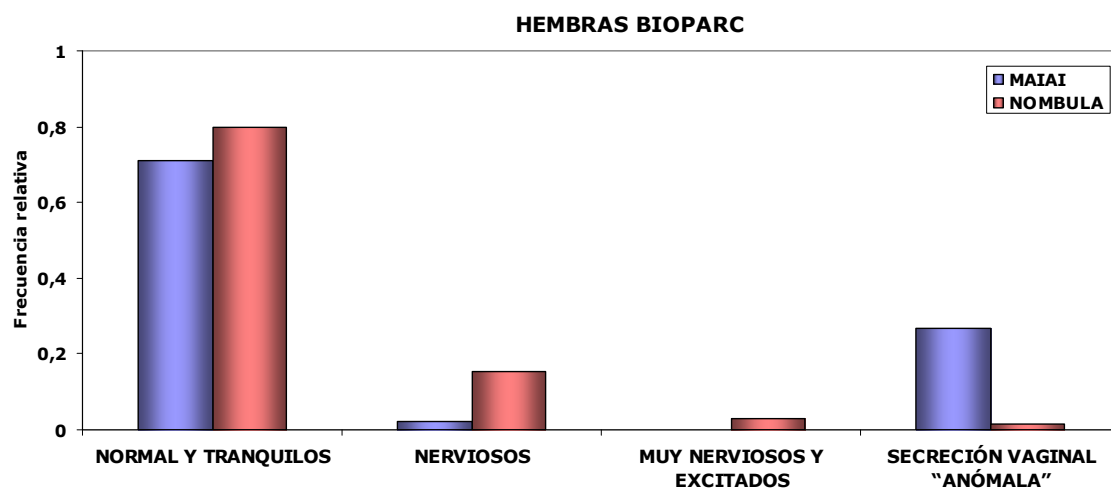


Gráfico 65: Frecuencia relativa de los comportamientos observados en cada hembra de rinoceronte blanco en semi-libertad (Bioparc).

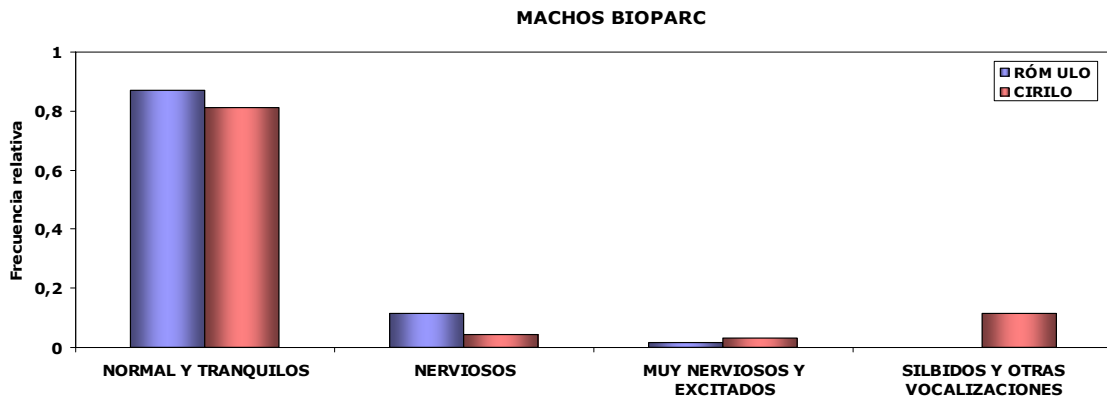


Gráfico 66: Frecuencia relativa de los comportamientos observados en cada hembra de rinoceronte blanco en semi-libertad (Bioparc).

8.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

En los resultados obtenidos tanto en las hembras (Gráfico 67) como en los machos (Gráfico 68), observamos una prevalencia del comportamiento "normal y tranquilo". Cabe destacar, el "comportamiento territorial" observado en una de las hembras (Stompstert).

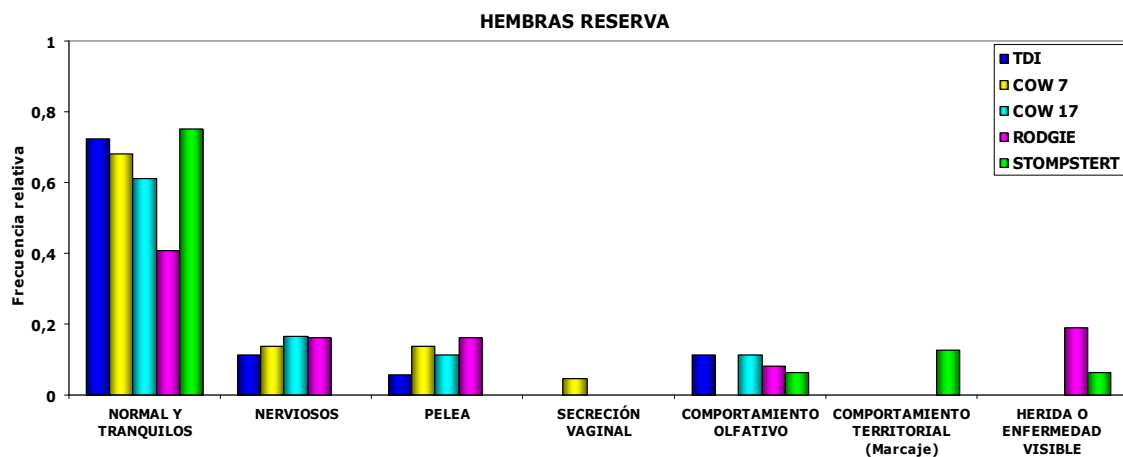


Gráfico 67: Frecuencia relativa de los comportamientos observados en cada hembra de rinoceronte blanco en libertad (Reserva).

IV. Resultados

Entre los machos, destaca Bull 17.6, cuyo resultado muestra una elevada frecuencia de comportamiento territorial (Gráfico 68).

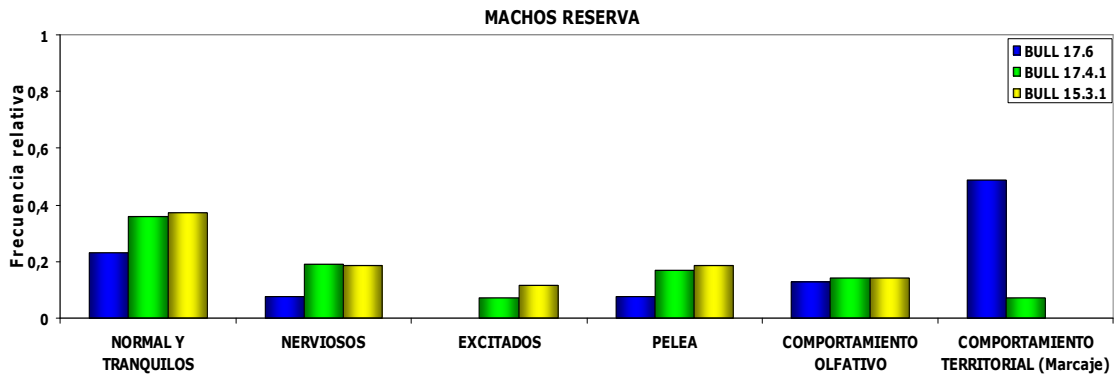


Gráfico 68: Frecuencia relativa de los comportamientos observados en cada macho de rinoceronte blanco en libertad (Reserva).

Recordemos que los comportamientos observados se redujeron a dos grupos, en los cuales, el grupo **0** considera el comportamiento "normal y tranquilo", mientras que en el grupo **1** entran todos aquellos comportamientos que difieren del grupo 0 (ver *Material y Métodos*, apartado 2.3). De esta forma, los comportamientos observados en los rinocerontes en libertad, se resumen en la siguiente tabla (26):

RINOCERONTE	Grupo 0	Grupo 1	TOTAL
BULL 15.3.1	5	8	13
BULL 17.4.1	10	7	17
BULL 17.6	1	5	6
COW 17	2	2	4
COW 7	4	1	5
COW RODGIE	6	5	11
COW STOMPSTERT	3	1	4
COW TDI	4	0	4
TOTAL	35	29	64

Tabla 26: Número de conductas observadas, clasificadas según el grupo, en cada uno de los rinocerontes en libertad (Reserva).

En los resultados de este análisis estadístico para cada una de las hormonas analizadas en este estudio, observamos diferencias estadísticamente significativas tan solo en las concentraciones de andrógenos (Gráfico 69), donde encontramos que cualquiera de las conductas observadas (grupo 1), producen un aumento significativo en la concentración fecal de andrógenos.

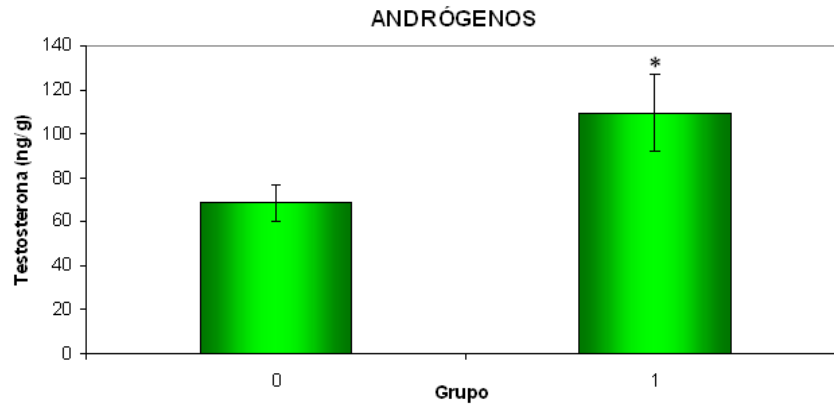
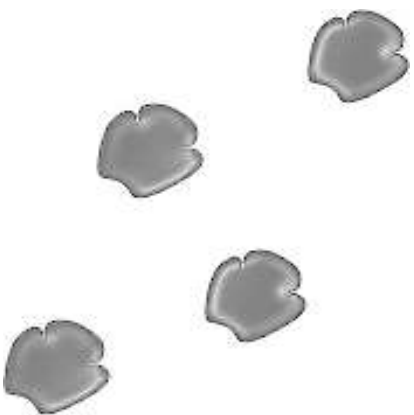


Gráfico 69: Diferencia en la concentración media de testosterona (ng/g) en los rinocerontes en libertad (Reserva), cuando los rinocerontes se encuentran en estado "normal y tranquilo" (0) y cuando presentan alguna de las conductas analizadas (1) (*= $p < 0,05$).



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

V. DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

El drástico aumento de la caza furtiva de rinoceronte, está llevando a la especie a una situación crítica de supervivencia. Actualmente, los individuos que se mantienen en cautividad podrían ser su única salvaguarda, con el inconveniente de que, aún hoy en día, se desconocen las causas de su baja tasa reproductora en cautividad (Gunn *et al.*, 1998; Schwarzenberger *et al.*, 1999; Hermes *et al.*, 2004; Carlstead y Brown, 2005; Swaisgood *et al.*, 2006). Como es sabido, las condiciones de cautividad alteran los ciclos biológicos y hormonales normales del animal, que no solo desembocan en fracaso reproductivo, sino que también alteran su bienestar y su comportamiento social (Gunn *et al.*, 1998; Menargues *et al.*, 2006; Schwarzenberger, 2007b).

Este trabajo de Tesis Doctoral presenta el primer estudio longitudinal y comparativo, mediante el análisis no invasivo de glucocorticoides y hormonas sexuales, para relacionarlo con las distintas condiciones de cautividad que pudieran estar alterando tanto la biología reproductiva como el comportamiento del rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum simum*), en base a los resultados comparativos de tres poblaciones diferentes: cautividad (Zoo de Madrid), semi-cautividad (Bioparc de Valencia) y libertad (Reserva de Sudáfrica).

1. ANÁLISIS GENERAL

1.1. Glucocorticoides y estrés

Hemos realizado el análisis de glucocorticoides puesto que han sido utilizados en numerosos estudios, como agentes evaluadores de la relación entre los estresantes ambientales y el estado de salud del animal (Brousset *et al.*, 2005; Chinadurai *et al.*, 2009; Sheriff *et al.*, 2011; Barette *et al.*, 2012; Vick *et al.*, 2012) para obtener la información necesaria de cómo los animales perciben y se adaptan a su entorno, siendo una medida indirecta del bienestar animal (Schwarzenberger *et al.*, 2000a; Reeder y Kramer, 2005; Sheriff *et al.*, 2011).

Para evaluar la respuesta de la corteza adrenal, lo más habitual es realizar un test de estimulación con ACTH (ACTH *Challenge*) (Wasser *et al.*, 2000; Metrione y Harder, 2011), o bien, realizar el transporte o la translocación de alguno de los rinocerontes, que se sabe actúa como estímulo estresante (Turner *et al.*, 2002; Viljoen *et al.*, 2008; Linklater *et al.*, 2010), para posteriormente analizar los niveles de glucocorticoides. Con el fin de mantener el carácter no invasivo de nuestro estudio, no se realizó la estimulación con ACTH a ninguno de los ejemplares y

debido a las circunstancias, tampoco pudieron ser transportados, por lo que se utilizó el parto de una de las hembras del estudio, como evento natural estresante para la valoración de los niveles de glucocorticoides que reflejan estrés agudo (Hudson *et al.*, 1976; Alehagen *et al.*, 2001).

La secreción de las hormonas corticoadrenales está controlada por una multitud de factores externos e internos, incluyendo los ritmos circadianos (Illera *et al.*, 1993; Bell-Pedersen *et al.*, 2005; Jerjes *et al.*, 2006; Thanos *et al.*, 2009), la estación del año (Wingfield y Kitaysky, 2002; Chinadurai *et al.*, 2009; Barja *et al.*, 2011), la alimentación (Carr, 2002; Schibler *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2011), etc., en respuesta a muchos tipos de estímulos tanto ambientales como sociales (Summers, 2002; Carlstead y Brown, 2005). También son características, las grandes diferencias individuales que ocurren en la mayoría de las especies (Weibel *et al.*, 2002; Touma *et al.*, 2003).

Aunque no todos los parámetros que controlan la secreción de glucocorticoides, pudieron ser examinados, se identificaron diversas relaciones entre los datos de las concentraciones de glucocorticoides y determinadas características de su hábitat y/o comportamiento, que pueden ser indicativos de las respuestas a los factores estresantes examinados. Entre ellos, hemos considerado el tipo/condiciones del hábitat, el estatus social, la estación del año, el comportamiento, la alimentación y el sexo. Sin embargo, tenemos que ser cautelosos con los resultados, pues una gran variedad de posibles estímulos estresantes podrían haber afectado los perfiles de glucocorticoides observados en los rinocerontes evaluados en este estudio, incluyendo, por ejemplo, los ruidos, los cambios de cuidador, eventos concretos, etc.

Recordemos que en el hábitat de cautividad (Zoo), las condiciones en las que se encuentran los rinocerontes incluyen recintos de menores dimensiones en comparación a los otros dos hábitats, en ausencia de relaciones interespecíficas con otras especies animales, existiendo, tan solo, relaciones intraespecíficas entre la pareja de rinocerontes que convive junta (Marina y el macho). Además, el recinto donde se encuentran, presenta escasa vegetación, estando cubierto de arena, la mayor parte del recinto. En el hábitat de semi-cautividad (Bioparc), los recintos presentan mayores dimensiones y los rinocerontes pueden establecer relaciones tanto intra como interespecíficas con otras especies típicas de la sabana africana (cebras, antílopes, etc.), excepto en el caso de Rómulo, que es el único rinoceronte que se mantiene en un recinto apartado del resto, pero con contacto visual y olfativo con los otros rinocerontes y especies animales. Además, la vegetación

existente en el recinto es más abundante, aunque también está cubierto de arena. En nuestro estudio, la población de rinocerontes en libertad (Reserva de Mabula) cubre unas 10.000 hectáreas, donde los animales pueden moverse libremente a cualquiera de sus zonas (lagos, pastizales, zonas arboladas, arbustivas, etc.). Se encuentran en contacto directo con multitud de especies africanas (cebras, antílopes, elefantes, búfalos, etc.) y eligen en todo momento qué comer, cuándo y dónde, así como seleccionar su cobijo para dormir, o su zona preferida de descanso, disfrutando de libertad total en sus movimientos y toma de decisiones.

Los resultados obtenidos muestran una media en la concentración de glucocorticoides mucho más elevada en los rinocerontes mantenidos en cautividad, respecto a la población en libertad. La media de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad, también es superior frente a los rinocerontes en libertad, aunque no estadísticamente diferente. Podemos decir, por tanto, que existe una relación lineal, que parece que indica que cuanto más estrictas son las condiciones de cautividad del rinoceronte blanco, mayor alteración se produce en la respuesta normal del eje corticotropo, elevando los niveles de glucocorticoides. Actualmente, no conocemos ningún estudio, que haya podido incluir tres hábitats diferentes, comparando distintas condiciones de cautividad con una población en libertad y son pocos los estudios que han comparado los niveles de glucocorticoides en cautividad y/o en libertad. Así por ejemplo, y de acuerdo con el estudio de Fanson y colaboradores (2012), realizado en el lince canadiense (*Lynx canadensis*), los niveles de glucocorticoides fecales que detectaron en los animales mantenidos en cautividad, fueron significativamente superiores respecto a la población en libertad estudiada. En otros estudios (Pirovino *et al.*, 2011), también han sido relacionados los bajos niveles de glucocorticoides con mayores dimensiones del recinto y protección visual frente a las visitas turísticas.

En diversas especies animales, han sido descritos distintos factores asociados a las condiciones de cautividad, que alteran los ciclos biológicos normales de las especies, ya sea por las escasas dimensiones de los recintos (Pirovino *et al.*, 2011), o las relaciones sociales artificiales en que se encuentran, aumentando la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, y elevando consecuentemente la secreción de glucocorticoides frente a los diversos estímulos estresantes derivados de sus condiciones en cautividad (Gunn *et al.*, 1998; Cinková, 2006; Schwarzenberger, 2007b).

Además, quisimos detectar si existía o no diferencia estacional (invierno-verano) en la secreción de glucocorticoides, puesto que otros autores, han descrito la existencia de dicha variación estacional para diferentes especies animales. En el estudio de Taillon y Côté (2008), realizado en cervatillos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) encontraron una disminución en los niveles de glucocorticoides a lo largo del invierno (enero-marzo), que atribuyeron a una estrategia hormonal para suprimir la respuesta al estrés, provocada por las duras condiciones invernales, evitando así, el gasto energético. Por otro lado, en el estudio de Chinadurai y colaboradores (2009), detectaron diferencias estacionales en la producción de glucocorticoides fecales en diversas especies de herbívoros sudafricanos: jirafa (*Giraffa camelopardalis*), impala (*Aepyceros melampus*), nyala (*Tragelaphus buxtoni*), kudú (*Tragelaphus strepsiceros*), ñu azul (*Connochaetes taurinus*) y cebra (*Equus burchelli*). En todas ellas, los niveles de glucocorticoides eran superiores durante la estación seca (invierno sudafricano: junio-agosto) frente a la época de lluvias (verano sudafricano: diciembre-febrero). Sin embargo, no pudieron relacionar el aumento en la secreción de glucocorticoides con un factor en concreto, debido a las numerosas variables que podían estar implicadas (temperatura, estado reproductor, etc.). Los mismos resultados obtuvieron en su estudio Weingrill y colaboradores (2004) en papiones negros (*Papio ursinus*), y Corlatti y colaboradores (2011) en ciervos rojos (*Cervus elaphus*), relacionando el aumento de glucocorticoides encontrado durante el invierno, a la variación estacional (principalmente horas de luz diarias y temperatura, respectivamente).

En nuestro estudio, los resultados de las medias de los niveles de glucocorticoides obtenidas respecto a la variable *estación*, no son estadísticamente significativos entre invierno y verano en ninguno de los tres hábitats. Sin embargo, tanto para los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad como los que se encuentran en libertad, la media de la concentración es ligeramente más elevada durante el verano, observándose un leve patrón estacional en el rinoceronte blanco, ya que los niveles caen durante el invierno, bien por la pérdida de masa corporal y estrategia hormonal antes comentada (Taillon y Côté, 2008) para otros ungulados, o bien, debido a otros factores no cuantificados en nuestro estudio, como por ejemplo, las horas diarias de luz, la humedad o el cambio de temperatura entre las distintas estaciones, ya que el calor podría actuar como estímulo estresante para el animal, provocando un aumento en la secreción de glucocorticoides durante el verano (Alvarez y Johnson, 1973; Abilay *et al.*, 1975) y los tres hábitats de nuestro estudio, se encuentran en zonas geográficas diferentes, con variables ambientales muy distintas entre si: Madrid, donde se encuentra el Zoo (cautividad) es la más

seca, mientras Valencia (semi-cautividad) y Sudáfrica (libertad) son más húmedas. La temperatura también fluctúa entre los tres hábitats y sus diferentes estaciones, por lo que también debe ser tenido en cuenta a la hora de valorar los resultados, a pesar de que los datos correspondientes a dichas variables, no han sido recogidos en nuestro estudio.

Por otro lado, es posible que la diferencia estacional encontrada en la secreción de glucocorticoides, aunque no sea estadísticamente significativa, esté relacionada con la reproducción. La selección natural favorece a las hembras que producen descendencia coincidente con la época de abundancia de alimentos de alta calidad (Prendergast *et al.*, 2002). Por ello, teniendo en cuenta que la gestación de un rinoceronte dura 16 meses, parece lógico pensar que en los rinocerontes en libertad, la época más adecuada para reproducirse, debería ser antes o durante el verano sudafricano, para que la época del nacimiento de las crías coincida con el final del verano sudafricano, donde se dan las mejores condiciones para un óptimo desarrollo de la cría y un nutritivo amamantamiento, pues las numerosas lluvias, la temperatura y las horas de luz diarias, resultan en abundante alimento de alta calidad. En general, no existe un consenso generalizado que indique si en los mamíferos, existe o no un aumento de glucocorticoides que esté relacionado con la época reproductora, puesto que muchos estudios difieren según los resultados obtenidos y las especies estudiadas (Romero, 2002). Sin embargo, en aquellas especies estrictamente reproductoras estacionales, debe existir un aumento de la secreción de glucocorticoides durante la estación reproductiva, para que ésta, pueda darse con éxito (Norris, 2007). Por tanto, puesto que los rinocerontes no son considerados como una especie reproductora estacional estricta, no observamos dicha diferencia estacional estadísticamente significativa, aunque sí se ha observado un ligero patrón estacional respecto a la variación de los niveles de glucocorticoides, de acuerdo a lo descrito en esta especie por Kretzschmar y colaboradores (2004), que detectaron dicho patrón estacional en base a los resultados del análisis de andrógenos, encontrando niveles superiores durante la época de lluvias (verano), al igual que los niveles de glucocorticoides encontrados en los rinocerontes de nuestro estudio, son ligeramente más elevados en la misma época para nuestro hábitat en libertad y semi-cautividad.

Cabe destacar, que la presión turística es un común denominador a todos los hábitats de nuestro estudio, siendo el verano, la estación que más turismo genera. Aunque en ninguno de los hábitats existe una diferencia estadísticamente significativa respecto a la estación, coincide que en semi-cautividad y libertad los

niveles son más elevados durante el verano, ocurriendo a la inversa en cautividad. La presión turística podría explicar que los niveles de glucocorticoides de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad y libertad aumenten durante el verano, puesto que ya en otros estudios se ha visto una elevación de dichas hormonas debido a la presión turística (Barja *et al.*, 2007). Por otro lado, durante la estación seca (invierno), la falta de recursos alimenticios provoca peleas y cambios conductuales en los rinocerontes en libertad, mientras que en cautividad, estaría más relacionado con los cambios de temperatura debido a la zona geográfica donde se encuentran (Corlatti *et al.*, 2011). Todo esto, podría haber generado una diferencia estacional sobre la concentración de glucocorticoides, que de alguna forma permanece equilibrada en ambas estaciones, no quedando reflejada estadísticamente en nuestros resultados.

Hay que tener en cuenta, que existe además una diferencia estadística en cuanto a la media de glucocorticoides respecto al factor *sexo*, siendo las hembras, las que poseen una media superior frente a los machos. Esta diferencia, parece ser debida a distintas rutas de excreción entre ambos sexos que también varía con la especie, según apuntaron en su estudio Touma y colaboradores (2003), que encontraron una mayor concentración de glucocorticoides en las heces de ratones macho frente a las hembras. Además, existen marcadas diferencias en las respuestas al estrés que realizan los machos y las hembras, habiéndose propuesto que se deben a la influencia de los distintos esteroides sexuales, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Handa *et al.*, 1994; Fanson *et al.*, 2012). Por tanto, los mecanismos por los que el estrés impacta sobre la reproducción, puede diferir entre los sexos ya que puede estar influida, al menos en parte, por la acción de los esteroides sexuales (Tilbrook *et al.*, 2000).

En resumen, no podemos descartar que exista cierto patrón estacional en la reproducción del rinoceronte, ni que la presión turística no ejerza sus efectos durante el verano, a la vez que lo hace la escasez de recursos durante el invierno, o las variaciones ambientales que ocurren en cada hábitat debido a la temperatura, humedad y horas de luz (Prendergast *et al.*, 2002; Weingrill *et al.*, 2004). Por todo esto, es posible que se mantenga un cierto equilibrio, que no produce diferencias significativas en nuestros resultados. Para poder confirmar si existe o no diferencia estacional, sería necesario ampliar el estudio, con un mayor número de rinocerontes y realizando el análisis hormonal durante un año completo, añadiendo más variables como pudieran ser la temperatura y humedad que se registran durante dicho periodo en cada hábitat. Sin embargo, sí que hemos detectado una

relación lineal entre los niveles de glucocorticoides y las condiciones de cautividad en las que se encuentran los rinocerontes en cada uno de los tres tipos de hábitats, de forma que parece que cuanto más estrictas son dichas condiciones de cautividad, mayores niveles de glucocorticoides presenta esta especie. Además, de acuerdo a lo descrito por Touma y colaboradores (2003), encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la media de los niveles de glucocorticoides en base al sexo, que podría estar relacionada tanto con la reproducción, como con la distinta respuesta a los estímulos estresantes que parece existir según el sexo (Tilbrook *et al.*, 2000), pero en cualquier caso, que debe ser tomada en cuenta a la hora de valorar los niveles de glucocorticoides en esta especie en futuros trabajos.

1.2. Hormonas sexuales

En el análisis realizado en la comparación de la media de **andrógenos** en los tres hábitats del estudio, observamos una diferencia estadísticamente significativa en la media de la concentración de andrógenos, entre los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad y los otros dos hábitats (cautividad y libertad), siendo la media de la concentración de andrógenos de los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad, la más alta de los tres hábitats estudiados. Este resultado, pudiera ser debido al aumento de andrógenos que se produce cuando hembras y machos de rinoceronte conviven juntos (Kretschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009) y dado que se mantienen en semi-cautividad, no pueden evitar dichas relaciones intraespecíficas, reflejándose en parte, con una media superior en la concentración de andrógenos.

Algunos autores han investigado la interacción entre los diferentes ejes endocrinos en la regulación del comportamiento reproductivo, existiendo una fuerte interacción entre los andrógenos y glucocorticoides que determina la presencia o ausencia de secreción de la glándula adrenal (Schwarzenberger *et al.*, 2000b; Brown *et al.*, 2001). Ya en 1983, el estudio de Bouissou en grandes mamíferos, asoció los comportamientos agresivos y el aumento de testosterona a los periodos reproductores, particularmente en especies reproductoras estacionales. En diversas especies, se ha comprobado que la variación hormonal está regulada por cambios estacionales (Aguirre *et al.*, 2007; Abáigar *et al.*, 2010). Al realizar el análisis de las medias de las concentraciones de andrógenos incluyendo el factor *hábitat* y el factor *estación*, nuestros resultados en la población de rinocerontes en libertad, aparece una interesante diferencia estadísticamente significativa, en cuanto a los

niveles de andrógenos, que parecen reflejar este concepto, siendo las concentraciones hormonales en verano, estadísticamente superiores a las de invierno (coincidiendo con los resultados de los niveles de glucocorticoides, pues recordemos que son también ligeramente superiores durante el verano, tanto para los rinocerontes en libertad como para los de semi-cautividad). Además, nuestro resultado concuerda con lo descrito por Kretzschmar y colaboradores (2004), que no sólo observaron un aumento en la concentración de andrógenos en los machos durante la época de lluvias sino que además, pudieron relacionarlo con el comportamiento reproductivo que presentaron dichos animales en esa misma época (mayor número de conflictos y acercamientos sexuales), de forma que señalaron la posibilidad de la existencia de un ligero patrón reproductivo estacional en el rinoceronte blanco.

Otro factor que pudiera haber elevado los niveles de andrógenos durante el verano, es el aumento de temperatura, pues en las gónadas masculinas (testículos) se tiene que mantener una cierta temperatura para evitar una reducción en la calidad y movilidad espermática (Pincher, 1945; El-Sheikh y Casida, 1955). Este efecto de termorregulación, es posible que haya generado un aumento en la producción andrónica a nivel gonadal, elevando significativamente la media de la concentración de andrógenos durante el verano en los rinocerontes en libertad (reserva sudafricana).

Como cabía esperar, la concentración media de andrógenos encontrada en los machos es superior a la de las hembras, aunque sorprendentemente, no es una diferencia estadísticamente significativa. Por otro lado, en el análisis realizado según el *sexo* y la *estación*, la concentración de la media de andrógenos es estadísticamente superior durante los meses de verano para ambos sexos, lo que vuelve a hacer referencia al patrón reproductivo estacional antes comentado, que pudiera existir en el rinoceronte blanco (Kretzschmar *et al.*, 2004).

Además, la concentración media de **progestágenos** más alta la obtenemos también en los rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc), seguidos de los mantenidos en libertad (Reserva), observando las concentraciones más bajas en los rinocerontes en cautividad (Zoo). Estos resultados, coinciden con los niveles de andrógenos, siendo los rinocerontes mantenidos en semi-cautividad los que presentan la media más alta. Debido a las diferentes condiciones que presenta cada hábitat y en concreto en el Bioparc (semi-cautividad), la existencia de relaciones sociales intraespecíficas que mantienen los rinocerontes de este hábitat, podrían derivar en el aumento de los niveles de progestágenos, estadísticamente diferentes

a los otros dos hábitats de nuestro estudio. Es importante destacar, que las hembras que se encuentran en semi-cautividad son las más jóvenes de nuestro estudio, pudiendo ser el factor edad, el que produce esta diferencia significativa en las medias de progestágenos de los distintos hábitats estudiados.

Al introducir el factor *estación*, tan solo en los rinocerontes de la reserva sudafricana observamos diferencias significativas en la media de la concentración de progestágenos, siendo dichos niveles, superiores durante el invierno. Puesto que este hábitat es el que usamos como referencia en nuestro estudio comparativo, para valorar lo que ocurre en dos hábitats distintos de cautividad, tomamos como detalle, que los valores de progestágenos aumentan significativamente durante el invierno sudafricano en los rinocerontes en libertad y el hecho de que no exista dicha diferencia estacional en los rinocerontes en cautividad y semi-cautividad, puede deberse precisamente al hecho de su condición en cautividad y la consecuente alteración de su fisiología y ritmos biológicos. Por otro lado, el hecho de que la media de progestágenos aumente en invierno en los rinocerontes en libertad, podría asociarse nuevamente a lo anteriormente comentado respecto a la reproducción estacional en el rinoceronte blanco, ya que es sabido, que los progestágenos regulan el comportamiento sexual femenino (Norris, 2007; Guerra-Araiza *et al.*, 2009). Por otro lado, debemos tener en cuenta que una o varias de las hembras en libertad podría haber estado gestante durante nuestro periodo de recogida de muestras, y debido a que los niveles de progestágenos aumentan drásticamente durante la gestación, principalmente a partir del tercer mes de gestación (Garnier *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Schwarzenberger *et al.*, 1996b; Schwarzenberger *et al.*, 2000b; MacDonald *et al.*, 2008), la media de progestágenos obtenida podría estar inusualmente elevada, en caso de existir alguna gestación en las hembras de rinoceronte en libertad estudiadas. Si fuera esta la causa de la diferencia estadística encontrada en las concentraciones de progestágenos entre invierno y verano, coincidiríamos con Garnier y colaboradores (2002) en que en la naturaleza, los rinocerontes son poliéstricos y reproductores no estacionales, siendo el rinoceronte de Sumatra, la única especie de las cinco especies actuales de rinoceronte, que presenta ovulación inducida (Roth *et al.*, 2001; Hermes *et al.*, 2007).

En la concentración media de progestágenos que presentan las hembras y los machos, tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa, aunque los niveles son levemente superiores en las hembras. Los progestágenos, son producidos por todos los tejidos esteroideogénicos como intermediarios en la síntesis

de la mayoría de las hormonas esteroides, sintetizándose principalmente en la corteza adrenal, en los testículos y en los ovarios (De Geyter *et al.*, 2002; Norris, 2007). Es por esto, que las concentraciones que presentan tanto los machos como las hembras, no difieren significativamente entre ellos, de acuerdo a lo descrito por Morden y colaboradores (2011), que tampoco encontraron diferencias significativas en la concentración de progestágenos entre renos machos y hembras. Por tanto, sugerimos la imposibilidad de sexar la especie objeto de este estudio, en base a la concentración de progestágenos.

Los niveles de **estrógenos** encontrados en los distintos hábitats, muestran una concentración significativamente superior en los rinocerontes mantenidos en cautividad y semi-cautividad respecto a los rinocerontes en libertad. En base a la bibliografía consultada, algunos autores indican que los niveles de estrógenos en el rinoceronte, pueden aumentar en base a la alimentación, pues los fitoestrógenos suplementados en la dieta, pueden elevar dichas concentraciones, además de afectar a la reproducción en dichos animales (Tubbs *et al.*, 2012). Sabemos que la alimentación de los rinocerontes en cautividad y semi-cautividad, se basa principalmente en pienso, heno y alfalfa, aunque desconocemos la proporción de fitoestrógenos que podrían estar ingiriendo de forma habitual mediante la dieta, no descartamos la posibilidad de la influencia que pudieran haber tenido sobre las concentraciones de estrógenos analizadas en las tres poblaciones de rinocerontes del estudio.

En las dos estaciones del estudio, la media de la concentración de estrógenos se eleva significativamente en los rinocerontes en cautividad durante el verano, mientras que en los rinocerontes en libertad, dicho aumento ocurre durante el invierno, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Ya ha quedado referenciado, que las condiciones en cautividad alteran la fisiología normal de los animales, por ello, los ciclos hormonales normales de los rinocerontes en cautividad pueden estar alterados, provocando este extraño aumento en la concentración de estrógenos, que ocurre a la inversa de lo que parece suceder en esta especie, en su hábitat natural. Aún así, también habría que tener en cuenta que cabe la posibilidad de que el aumento de estrógenos durante el invierno en la población en libertad, esté relacionado con los fitoestrógenos que reciben mediante el suplemento alimenticio antes comentado.

En las hembras de los rinocerontes estudiados en libertad, el aumento de la concentración de estrógenos durante el invierno, coincide con la elevación de progestágenos. Puesto que los andrógenos son precursores de los estrógenos, la concentración media de los andrógenos en esta estación (invierno) es significativamente inferior en comparación al verano, pues parece que los andrógenos han sido convertidos a estrógenos (mediante el complejo enzimático citocromo P450 aromatasas) catalizando la conversión de la testosterona en estradiol-17 β y la androstenediona en estrona (Gruber *et al.*, 2002; Moyes y Schulte, 2007) tanto a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal como a nivel gonadal, aumentando consecuentemente la media de los niveles de estrógenos y disminuyendo la media de los niveles de andrógenos, ambos, de forma estadísticamente significativa, en los rinocerontes en libertad durante el invierno sudafricano. Por otro lado, en base a los resultados de las concentraciones de estrógenos obtenidas, parece que vuelve a quedar reflejado el patrón reproductivo estacional que parece observarse en esta especie respecto a todas las hormonas sexuales.

La concentración de estrógenos y andrógenos, se mantienen en niveles basales durante la gestación (Schwarzenberger *et al.*, 1996b; Schwarzenberger *et al.*, 2000b), pudiendo ser utilizados como referencia de ciclos ovulatorios (Kassam y Lasley, 1981; Kock *et al.*, 1991). Es por esto, que si una o varias de las hembras en libertad hubieran estado gestantes durante la recogida de muestras de nuestro estudio, esperaríamos quizás que los niveles de estrógenos hubieran resultado inferiores durante el invierno, aunque en cualquier caso, dependería de la etapa de la gestación en que se encontraran las hembras. Sin olvidar, por otro lado, que los fitoestrógenos suplementados por la dieta podría estar alternado los niveles de estrógenos.

La concentración media de estrógenos en base al factor sexo, es mayor en las hembras respecto a los machos, aunque sorprendentemente, no es un resultado estadísticamente significativo. Cabría esperar, que dicha concentración fuera significativamente diferente entre ambos sexos, pues a nivel gonadal y debido a los ciclos estrales de las hembras, la producción de estrógenos varía cíclicamente, encontrando concentraciones plasmáticas bajas justo antes de la ovulación y altas en la fase preovulatoria, cuyo aumento es también responsable del comportamiento reproductivo en la hembra (Norris, 2007; Gruber *et al.*, 2002), sin embargo, con el muestreo realizado en heces, es posible que dicha elevación no haya sido detectada. Por otro lado, debido a la importancia que también poseen los

estrógenos sobre los machos, tanto a nivel de los órganos reproductores (Hess *et al.*, 1997; Gruber *et al.*, 2002) como a nivel de comportamiento reproductor (Norris, 2007) parece motivo suficiente, para que no haya sido posible detectar diferencias estadísticas, en las medias de las concentraciones de estrógenos entre ambos sexos en la especie objeto de este estudio.

Respecto a las hormonas sexuales, podemos resumir todo lo anteriormente descrito, en varios puntos:

- La media de los niveles de andrógenos, aumenta significativamente durante el verano o estación lluviosa, tanto para los machos como para las hembras en su hábitat natural, no habiéndose observado dicha diferencia en los dos hábitats de cautividad estudiados. Este resultado coincide con lo descrito por Krestzchmar y colaboradores (2004), según los cuales, dicho aumento en la concentración de andrógenos en los machos de rinoceronte, es debido a la existencia de un patrón reproductivo estacional que parece ocurrir en los rinocerontes en libertad pero que no ocurre en los mantenidos en cautividad.

- La media de la concentración de progestágenos es significativamente superior en los rinocerontes en libertad, durante el invierno sudafricano, no existiendo dicha diferencia en ninguno de los dos hábitats de cautividad estudiados. Esta diferencia, bien puede ser debida al aumento de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en respuesta a las difíciles condiciones en las que se encuentran los animales durante el invierno, puesto que son intermediarios en la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroides (De Geyter *et al.*, 2002; Norris, 2007) aumentando su producción en base a tener reservas suficientes para la producción de otras hormonas que sean requeridas. O bien, el aumento en la concentración de progestágenos, puede ser debido al patrón estacional observado en primer lugar con los niveles de andrógenos.

- La media de la concentración de estrógenos, es significativamente superior en invierno en los rinocerontes en libertad, existiendo también una diferencia estadística en los rinocerontes en cautividad, con las concentraciones más elevadas justo al contrario de lo que ocurre en libertad. Si asumimos que lo que ocurre en los rinocerontes en libertad estudiados, es lo más cercano a la normalidad fisiológica y hormonal de esta especie, este resultado podría ser consecuencia de la alteración general que se produce en los animales en cautividad, derivado de las condiciones en que se encuentran. Este aumento de estrógenos durante el invierno, también podría asociarse a la influencia de los fitoestrógenos de la dieta o con la tendencia reproductiva estacional, que nosotros no sólo hemos encontrado en relación a los andrógenos (Krestzchmar *et al.*, 2004), sino que parece ocurrir también en relación a la concentración de todas las hormonas sexuales analizadas.

1.2.1. Determinación del sexo gonadal

Algunos autores han encontrado evidencias que apoyan que la proporción entre andrógenos y estrógenos determina el sexo gonadal en todas las especies del reino animal (Bogart, 1987; Tiwary y Li, 2009). En general, el uso de dicha proporción como herramienta en la determinación del sexo mediante el análisis de muestras fecales, resulta interesante en aquellas especies en que no es fácil distinguir los machos de las hembras, como por ejemplo ocurre en muchas aves (Tell y Lasley, 1991).

Como en la mayoría de mamíferos, en los rinocerontes, la observación directa del animal permite distinguir entre ambos sexos, pero a veces resulta una tarea complicada la correcta identificación del individuo, o cuando, por ejemplo, no es posible ver el momento de la defecación. Por ello, hemos considerado interesante desarrollar un modelo, que permita la identificación del sexo a través de las concentraciones relativas de estrógenos y andrógenos obtenidas mediante la determinación hormonal en muestras fecales. Esto sería una alternativa económica a los análisis genéticos que pueden realizarse en la actualidad, facilitando así el manejo de poblaciones en libertad. Por lo que este tipo de análisis, no solo es relevante evaluarlo en la especie de este estudio, sino también para realizarlo en otras especies salvajes.

Con nuestros datos, hemos ajustado tres modelos de regresión logística binaria con el fin de evaluar la capacidad predictiva sobre el sexo de los rinocerontes a través de las concentraciones fecales de estrógenos (E) y andrógenos (A). De estos tres modelos, el modelo I, sería el equivalente al ratio estrógenos: andrógenos (E:A) que es el más comúnmente utilizado (Tell y Lasley, 1991). Este modelo, es el que presenta el mayor porcentaje total de aciertos (74,9%), resultando muy sensible en la detección de las heces de las hembras (80,7%). Sin embargo, este modelo es poco específico, clasificando el 31,3% de las muestras de los machos como del sexo hembra. El modelo II, es el que presenta una especificidad y sensibilidad más equilibrada en la determinación gonadal de los sexos, presentando tasas de acierto similares tanto para las hembras (76,0% aciertos) como para los machos (72,9% aciertos), de forma que es capaz de discriminar entre ambos sexos con una confianza media del 74,6%. Finalmente hemos descartado el modelo III, por haber sido el menos fiable en la determinación del sexo (67,3%).

Un estudio realizado en búhos manchados (*Strix occidentalis occidentalis*), observó que el ratio estrógenos:testosterona (E:T) para la determinación del sexo en estas aves, estaba influenciado principalmente por el estado reproductivo y fisiológico del animal pero no por las variables del hábitat (Washburn *et al.*, 2004). De acuerdo a estos autores, en nuestros resultados detallados por animal, aunque existe gran variabilidad entre los distintos individuos analizados, observamos una mayor influencia del estado reproductivo y fisiológico del animal que de las condiciones del hábitat donde se encuentran, de esta forma, tanto los machos como las hembras de mayor edad, poseen los porcentajes de aciertos más elevados, encontrando un ajuste más pobre en aquellos individuos de menor edad o en hembras supuestamente gestantes.

Son muchos los factores que deben ser tenidos en cuenta a la hora de determinar el sexo en base al análisis hormonal, pues pueden alterar el resultado del modelo. En los rinocerontes en libertad, ya hemos comentado la variación estacional observada en la concentración de andrógenos, siendo ésta más elevada durante el verano (estación lluviosa), y en la concentración de estrógenos, que aumenta durante el invierno. Puesto que los andrógenos son precursores de los estrógenos (Gruber *et al.*, 2002; Moyes y Schulte, 2007), es lógico pensar que si se eleva la concentración de estrógenos, disminuya la del precursor, pero hay que tenerlo en cuenta a la hora de determinar el sexo en base a la concentración de dichas hormonas, y además, habría que valorar el efecto de los fitoestrógenos suplementados por la dieta (Tubbs *et al.*, 2012).

Por otro lado, también hay que tener presente que a nivel gonadal y debido a los ciclos estrales de las hembras, la producción de estrógenos varía cíclicamente, encontrando concentraciones plasmáticas bajas justo antes de la ovulación y altas en la fase preovulatoria, (Norris, 2007; Gruber *et al.*, 2002) y que además, durante la gestación, la concentración de estrógenos y andrógenos, se mantienen en niveles basales (Schwarzenberger *et al.*, 1996b; Schwarzenberger *et al.*, 2000b), lo que también podría influir en el resultado hormonal para la determinación del sexo.

En resumen, aunque el modelo ajustado en este estudio en base a la concentración de andrógenos y estrógenos posee casi un 75% de fiabilidad en la predicción del sexo, es necesario tener en cuenta el resto de factores que pudieran alterar la concentración hormonal de la muestra y no descartamos la posibilidad de realizar un modelo más fiable incluyendo la concentración de otras hormonas, como por ejemplo los progestágenos.

2. ANÁLISIS INDIVIDUAL

2.1. Rinocerontes en cautividad (Zoo)

En este hábitat, encontramos una pareja de rinocerontes (macho y hembra, Marina) que conviven juntos con una cría de unos 3 años de edad. Apartada de ellos, se encuentra la Hembra Vieja, en un recinto aislado, pero manteniendo contacto visual y olfativo con los otros individuos de su especie.

Recordemos que el análisis de los niveles de glucocorticoides es un componente esencial en la evaluación de la respuesta al estrés, que aunque debe considerarse junto a otros parámetros, ofrece una considerable información de cómo los animales perciben y se adaptan a su entorno, siendo además una medida indirecta del bienestar animal (Schwarzenberger *et al.*, 2000a; Reeder y Kramer, 2005; Sheriff *et al.*, 2011). De los tres rinocerontes de este hábitat, la concentración media de glucocorticoides de la Hembra Vieja es la más elevada. Entre la pareja, Marina presenta niveles estadísticamente superiores al macho, con el cual mantiene un perfil longitudinal similar a lo largo del tiempo. Este resultado concuerda con lo observado, puesto que el lazo más fuerte que se produce en los rinocerontes es entre una hembra y su cría más joven (Hutchins y Kreger, 2006), y su estado constante de alerta para proteger y cuidar de su cría, además de encontrarse por ello, más irritable de lo normal frente al macho con el que convive (Laurie, 1982;

Hutchins y Kreger, 2006), explicaría que los niveles de glucocorticoides de Marina sean superiores a los del macho.

Teniendo en cuenta que de forma natural, el rinoceronte blanco aparece en pequeños grupos familiares (Tatman *et al.*, 2000), y que solo los machos adultos territoriales son solitarios (Kretzschmar *et al.*, 2004; Støen *et al.*, 2009), es normal pensar que el estrés debido a las relaciones sociales de los grupos artificiales formados en cautividad, las deficiencias nutricionales o la falta de variación estacional en el suministro de alimentos, pueden influenciar en el balance hormonal y comportamiento, disminuyendo el estado de salud tanto físico como fisiológico, pudiendo llegar a causar infertilidad tanto en machos como en hembras (Gunn *et al.*, 1998; Menargues, 2005; Cinková, 2006; Schwarzenberger, 2007b).

Los mayores niveles de glucocorticoides, los encontramos en la Hembra Vieja, existiendo una diferencia estadísticamente significativa respecto a los otros dos rinocerontes de este hábitat. El hecho de encontrarse apartada de cualquier otro individuo de su especie, además de su avanzada edad, parecen haber derivado en un aumento de la concentración de glucocorticoides fecales en esta hembra, a lo que también hay que añadir un conjunto de estímulos que probablemente hayan provocado una serie de cambios internos en el animal para adaptarse a su situación. Esta respuesta, es fundamentalmente neuroendocrina, con una activación del sistema simpático-adrenomedular, que conlleva la liberación de catecolaminas y del eje corticotropo, con la liberación de hormonas adrenales que inducen cambios en el metabolismo y/o regulación iónica y que trabajan para combatir los factores fisiológicos y psicológicos para eliminar o neutralizar el estímulo estresante (Chacón, 2004; Reeder y Kramer, 2005; Norris, 2007). Pero la elevada concentración de glucocorticoides que presenta mantenida en el tiempo, puede tener efectos perjudiciales para el animal (Rothschild *et al.*, 2008) ya que podría presentar una hipertrofia de la glándula adrenal, con la consecuente pérdida de masa corporal y actividad reproductora, además de inmunosupresión (Norris, 2007). Pensamos que sus elevadas concentraciones de glucocorticoides son consecuencia de su edad, su condición fisiológica y la inactividad ovárica debido a prolongados periodos no reproductivos (Carlstead y Brown, 2005) y que dichos niveles, han podido generar patologías reproductivas en esta hembra (Hermes *et al.*, 2006), a pesar de que el análisis de los efectos del estrés sobre el eje reproductivo no está del todo claro, pudiendo incluir múltiples vías hormonales y neuronales dependiendo de la naturaleza del estímulo estresante, la especie, el

estado hormonal y social del animal (Breen *et al.*, 2005; Avitsur *et al.*, 2007; Norris y Lopez, 2011).

Marina presenta los niveles más bajos de andrógenos, seguido de la Hembra Vieja y finalmente, el macho, con los niveles más elevados. Esto coincide con Krestzchmar (2004), puesto que el macho convive con una hembra, lo que eleva de forma natural sus concentraciones de andrógenos. Por otro lado, hay que tener en cuenta el factor *sexo*, pues como en este hábitat no hay ningún otro macho, no se puede comparar y los niveles más elevados podrían deberse tan solo a una diferencia de sexo.

Los niveles de estrógenos encontrados en la Hembra Vieja son los más elevados de estos rinocerontes. Esto coincide con ser la hembra de mayor nivel de glucocorticoides, pues parece, que esa elevación hormonal, afecta en la producción de estrógenos. Su concentración de progestágenos también es la más elevada, y teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, parece que en general, esta hembra es un ejemplo de desarreglo hormonal, probablemente, como hemos señalado anteriormente, debido a la suma de varios factores: su avanzada edad, su condición fisiológica y sus condiciones de cautividad en el recinto en que se encuentra. En general, los patrones de los ciclos reproductivos en las hembras de rinoceronte blanco presentan una gran variación individual (Schwarzenberger *et al.*, 1998), de esta forma, los ciclos estrales de la Hembra Vieja, que ocurren con una cuestionable regularidad, presentan una media de la concentración de estrógenos muy elevada, lo que podría ser indicativo de la presencia de quistes foliculares (Hermes *et al.*, 2006).

Algunos autores se basan en el análisis de andrógenos, precursores de los estrógenos, como indicadores de la fase folicular, pues el análisis de estrógenos no les ha resultado demasiado fiable (Schwarzenberger *et al.*, 2004; Hirata *et al.*, 2009), mientras que la determinación de progestágenos sí ha resultado ser una herramienta eficaz para la caracterización de la fase lútea (Kock *et al.*, 1991; Schwarzenberger *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2001) siendo también un valioso indicador de la gestación (Garnier *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 1999; Schwarzenberger *et al.*, 1996b; Schwarzenberger *et al.*, 2000b; MacDonald *et al.*, 2008). Las concentraciones de progestágenos en Marina, durante el periodo de su gestación, muestran una correlación positiva muy significativa durante el periodo anterior a la inseminación artificial, manteniéndose relacionados hasta después del parto, donde deja de existir dicha correlación estadística. El hecho de que los niveles de glucocorticoides sean tan elevados durante la gestación, principalmente

durante los últimos meses, y que después del parto bajen a niveles basales, concuerda con los datos obtenidos por otros investigadores (Hudson *et al.*, 1976). Los niveles de estrógenos que presenta Marina, son significativamente inferiores a los de la Hembra Vieja, puesto que los de ésta última, están elevados anómalamente. Dentro de que existe mucha variabilidad en los ciclos estrales de las hembras de rinoceronte (Schwarzenberger *et al.*, 1998), el perfil hormonal de Marina, parece ser el único que presenta periodicidad en sus ciclos estrales.

2.2. Rinocerontes en semi-cautividad (Bioparc)

Recordemos que en este hábitat, conviven las dos hembras (Nombula y Maiai) con uno de los machos (Cirilo), y en base a los comportamientos observados, parece que Nombula ejerce el papel de dominante sobre los otros dos rinocerontes con los que cohabita. El otro macho, Rómulo, presenta una fuerte estereotipia, desarrollada con anterioridad a su traslado al Bioparc. Se mantiene en un recinto apartado, con el fin de activar el comportamiento sexual masculino mediante competencia macho-macho (Lindemann, 1982).

Así como en otras especies de rinoceronte, se ha observado un patrón territorial y agresivo más fuerte, el rinoceronte blanco es quizás de los más tranquilos (Hutchins y Kreger, 2006), lo que concuerda con nuestros resultados comportamentales observados en los rinocerontes de este hábitat (semi-cautividad), donde prevalece el comportamiento "normal y tranquilo".

La hembra subordinada, Maiai, es la que presenta la media de glucocorticoides más alta, de entre todos los rinocerontes de este parque. La dominancia social en las especies más agresivas, eleva los niveles de glucocorticoides en los individuos dominantes (Creel *et al.*, 1996 y 2005; Barja *et al.*, 2008a), sin embargo, en condiciones de cautividad, el estrés social recae sobre los subordinados, puesto que no pueden evitar al individuo dominante (Creel *et al.*, 1996). Nuestros resultados concuerdan con lo descrito por dichos autores, puesto que el rinoceronte no se caracteriza por su agresividad. Coincidiendo además, a lo observado por Metrione y colaboradores (2007), donde las dimensiones del recinto en condiciones de semi-cautividad, en este caso, como la presión que recae sobre los rinocerontes subordinados, pueden producir estrés social, confirmando el estatus de Maiai como subordinada en el grupo. Sin embargo, los niveles observados en Nombula, son superiores respecto a los del macho con el que convive (Cirilo). En este caso, las elevadas concentraciones que presenta Nombula, pueden deberse simplemente a la

diferencia de sexo, pues como ya ha sido comentado anteriormente, los niveles de glucocorticoides encontrados en todas las hembras del estudio, son significativamente superiores a los de los machos.

Los comportamientos estereotipados son inducidos a menudo por factores estresantes (Carlstead y Brown, 2005). El característico comportamiento estereotipado que presenta Rómulo, fue desarrollado en el circo en que se encontraba previamente a su introducción en el Bioparc. De acuerdo a lo descrito por diversos autores (Carlstead y Brown, 2005; Cinková, 2006; Menargues *et al.*, 2006), las conductas aberrantes que nunca se darían en libertad, son producto de las condiciones en que se encuentra el animal en cautividad. Por lo tanto, parece que las condiciones estresantes bajo las que se encontraba en el circo, le provocaron dicha estereotipia, que aún, hoy en día, mantiene en el nuevo hábitat. Dados los bajos niveles de glucocorticoides que presenta este animal, puede que dicho comportamiento en sus nuevas condiciones, sea producto de la experiencia pasada vivida y no como consecuencia de factores estresantes que pudieran existir actualmente en su hábitat (Johnstone *et al.*, 2012), sin olvidar que la estereotipia puede causar la disminución de los niveles de glucocorticoides como una adaptación al medio (Moreno *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011).

Además, tanto en rinocerontes como en otras especies, se ha determinado que las concentraciones de andrógenos están relacionadas con el rango social y el comportamiento (Owen-Smith, 1973 y 1975; Rachlow *et al.*, 1998; Kretzschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009). Los niveles de andrógenos encontrados en Nombula, son superiores a los de Maiai, y aunque la diferencia no es estadísticamente significativa, junto con los datos obtenidos de los glucocorticoides, se puede apreciar su estatus social de dominancia.

En cuanto a los machos en semi-cautividad, observamos que las concentraciones de andrógenos de Cirilo son superiores a las concentraciones que presenta Rómulo, aunque no estadísticamente significativas. Si ambos machos convivieran junto a las hembras, podríamos asociarlo quizás al rango social y determinar cierta estructura jerárquica, pero en este caso, dado que Rómulo vive apartado y sólo Cirilo se encuentra junto a las hembras, parece que la diferencia se debe casi exclusivamente a la presencia de las hembras junto a Cirilo, pues las concentraciones de andrógenos tienden a aumentar cuando los machos se encuentran en presencia de una o más hembras, estimulando la libido y la espermatogénesis (Kretzschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009). Hay que tener en cuenta que además, existe una significativa diferencia de edad entre

ambos machos (recordemos que Rómulo tiene aproximadamente unos 40 años y Cirilo la mitad). Aunque en los rinocerontes, se ha determinado que los niveles de andrógenos fecales están más relacionados con el rango social que con la edad (Kretzschmar *et al.*, 2004), es posible que en este caso, el macho dominante sea Rómulo, aunque no quede reflejado en su concentración androgénica, y posiblemente sea debido a lo ya comentado respecto a la convivencia que mantiene Cirilo con las hembras. Si fuera este el caso, Rómulo, en vez de aumentar la libido y el comportamiento sexual de Cirilo, requerimiento necesario para activar los mecanismos del comportamiento reproductor masculino (Lindemann, 1982), podría estar ejerciendo el efecto contrario, inhibiéndolo por dominancia y rango social ya que, recordemos que Cirilo tiene además una concentración de glucocorticoides estadísticamente superior a Rómulo, que podría estar afectando o incluso inhibiendo su comportamiento reproductivo (Creel *et al.*, 1992 y 1996; Gunn *et al.*, 1998; Monfort *et al.*, 1998; Goymann *et al.*, 1999; Creel, 2001; Monfort, 2003; Mooring *et al.*, 2006; Metrione *et al.*, 2007; Barja *et al.*, 2008a).

Algo similar observamos entre las hembras de este hábitat. Las concentraciones de glucocorticoides que presenta Maiai, son las más altas de entre los rinocerontes en semi-cautividad y como ya se ha descrito, elevados niveles de glucocorticoides pueden bloquear la secreción de gonadotropinas, retrasando o inhibiendo la reproducción (Norris, 2007) siendo además, el estado reproductivo, un importante modulador de la función adrenal (Barja *et al.*, 2011; Kersey *et al.*, 2011). En la hembra subordinada, encontramos los niveles más bajos de andrógenos, aunque no existe diferencia estadística alguna entre ninguno de los rinocerontes de este hábitat. Sin embargo, su baja concentración de andrógenos y elevada concentración de estrógenos, podría explicarse en base a la esteroidogénesis hormonal, mediante la que se producen estrógenos a partir de los andrógenos, siendo el complejo enzimático citocromo P450 aromatasa el encargado de metabolizar los andrógenos a estrógenos, que concretamente, cataliza la conversión de la testosterona en estradiol-17 β y la androstenediona en estrona (Gruber *et al.*, 2002; Moyes y Schulte, 2007).

Como hemos mencionado, la ciclicidad ovárica en las diferentes especies animales, suele determinarse en base a la concentración de progestágenos, pues sigue un patrón cíclico de concentración creciente desde la fase folicular a la fase lútea del ciclo estral (Hindle y Hodges, 1990; Hindle *et al.*, 1992; Heistermann *et al.*, 1998; Schwarzenberger *et al.*, 1995, 1996, 1998 y 2000b; Otrowski *et al.*, 2005; Hirata *et al.*, 2009). Nuestros resultados han señalado una correlación

positiva en cuanto a la concentración de progestágenos entre ambas hembras, siendo Nombula, la que posee una media superior, posiblemente debida a la ciclicidad ovárica que parece presentar (ciclo corto: $32,90 \pm 3,37$ días). La mayoría de los rinocerontes que se mantienen en cautividad, presentan largos periodos anovulatorios, sin actividad del cuerpo lúteo, lo que parece ser causa principal de su baja tasa reproductora en cautividad (Hermes *et al.*, 2012). Por ello, el análisis de progestágenos ha resultado ser una poderosa herramienta tanto para la valoración de la funcionalidad del cuerpo lúteo, como para la identificación de la duración del ciclo estral o el análisis de periodos de gestación (Schwarzenberger *et al.*, 1991, 1995 y 1996b), de esta forma, Maiai, bien puede tener el ciclo ovárico inhibido por el efecto de la dominancia de la otra hembra; puede ser que aun sea demasiado joven y esté comenzando a ciclar, como muestran los escasos picos de concentraciones elevadas que presenta durante los meses finales del estudio; o incluso, podría deberse a la presencia de quistes foliculares sin actividad del cuerpo lúteo, lo que explicaría sus elevados niveles de estrógenos y bajas concentraciones de progestágenos (Hermes *et al.*, 2007).

Aunque se han observado intentos de cópula entre Cirilo y las hembras, es posible que el fracaso reproductor esté relacionado también, además de con el estatus social y lo anteriormente explicado, con la imposibilidad de que las hembras puedan ejercer cierta selección entre los posibles machos reproductores y poder iniciar así su ciclo estral, como parece ocurrir en su hábitat natural (Owen-Smith, 1988; Kretzschmar *et al.*, 2004), habiéndose comprobado que, efectivamente, en los rinocerontes en libertad, las hembras se reproducen más habitualmente con machos alfa que defienden satisfactoriamente su territorio (Owen-Smith, 1973 y 1975; Rachlow *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que Cirilo es el único macho que convive con las hembras, si resulta no ser el macho alfa, podría explicarse el por qué de tan escaso comportamiento sexual y las anomalías de los ciclos en las hembras, que en su conjunto, desembocan en fracaso reproductor. De ahí la importancia de identificar correctamente a los machos reproductores territoriales, por ejemplo, mediante el conocimiento de su comportamiento reproductivo (Schreiber *et al.*, 1993; Parker y Waite, 1997).

Aún hoy en día se desconocen las causas del fracaso reproductor del rinoceronte en cautividad (Gunn *et al.*, 1998; Schwarzenberger *et al.*, 1999; Hermes *et al.*, 2004; Carlstead y Brown, 2005; Swaisgood *et al.*, 2006). En el caso concreto de este hábitat, y los problemas que encuentran los responsables de este parque a la hora de intentar reproducir a sus rinocerontes de forma natural, sugerimos la idea de intercambiar a Rómulo por otro macho más joven e incluso de menor condición corporal, con el fin de evitar el efecto de la posible dominancia social que parece estar ejerciendo sobre Cirilo. De esta forma, con la presencia de otro macho, permitimos que siga existiendo estimulación de la libido y comportamiento sexual masculino, para poder así aumentar las posibilidades de lograr una reproducción natural exitosa.

2.3. Rinocerontes en libertad (Reserva)

Dentro del análisis de comportamiento realizado en estos rinocerontes, apreciamos una prevalencia de comportamiento "normal y tranquilo". De los ocho rinocerontes en libertad, destacamos que Bull 17.6 es el que presenta un claro comportamiento territorial, marcando constantemente con señales de orina y esparciendo heces, además de mantener una conducta olfatoria muy activa. La mayoría de las veces lo hemos encontrado caminando solo, en otras ocasiones, se junta con ciertas hembras, siendo también el que se ha involucrado en más peleas.

En las últimas semanas del estudio, pudimos observar cómo otro de los machos (Bull 17.4.1) estaba comenzando a marcar territorio y a caminar solo, cuando hasta entonces, siempre había formado parte del grupo de Rodgie. Recordemos que dicho grupo, lo forman cuatro rinocerontes, tres de ellos incluidos en nuestro estudio: Cow Rodgie con una cría (macho, de unos 5 años), Bull 15.3.1 y Bull 17.4.1. Aunque algunos autores han observado que los grupos que se forman en libertad, muchas veces son solo una estrategia transitoria (Owen-Smith, 1973), este conjunto de rinocerontes siempre ha caminado en grupo durante todo el estudio. El resto de los rinocerontes de este hábitat, son hembras que caminan junto a sus crías o incluso a veces en grupo (Cow Stompstert, Cow TDI, Cow 7 y Cow17).

Nuestras observaciones comportamentales de los rinocerontes en libertad, además, fueron comparadas con los niveles de las distintas hormonas de este estudio y para ello, solo se tuvieron en cuenta las muestras fecales obtenidas en una ventana de tiempo de máximo 48 horas después de que ocurriera alguno de los comportamientos descritos, pues de acuerdo a lo referido por Schwarzenberger y colaboradores (1996a) en los rinocerontes, existe un retraso de entre 24-48 horas hasta que se produce la excreción de los esteroides. En este análisis, descubrimos una relación entre la concentración de andrógenos y el comportamiento territorial, sexual o agonístico. Esta interesante diferencia estadística encontrada en los rinocerontes en libertad, señalaba un aumento en las concentraciones fecales de andrógenos, cada vez que ocurría alguno de los comportamientos citados. De esta forma, parece que nuestros resultados comportamentales indican una relación tan solo, con los niveles de andrógenos, pudiendo asumir, que los andrógenos están implicados tanto en los comportamientos territoriales, como en los sexuales y en los agonísticos de los rinocerontes en libertad, coincidiendo con una gran variedad de estudios, tanto en humanos como en distintas especies animales, donde han relacionado la testosterona a alguno de dichos comportamientos: agresividad, comportamiento antisocial (Booth *et al.*, 2006), dominancia (Beehner *et al.*, 2006), comportamiento sexual (Everitt y Stacey, 1987; Alexander *et al.*, 1994) y territorialidad (Kretzschmar *et al.*, 2004).

Los resultados de glucocorticoides en todos los machos estudiados en libertad, muestran diferencias significativas en los niveles de glucocorticoides, siendo Bull 15.3.1 el que presenta la concentración más elevada, seguido de Bull 17.4.1 y finalmente 17.6. Lo que indica, que es el macho territorial el que presenta los niveles más bajos de glucocorticoides. Como ya hemos comentado anteriormente, en aquellas especies cuya dominancia requiere conductas energéticamente costosas y constantes peleas y/o porque la jerarquía de dominación está en constante cambio, se cumple la hipótesis del "estrés de la dominación", que predice que los individuos de alto rango están más estresados que los subordinados y poseen mayores niveles de glucocorticoides (Monfort *et al.*, 1998; Goymann *et al.*, 1999; Creel, 2001; Mooring *et al.*, 2006; Barja *et al.*, 2008a). En nuestros resultados, observamos que es el macho territorial el que presenta los niveles más bajos de glucocorticoides bien porque el rinoceronte blanco no es una especie especialmente agresiva (Hutchins y Kreger, 2006), y/o porque se encuentran en libertad donde no existe estrés "espacial" debido a los recintos y porque las estructuras jerárquicas sociales que se dan en libertad no son tan fuertes como las que se producen en cautividad (Metrione *et al.*, 2007).

Respecto a los niveles de andrógenos en los machos, no encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las concentraciones medias que presentan. Sin embargo, es también Bull 15.3.1 el que presenta la concentración ligeramente más elevada, seguido de cerca por Bull 17.6 y finalmente Bull 17.4.1. Sorprendentemente, no es el macho territorial, el que presenta los niveles de andrógenos más elevados, según lo descrito por diversos autores (Owen-Smith, 1973 y 1975; Rachlow *et al.*, 1998) y anteriormente comentado, pero coincidimos con Kretzschmar y colaboradores (2004), en que el aumento de andrógenos que se produce en los machos, no difiere significativamente entre ellos, pareciendo estar más relacionado con la convivencia conjunta de machos y hembras.

En su conjunto, los niveles de glucocorticoides y andrógenos encontrados en los machos en libertad, podrían deberse a que los dos machos que presentan los niveles más elevados, son precisamente los que caminan y conviven diariamente con otros machos y hembras, coincidiendo con otros autores en que la convivencia de machos con otros machos y/o hembras, aumenta los niveles de andrógenos (Kretzschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009). En cualquier caso, como ya citaron Rubinow y Schmidt (1996), los resultados hormonales de los andrógenos, pueden ser contradictorios dependiendo de la experiencia pasada y los factores sociales.

Los niveles hormonales de progestágenos y estrógenos más elevados, los presenta Bull 17.4, de entre los tres machos de este hábitat. Esto, quizás podría ser indicativo de su inicio en la etapa adulta, como nuevo macho territorial, como revelan nuestros resultados de los datos comportamentales, sin embargo, deberíamos contar con más muestras de este animal para poder verificarlo hormonalmente.

Los resultados de las medias de la concentración hormonal en las hembras en libertad, muestran en Cow 7, Stompstert y Rodgie, los niveles más elevados de glucocorticoides y andrógenos. Los niveles observados en Rodgie, podrían explicarse debido a su convivencia continuada con dos machos en el grupo o bien a una posible gestación en curso (Hudson *et al.*, 1976) a pesar de que en dicho caso, los niveles de andrógenos deberían ser basales (Schwarzenberger *et al.*, 1996b; Schwarzenberger *et al.*, 2000b). En el caso de Stompstert, sus elevados niveles de andrógenos, pueden deberse a su comportamiento antisocial (Booth *et al.*, 2006) pues en la Reserva, ha sido una de las hembras más escurridizas de encontrar, además de poco sociable, pues pocas veces se la ha visto en grupo caminando con

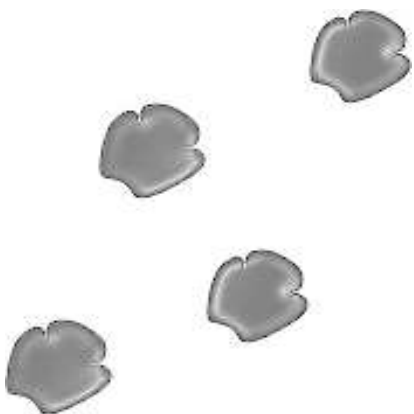
otros rinocerontes. Cabe destacar, que en esta hembra se observó además cierto comportamiento territorial, que de forma similar a los machos, estimulada por el olor del excremento de otra hembra, defecaba encima y arrastraba sus patas traseras, "barriando" la muestra fecal anterior para impregnar con su nuevo olor. Esto, podría explicar también su elevada concentración de andrógenos, ya que se asocian al comportamiento territorial (Mickzek y Oliver, 1998; Hutchins y Kreger, 2006). Por otro lado, recordemos que en rinocerontes macho en libertad, se ha determinado que los niveles de testosterona fecal están más relacionados con el rango social que con la edad, estando directamente relacionados con la defensa y marcaje del territorio e indirectamente relacionados con un mayor éxito reproductivo (Rachlow *et al.*, 1998; Kretzschmar *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2009), pudiendo ser que para el caso excepcional de esta hembra, sus niveles de andrógenos se deban a un estatus social más elevado o más dominante entre los rinocerontes en libertad.

En el caso de Cow 7, sí que hemos observado un comportamiento más sociable, caminando con otras hembras con bastante regularidad. Sin embargo, ha sido una de las hembras que más peleas ha tenido con el macho territorial (Bull 17.6), y quizás por esto, sus niveles de glucocorticoides y andrógenos se encuentran entre los más elevados, debido a que los andrógenos ya han sido relacionados con conductas agresivas y los glucocorticoides con conductas defensivas en otros estudios (Dantzer y Salaün, 1992; Rubinow y Schmidt, 1996; Mickzek y Oliver, 1998; Vasadze *et al.*, 2007).

Sabemos que los patrones de los ciclos reproductivos en las hembras de rinoceronte blanco presentan una gran variación individual (Schwarzenberger *et al.*, 1998), pero con el escaso número de muestras obtenido de estas hembras en libertad, no ha sido posible determinar los ciclos estrales de cada una de ellas.

Entre las hembras, destaca Rodgie con los niveles de progestágenos más elevados, siendo sus niveles de estrógenos de los más bajos. Puesto que su cría ya contaba con unos cinco años de edad, estos niveles hormonales nos hicieron pensar que podría estar gestante a pesar de sus elevados niveles de andrógenos (Schwarzenberger *et al.*, 1996b; Schwarzenberger *et al.*, 2000b), lo que fue finalmente confirmado hace relativamente poco tiempo, al enterarnos del nacimiento de su cría, durante el año pasado.

En pocas palabras, los datos hormonales y comportamentales aquí recogidos, nos acercan a un conocimiento más profundo de la biología reproductiva del rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) gracias a la comparación entre lo que ocurre en su hábitat natural y distintas condiciones de cautividad, que esperamos sea de utilidad para futuros trabajos y ayude a mejorar las perspectivas hacia su conservación y supervivencia mediante un correcto manejo de las poblaciones de esta especie.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Existe una correlación entre los niveles de glucocorticoides y las condiciones de cautividad en las que se encuentran los rinocerontes en cada uno de los tres tipos de hábitats. Además, la media de los niveles de glucocorticoides varía en función del sexo en esta especie.

2. En su hábitat natural, la media de los niveles de andrógenos es superior durante el verano o estación lluviosa, lo que indica la existencia de un patrón reproductivo estacional en el rinoceronte blanco en libertad y que se pierde en condiciones de cautividad.

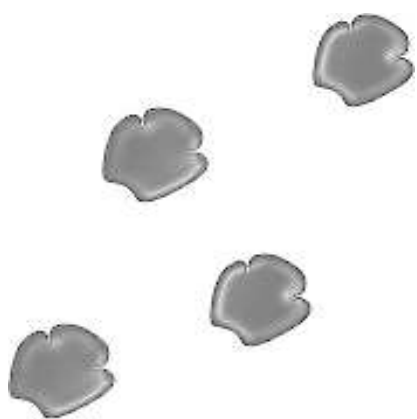
3. En el rinoceronte blanco en libertad, se observa un aumento en la concentración de andrógenos relacionada con todos los comportamientos observados, tanto territoriales como sexuales y agonísticos.

4. El análisis de las concentraciones de progestágenos ha sido un fiel indicador para la determinación de la fase lútea del ciclo ovárico y para la identificación de hembras gestantes en esta especie.

5. Las concentraciones de estrógenos y andrógenos han servido para ajustar un modelo de regresión logística binaria con un 74,6% de fiabilidad en la predicción del sexo en heces de rinoceronte blanco.

CONCLUSIÓN FINAL

Los métodos no invasivos de análisis hormonal han resultado ser potentes herramientas en el estudio de la endocrinología gonadal y adrenal del rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*).



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abáigar T, Domené MA, Palomares F (2010). Effects of fecal age and seasonality on steroid hormone concentration as a reproductive parameter in field studies. *European Journal of Wildlife Research* 56(5):781-787.
- Abbott DH, Keveme EB, Bercovitch FB, Shively CA, Mendoza SP, Saltzman W, Snowdon CT, Ziegler TE, Banjevic M, Garland T, Sapolsky RM (2003). Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behavior* 43(1):67-82.
- Abilay TA, Mitra R, Johnson HD (1975). Plasma cortisol and total progesterin levels in holstein steers during acute exposure to high environmental temperature (42°C) conditions. *Journal of Animal Science* 41(1):113-117.
- Abraham GE (1975). Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *Journal of Steroids Biochemistry* 6:261-270.
- Aguirre V, Orihuela A, Vázquez R (2007). Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Tropical Animal Health and Production* 39(4):271-277.
- Alehagen S, Wijma K, Lundberg U, Melin B, Wijma B (2001). Catecholamine and cortisol reaction to childbirth. *International Journal of Behavioral Medicine* 8(1):50-65.
- Alexander GM, Packard MG, Hines M (1994). Testosterone has rewarding affective properties in male rats: Implications for the biological basis of sexual motivation. *Behavioral Neuroscience* 108(2):424-428.
- Alvarez MB, Johnson HD (1973). Environmental heat exposure on cattle plasma catecholamine and glucocorticoids. *Journal of Dairy Science* 56(2):189-194.
- Amin R, Thomas K, Emslie RH, Foose TJ, Van Strien N (2006). An overview of the conservation status of and threats to rhinoceros species in the wild. *International Zoo Yearbook* 40(1):96-117.
- Andersson M (1994). *Sexual selection*. New Jersey: Princeton University Press.
- Apps P, Du Toit R (2006). *Creatures of Habit: Understanding African Animal Behaviour* (2nd ed.). Cape Town: Struik Nature.

- Ashley NT, Barboza PS, Macbeth BJ, Janz DM, Cattet MRL, Booth RK, Wasser SK (2011). Glucocorticosteroid concentrations in feces and hair of captive caribou and reindeer following adrenocorticotrophic hormone challenge. *General and Comparative Endocrinology* 172(3):382-391.
- Avitsur R, Kinsey SG, Bidor K, Bailey MT, Padgett DA, Sheridan JF (2007). Subordinate social status modulates the vulnerability to the immunological effects of social stress. *Psychoneuroendocrinology* 32(8-10):1097-1105.
- Barja I, Silván G, Rosellini S, Piñeiro A, González-Gil A, Camacho L, Illera JC (2007). Stress physiological responses to tourist pressure in a wild population of European pine marten. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 104(3-5):136-142.
- Barja I, Silván G, Illera JC (2008a). Relationships between sex and stress hormone levels in feces and marking behavior in a wild population of Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *Journal of Chemical Ecology* 34(6):697-701.
- Barja I, Silvan G, Rosellini S, Piñeiro A, Illera MJ, Illera JC (2008b). Quantification of sexual steroid hormones in faeces of Iberian wolf (*Canis lupus signatus*): A non-invasive sex typing method. *Reproduction in Domestic Animals* 43(6):701-707.
- Barja I, Silvan G, Martinez-Fernandez L, Illera JC (2011). Physiological stress responses, fecal marking behavior, and reproduction in wild European pine martens (*Martes martes*). *Journal of Chemical Ecology* 37(3):253-259.
- Barrette M, Monfort SL, Festa-Bianchet M, Clutton-Brock T, Russell AF (2012). Reproductive rate, not dominance status, affects fecal glucocorticoid levels in breeding female meerkats. *Hormones and Behavior* 61(4):463-471.
- Baur B, Erhardt A (1995). Habitat Fragmentation and Habitat Alterations: Principal Threats to Most Animal and Plant Species. *GAIA - Ecological Perspectives for Science and Society* 4(4):221-226.
- Bayazit V (2009). Evaluation of cortisol and stress in captive animals. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(2):1022-1031.
- Beehner JC, Bergman TJ, Cheney DL, Seyfarth RM, Whitten PL (2006). Testosterone predicts future dominance rank and mating activity among male chacma baboons. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59(4):469-479.

- Behringer V, Clauß W, Hachenburger K, Kuchar A, Möstl E, Selzer D (2009). Effect of giving birth on the cortisol level in a bonobo groups (*Pan paniscus*) saliva. *Primates* 50(2):190-193.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: Lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Genetics* 6(7):544-556.
- Bennett EL (2011). Another inconvenient truth: The failure of enforcement systems to save charismatic species. *Oryx* 45(4):476-479.
- Berger C, Nixon L (2001). HPLC. *BioPharm International*: 23-25. Recuperado de <http://www.ucm.es/BUCM/checkip.php?/docview/195754542?accountid=14514>.
- Bergmeyer HU (1983). Fundamentals. En: *Methods of enzymatic analysis* (3th ed., Vol. I, pp:118-133). Weinheim: Verlag Chemie.
- Berkeley EV, Kirkpatrick JF, Schaffer NE, Bryant WM, Threlfall WR (1997). Serum and fecal steroid analysis of ovulation, pregnancy, and parturition in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Zoo Biology* 16:121-132.
- Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* 4(7):1167-1183.
- Bertholf RL, Bowman MA (1996). Microbeads, magnets, and magic: The enchanting science of immunochemistry. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 26(5):377-388.
- Bogart MH (1987). Sex determination: a hypothesis based on steroid ratios. *Journal of Theoretical Biology* 128(3):349-357.
- Bolt RJ, Van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-Van de Waal HA (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatric Pulmonology* 32(1):76-91.
- Booth A, Granger DA, Mazur A, Kivlighan KT (2006). Testosterone and social behavior. *Social Forces* 85(1):167-191.

- Borell VE, Ladewing J (1989). Altered adrenocortical response to acute stressors or ACTH in intensive house pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 6:299-309.
- Bothma JP, Van Rooyen N, Van Rooyen MW (2004). Using diet and plant resources to set wildlife stocking densities in African savannas. *Wildlife Society Bulletin* 32(3):840-851.
- Bothma JP, Du Toit JG (2010). *Game Ranch Management* (5th ed.). Pretoria: Van Schaik Publishers.
- Bouissou M (1983). Androgens, aggressive behaviour and social relationships in higher mammals. *Hormone Research* 18:43-61.
- Breen KM, Billings HJ, Wagenmaker ER, Wessinger EW, Karsch FJ (2005). Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology* 146(4):2107-2115.
- Brousset DM, Galindo F, Valdez RA, Romano M, Schuneman de Aluja A (2005). Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Veterinaria México* 36(3):325-337.
- Brown JL, Bellem AC, Fouraker M, Wildt DE, Roth TL (2001). Comparative analysis of gonadal and adrenal activity in the black and white rhinoceros in North America by noninvasive endocrine monitoring. *Zoo Biology* 20(6):463-483.
- Brown J, Walker S, Steinman K (2005). *Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non-domestic species*. Virginia: Conservation & Research Center Smithsonian's National Zoological Park.
- Brown JL, Kersey DC, Freeman EW, Wagener T (2010). Assessment of diurnal urinary cortisol excretion in Asian and African elephants using different endocrine methods. *Zoo Biology* 29(2):274-283.
- Buchanan KL, Goldsmith AR (2004). Noninvasive endocrine data for behavioural studies: The importance of validation. *Animal Behaviour* 67(1):183-185.
- Byers JA, Moodie JD, Hall N (1994). Pronghorn females choose vigorous mates. *Animal Behaviour* 47(1):33-43.

- Carlstead K, Mellen J, Kleiman DG (1999a). Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) in U.S. zoos: I. Individual behavior profiles and their relationship to breeding success. *Zoo Biology* 18(1):17-34.
- Carlstead K, Fraser J, Bennett C, Kleiman DG (1999b). Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in U.S. zoos: II. Behavior, breeding success, and mortality in relation to housing facilities. *Zoo Biology* 18(1):35-52.
- Carlstead K, Brown JL (2005). Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive Black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. *Zoo Biology* 24(3):215-232.
- Carr JA (2002). Stress, neuropeptides, and feeding behavior: A comparative perspective. *Integrative and Comparative Biology* 42(3):582-590.
- Casey TM, Plaut K (2007). The role of glucocorticoids in secretory activation and milk secretion, a historical perspective. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 12(4):293-304.
- Chacón G (2004). *Estandarización de técnicas de enzimoimmunoensayo para la valoración del eje corticotropo en las especies bovina y canina* (Tesis Doctoral). Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
- Challis JR, Smith SK (2001). Fetal endocrine signals and preterm labor. *Biology of the Neonate* 79(3-4):163-167.
- Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A (1998). Validación de valoraciones analíticas. En: *Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF) 2ª Parte: Validación* (pp:74-78). Ginebra: Organización Mundial de la Salud. Recuperado de http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO_VSQ_97.02_spa.pdf
- Chelini MO, Palme R, Otta E (2011). Social stress and reproductive success in the female Syrian hamster: Endocrine and behavioral correlates. *Physiology and Behavior* 104(5):948-954.
- Chinnadurai SK, Millspaugh JJ, Matthews WS, Canter K, Slotow R, Washburn BK, Woods RJ (2009). Validation of fecal glucocorticoid metabolite assays for South African herbivores. *Journal of Wildlife Management* 73(6):1014-1020.

- Choleris E, Clipperton-Allen AE, Phan A, Kavaliers M (2009). Neuroendocrinology of social information processing in rats and mice. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30:442– 459.
- Christensen BW, Troedsson MHT, Young LJ, Oliva M, Penfold LM (2009). Effects of sociosexual environment on serum testosterone in captive male African rhinoceros. *Theriogenology* 71(7):1105-1111.
- Cinková I (2006). *Sexual, social and playful behavior of white rhinoceros (Ceratotherium simum) in zoological garden* (Tesis Doctoral). Universidad de Palacký Olomouc, República Checa.
- Cinková I, Kretzschmar P (2010). Social behaviour of southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) in fenced reserves in South Africa. *EEP Research Committee Newsletter* 12:48.
- Coburn S, Salman M, Rhyan J, Keefe T, McCollum M, Aune K, Miller L (2010). Comparison of endocrine response to stress between captive-raised and wild-caught bighorn sheep. *Journal of Wildlife Management* 74(3):532-538.
- Colton T (1979). Regresión y correlación. En: *Estadística en medicina* (pp:197-224). Barcelona: Masson-Salvat Medicina.
- Corlatti L, Palme R, Frey-Roos F, Hackländer K (2011). Climatic cues and glucocorticoids in a free-ranging riparian population of red deer (*Cervus elaphus*). *Folia Zoologica* 60(2):176-180.
- Creel S, Creel N, Wildt DE, Monfort SL (1992). Behavioural and endocrine mechanisms of reproductive suppression in Serengeti dwarf mongooses. *Animal Behaviour* 43(2):231-245.
- Creel S, Creel N, Monfort SL (1996). Social stress and dominance. *Nature* 379(6562):212.
- Creel S (2001). Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology & Evolution* 16(9):491-497.
- Creel S (2005). Dominance, aggression, and glucocorticoid levels in social carnivores. *Journal of Mammalogy* 86(2):255-264.

- Cyr NE, Romero LM (2008). Fecal glucocorticoid metabolites of experimentally stressed captive and free-living starlings: Implications for conservation research. *General and Comparative Endocrinology* 158(1):20–28.
- Dantzer R, Mormède P (1979). *Le stress en élevage intensif*. Paris: Masson SA.
- Dantzer R, Salaün MC (1992). Behaviour, stress and disease. En: *Livestock Health and Welfare* (pp:87-117). England: Longman Scientific & Technical.
- Dantzer B, McAdam AG, Palme R, Fletcher QE, Boutin S, Humphries MM, Boonstra R (2010). Fecal cortisol metabolite levels in free-ranging North American red squirrels: Assay validation and the effects of reproductive condition. *General and Comparative Endocrinology* 167(2):279-286.
- De Geyter C, De Geyter M, Huber PR, Nieschlag E, Holzgreve W (2002). Reproductive endocrinology: Progesterone serum levels during the follicular phase of the menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. *Human Reproduction* 17(4):933.
- Dehnhard M, Clauss M, Lechner-Doll M, Meyer H, Palme R (2001). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in roe deer (*Capreolus capreolus*) by measurement of fecal cortisol metabolites. *General and Comparative Endocrinology* 123(1):111-120.
- El-Sheikh AS, Casida LE (1955). Motility and Fertility of Spermatozoa as Affected by Increased Ambient Temperature. *Journal of Animal Science* 14:1146-1150.
- Denver RJ, Hopkins PM, McCormick SD, Propper CR, Riddiford L, Sower SA, Wingfield JC (2009). Comparative endocrinology in the 21st century. *Integrative and Comparative Biology* 49(4):339-348.
- Derzko AN (2005). Statistical practices in assay development and validation: Implementing proper statistical methods ensures the development of safe and effective assays. *IVD Technology*. Recuperado de <http://www.ivdtechnology.com/article/statistical-practices-assay-development-and-validation>
- Dubois V, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F (2012). Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(10):1651-1667.

- Edwards DP (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annual Review of Physiology* 67:335-376.
- Ekins RP (1987). An overview of present and future ultrasensitive non-isotopic immunoassay development. *Clinical Biochemist Reviews* 8:12-23.
- Emslie R, Brooks M (1999). *African Rhino: Status Survey and Action Plan*. IUCN/SSC African Rhino Specialist Group. Gland, Switzerland & UK: IUCN. Recuperado de <http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/1999-049.pdf>
- Emslie R (2011). *Updated Rhino Numbers*. Summary in Confidential Proceedings of the 9th Meeting of the IUCN African Rhino Specialist Group. IUCN African Rhino Specialist Group, Mokala National Park, Swaziland.
- Estes RD (1992). Rhinoceroses: Family *Rhinocerotidae*. En: *The behavior guide to African mammals: Including Hoofed Mammals, Carnivores, Primates* (pp:228-234). California: The University of California Press.
- Everitt BJ, Stacey P (1987). Studies of instrumental behavior with sexual reinforcement in male rats (*Rattus norvegicus*): II. Effects of preoptic area lesions, castration, and testosterone. *Journal of Comparative Psychology* 101(4):407-419.
- Fanson KV, Wielebnowski NC, Shenk TM, Lucas JR (2012). Comparative patterns of adrenal activity in captive and wild Canada lynx (*Lynx canadensis*). *Journal of Comparative Physiology* 182(1):157-165.
- Ferrell JE (1999). Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg. *BioEssays* 21:833-842.
- Fisher RA (1999). Sexual Reproduction and Sexual Selection. En: *The genetical theory of natural selection: A Complete Variorum Edition* (pp:121-145). London: Oxford University Press.
- Flauger B, Krueger K, Gerhards H, Möstl E (2010). Simplified method to measure glucocorticoid metabolites in faeces of horses. *Veterinary Research Communications* 34(2):185-195.
- Foley CA, Papageorge S, Wasser SK (2001). Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants. *Conservation Biology* 15(4):1134-1142.

- Foose TJ (1993). Global Management of rhinos. En: Ryder OA (Ed.) *Rhinoceros biology and conservation: Proceedings of an international conference* (pp:32-47). San Diego: Zoological Society of San Diego.
- Foy M, Baudry M, Thompson R (2004). Estrogen and hippocampal synaptic plasticity. *Neuron Glia Biology* 1(4):327-338.
- Freeman EW, Schulte BA, Brown JL (2010). Using behavioral observations and keeper questionnaires to assess social relationships among captive female African elephants. *Zoo Biology* 29(2):140-153.
- Gabor CS, Phan A, Clipperton-Allen A, Kavaliers M, Choleris E (2012). Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition. *Behavioral Neuroscience* 126(1):97-109.
- Ganswindt A, Palme R, Heistermann M, Borraran S, Hodges JK (2003). Non-invasive assessment of adrenocortical function in the male African elephant (*Loxodonta africana*) and its relation to musth. *General and Comparative Endocrinology* 134(2): 156-166.
- Ganswindt A, Muenscher S, Henley M, Palme R, Thompson P, Bertschinger H (2010). Concentrations of faecal glucocorticoid metabolites in physically injured free-ranging African elephants *Loxodonta africana*. *Wildlife Biology* 16(3):323-332.
- Garbrecht MR, Klein JM, Schmidt TJ, Snyder JM (2006). Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: Implications for lung development and the pulmonary surfactant system. *Biology of the Neonate* 89(2):109-19.
- García-Belenguer S, Oliver C, Mormède P (1993). Facilitation and feedback in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during food restriction in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 5(6):663-668.
- Garnier JN, Green DI, Pickard AR, Shaw HJ, Holt WV (1998). Non-invasive diagnosis of pregnancy in wild black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) by faecal steroid analysis. *Reproduction, Fertility and Development* 10(6):451-458.
- Garnier JN, Brudford MW, Goossens B (2001). Mating system and reproductive skew in the black rhinoceros. *Molecular Ecology* 10:2031-2041.

- Garnier JN, Holt WV, Watson PF (2002). Non-invasive assessment of oestrous cycles and evaluation of reproductive seasonality in the female wild black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*). *Reproduction* 123(6):877-889.
- Golden SH, Wand GS, Malhotra S, Kamel I, Horton K (2011). Reliability of hypothalamic-pituitary-adrenal axis assessment methods for use in population-based studies. *European Journal of Epidemiology* 26(7):511-25.
- Gomez A, Jewell E, Walker SL, Brown JL (2004). Use of salivary steroid analyses to assess ovarian cycles in an Indian rhinoceros at the national zoological park. *Zoo Biology* 23(6):501-512.
- Goymann W, Möstl E, Van't Hof T, East ML, Hofer H (1999). Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *General and Comparative Endocrinology* 114(3):340-348.
- Graham L, Schwarzenberger F, Möstl E, Galama W, Savage A (2001). A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. *Zoo Biology* 20(3):227-236.
- Groves CP, Prithiviraj F, Robovský J (2010). The sixth Rhino: A Taxonomic Re-Assessment of the Critically Endangered Northern White Rhinoceros. *Plos One* 5(4):1-15.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002). Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine* 346(5):340-352.
- Guerier AS, Bishop JM, Crawford SJ, Schmidt-küntzel A, Stratford KJ (2012). Parentage analysis in a managed free ranging population of southern white rhinoceros: Genetic diversity, pedigrees and management. *Conservation Genetics* 13(3):811-822.
- Guerra-Araiza C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Armengual-Villegas A, Miranda-Martínez A, Lima-Hernández FJ, González-Flores O (2009). Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 90(1):73-81.

- Gunn IM, Thorne A, Trounson A (29-31 Octubre, 1998). *Infertility/subfertility in the southern white rhinoceros (Ceratotherium simum simum) and the evaluation of their reproductive parameters as to other related species*. Paper presented at a workshop on problems associated with the low rate of reproduction among captive-born female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) (pp:37-47). The International Rhinoceros Foundation and Zoological Society of San Diego, San Diego.
- Guyton AC, Hall JE (2011). Endocrinología y reproducción. En: *Tratado de Fisiología Médica* (12ª ed., pp:879-1028). Barcelona: Elsevier España SL.
- Guzman C, Hernandez-Bello R, Morales-Montor J (2010). Regulation of steroidogenesis in reproductive, adrenal and neural tissues by cytokines. *Open Neuroendocrinology Journal* 3:161-169.
- Hamilton WD (1964). The genetic evolution of social behaviour. *Journal of Theoretical Biology* 7:1-52.
- Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe J (1994). Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Hormones and Behavior* 28(4):464-476.
- Harcourt RG, Turner E, Hall A, Waas JR, Hindell M (2010). Effects of capture stress on free-ranging, reproductively active male weddell seals. *Journal of Comparative Physiology* 196(2):147-154.
- Harris DC (2007). Garantía de calidad. En: Navarro VB, Murcia AB (Eds.) *Análisis químico cuantitativo* (3ª ed., pp:720-744). Barcelona: Editorial Reverté SA.
- Heistermann M, Agil M, Büthe A, Hodges JK (1998). Metabolism and excretion of oestradiol-17beta and progesterone in the sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Animal Reproduction Science* 53(1-4):157-172.
- Hermes R, Hildebrandt TB, Göritz F (2004). Reproductive problems directly attributable to long-term captivity—asymmetric reproductive aging. *Animal Reproduction Science* 82–83:49–60.

- Hermes R, Hildebrandt TB, Blottner S, Walzer C, Silinski S, Patton ML, Wibbelt G, Schwarzenberger F, Göritz F (2005). Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *C.s. cottoni*): Evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation. *Theriogenology* 63(1):219-238.
- Hermes R, Hildebrandt TB, Walzer C, Göritz F, Patton ML, Silinski S, Anderson MJ, Reid CE, Wibbelt G, Tomasova K, Schwarzenberger F (2006). The effect of long non-reproductive periods on the genital health in captive female white rhinoceroses (*Ceratotherium simum simum*, *C.s. cottoni*). *Theriogenology* 65(8):1492-1515.
- Hermes R, Göritz F, Streich WF, Hildebrandt TB (2007). Assisted reproduction in female rhinoceros and elephants: current status and future perspective. *Reproduction in Domestic Animals* 42(2):33-44.
- Hermes R, Hildebrandt TB, Walzer C, Göritz F, Gray C, Niemuller C, Schwarzenberger F (2012). Estrus induction in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Theriogenology* 78(6):1217-1223.
- Hess RA, Bunick D, Ki-Ho L, Bahr J (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390(6659):509-512.
- Hesterman H, Jones SM, Schwarzenberger F (2008). Reproductive endocrinology of the largest dasyurids: Characterization of ovarian cycles by plasma and fecal steroid monitoring. Part I: The Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisi*). *General and Comparative Endocrinology* 155(1):244-254.
- Hindle JE, Hodges JK (1990). Metabolism of oestradiol-17 beta and progesterone in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Journal of Reproduction and Fertility* 90(2):571-580.
- Hindle JE, Möstl E, Hodges JK (1992). Measurement of urinary oestrogens and 20 alpha-dihydroprogesterone during ovarian cycles of black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceroses. *Journal of Reproduction and Fertility* 94(1):237-249.

- Hirata M, He P, Shibuya N, Uchikawa M, Yamauchi N, Hashimoto S, Hattori M (2009). Progesterone, but not estradiol, synchronizes circadian oscillator in the uterus endometrial stromal cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 324(1-2):31-38.
- Houfflin-Debarge V, Deruelle P, Jaillard S, Magnenant E, Riou Y, Devisme L, Puech F, Storme L (2005). Effects of antenatal glucocorticoids on circulatory adaptation at birth in the ovine fetus. *Biology of the Neonate* 88(2):73-78.
- Hulsman A, Dalerum F, Ganswindt A, Muenscher S, Bertschinger HJ, Paris M (2011). Non-invasive monitoring of glucocorticoid metabolites in brown hyaena (*Hyaena brunnea*) feces. *Zoo Biology* 30(4):451-458.
- Hudson S, Mullford M, Whittlestone WG, Payne E (1976). Bovine plasma corticoids during parturition. *Journal of Dairy Science* 59(4):744-746.
- Hutchins M, Kreger MD (2006). Rhinoceros behaviour: implications for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook* 40:150-173.
- Illera JC, Silván G, Illera MJ, Illera M, Portela A, García-Alonso L, Cornélissen G, Halberg F (1993). Circadian cortisol rhythm of rabbits kept on different lighting regimens. *Chronobiologia* 20:219-232.
- Illera M (1999). *Diccionario de acrónimos con símbolos y abreviaturas para las ciencias de la salud*. Madrid: Fundación Wellcome España.
- Illera JC, Silván G, Munro CJ, Lorenzo PL, Illera MJ, Liu IK, Illera M (2003). Amplified androstenedione enzymeimmunoassay for the diagnosis of cryptorchidism in the male horse: Comparison with testosterone and estrone sulphate methods. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 84(2-3):377-382.
- Jameson JL (2007). *Harrison: Endocrinología*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Jenkin G, Young IR (2004). Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Animal Reproduction Science* 82-83:567-581.
- Jerjes WK, Cleare AJ, Peters TJ, Taylor NF (2006). Circadian rhythm of urinary steroid metabolites. *Annals of Clinical Biochemistry* 43:287-294.

- Johnstone CP, Reina RD, Lill A (2012). Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B. Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 182(7):861-879.
- Joshi VW (1985). Non isotopic immunoassay for the estimation of steroid hormones. En: Pal SB, de Gruyter W (Eds.) *Immunoassay Technology* (Vol. 1, pp:151-181). Berlin.
- Joyce BG, Read GF, Fahmy DR (1977). A specific enzyme immunosorbent immunoassay for progesterone in human plasma. *Steroids* 29:761-779.
- Kahlke R, Lacomat F (2008). The earliest immigration of woolly rhinoceros (*Coelodonta tologojensis*, *rhinocerotidae*, *mammalia*) into Europe and its adaptive evolution in palaeartic cold stage mammal faunas. *Quaternary Science Reviews* 27(21-22):1951-1961.
- Kanarek AD (2005). Method validation guidelines. *Biopharm International*:28-33. Recuperado de <http://www.biopharminternational.com/biopharm/Analytical+Methods+Articles/Method-ValidationGuidelines/ArticleStandard/Article/detail/185606>
- Kassam AA, Lasley BL (1981). Estrogen excretory patterns in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), determined by simplified urinary analysis. *American Journal of Veterinary Research* 42(2):251-255.
- Kenagy GJ, Place NJ (2000). Seasonal changes in plasma glucocorticosteroids of free-living female yellow-pine chipmunks: Effects of reproduction and capture and handling. *General and Comparative Endocrinology* 117(2):189-199.
- Kersey DC, Wildt DE, Brown JL, Snyder RJ, Huang Y, Monfort SL (2011). Rising fecal glucocorticoid concentrations track reproductive activity in the female giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *General and Comparative Endocrinology* 173(2):364-370.
- Klein SL, Gamble HR, Nelson RJ (1999). *Trichinella spiralis* infection in voles alters female odour preference but not partner preference. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45(5):323-329.
- Kock N, Morton D, Kock M (1991). Reproductive parameters in free-ranging female black rhinoceroses (*Diceros bicornis*) in Zimbabwe. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 58(1):55-57.

- Konjevic D, Janicki Z, Slavica A, Severin K, Krapinec K, Bozic F, Palme R. (2011). Non-invasive monitoring of adrenocortical activity in free-ranging fallow deer (*Dama dama L.*). *European Journal of Wildlife Research* 57(1):77-81.
- Kretzschmar P (2002). *Ecological, endocrinological and ethological investigations of female mate choice in free-ranging white rhinoceros (Ceratotherium simum simum)* (Tesis Doctoral). Universidad de Greifswald, Alemania.
- Kretzschmar P, Ganslober U, Dehnhard M (2004). Relationship between androgens, environmental factors and reproductive behavior in male white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Hormones and Behavior* 45(1):1-9.
- Lance VA, Patton ML, Hagey LR (2001). Identification of a series of C21O2 pregnanes fecal extracts of a pregnant black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*). *Steroids* 66:875-881.
- Laurie A (1982): Behavioural ecology of the greater one-horned rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Journal of Zoology* 196:307-341.
- Leader-Williams N, Brett RA, Brooks M, Craig I, Du Toit RF, Emslie R, Knight MH, Stanley-Price MR, Stockil O (1997). A scheme for differentiating and defining the different situations under which live rhinos are conserved. *Pachyderm* 23:24-28.
- Lequin RM (2005). Enzyme Immunoassay (EIA) / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 51(12): 2415-2418.
- Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ (2005). Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 359(1-2):189-194.
- Liehr JG, Ulubelen AA, Strobel HW (1986). Cytochrome P-450-mediated redox cycling of estrogens. *The Journal of Biological Chemistry* 261(36):16865-16870.
- Liehr JG, Roy D (1990). Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radical Biology & Medicine* 8(4):415-423.
- Lindemann H (1982). *African rhinoceroses in captivity* (Tesis Doctoral). Universidad de Copenhague, Dinamarca.

- Linklater WL, Swaisgood RR (2008). Reserve size, conspecific density, and translocation success for black rhinoceros. *Journal of Wildlife Management* 72(5):1059-1068.
- Linklater WL, MacDonald EA, Flamand J, Czekala NM (2010). Declining and low fecal corticoids are associated with distress, not acclimation to stress, during the translocation of African rhinoceros. *Animal Conservation* 13(1):104-111.
- Liu AC, Lewis WG, Kay SA (2007). Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nature Chemical Biology* 3(10):630-639.
- Liu PY, Veldhuis JD (2009). The Hypothalamo-Pituitary Unit, Testes and Male Accessory Organs. En: Strauss JF, Barbieri RL (Eds.) *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management* (6th ed., pp:283-298). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Lösel R, Wehling M (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. Nature Reviews. *Molecular Cell Biology* 4(1):46-56.
- MacDonald EA, Linklater WL, Steinman KJ, Czekala NM (2008). Rapid colour-change pregnancy test for rhinoceros using faeces. *Endangered Species Research* 4:277-281.
- Maggio ET (1987). *Enzyme Immunoassay* (pp:1-3). CRC Press: Florida.
- Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL (2002). Sex steroids and bone. *Recent Progress in Hormone Research* 57:385-409.
- Mason GJ, Veasey JS (2010). How should the psychological well-being of zoo elephants be objectively investigated? *Zoo Biology* 29(2):237-255.
- Masunda B, Mutisi C, Hamudikuwanda H, JGO Agumbah (1999). The concentration of faecal progestins during the oestrous cycle in Nkone cows and the effect of duration of storage of faecal samples at room temperature on faecal progestin levels. *Tropical Animal Health and Production* 31(6):373-381.
- Matipano G (2004). Post-release ranging behaviour of hand-raised black rhinoceros (*Diceros bicornis*, L.) in Matusadona National Park, Zimbabwe with recommendations for management of introduction to the wild. *Koedoe* 47(1):89-101.

- Menargues MA, Urios V, López M, Canales R, Sánchez D (9-10 Junio, 2006). *Determinación del bienestar animal a través del cortisol en saliva en el elefante asiático y el rinoceronte indio*. Póster presentado en la Reunión de AIZA. Asociación Ibérica de Zoos y Acuarios, Lisboa.
- Metrione LC (2005). *The influences of social behaviour on reproduction in captive White rhinoceros (Ceratotherium simum simum)* (Tesis Doctoral). Universidad de Illinois, EEUU.
- Metrione LC, Penfold LM, Waring GH (2007). Social and spatial relationships in captive southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Zoo Biology* 26(6):487-502.
- Metrione LC, Harder JD (2011). Fecal corticosterone concentrations and reproductive success in captive female southern white rhinoceros. *General and Comparative Endocrinology* 171(3):283-292.
- Mickzek KA, Oliver B (1998). Neurochemical bases of aggression. En: Dodman NH, Shuster L (Eds.) *Psychopharmacology of Animal Behaviour Disorders* (pp:17-41). Malden, Massachusetts: Blackwell Science.
- Milliken T, Emslie RH, Talukdar B (20 Noviembre, 2009). *African and Asian Rhinoceroses – Status, Conservation and Trade*. A report from the IUCN Species Survival Commission (IUCN/SSC) African and Asian Rhino Specialist Groups and TRAFFIC to the CITES Secretariat pursuant to Resolution Conf. 9.14 and Decision 14.89 of the 15th meeting of the Conference of the Parties (CoP 15 Doc. 45.1A annex, pp:1-18). Copenhagen, Denmark.
- Moberg GP (1991). How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science* 74(1):304-311.
- Møller AP, Jennions MD (2001). How important are direct fitness benefits of sexual selection? *Naturwissenschaften* 88:401-415.
- Monfort SL, Mashburn KL, Brewer BA, Creel SR (1998). Evaluating adrenal activity in african wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 29(2):129-133.

- Monfort SL (2003). Non invasive endocrine measures of reproduction and stressing wild populations. En: Holt WV, Pickard AR, Rodger JC, Wildt DE (Eds.) *Reproductive science and integrated conservation* (pp:147-165). Cambridge: Cambridge University Press.
- Mooring MS, Patton ML, Lance VA, Hall BM, Schaad EW, Fefler GA, Fortin SS, McPeak KM (2006). Glucocorticoids of bison bulls in relation to social status. *Hormones and Behavior* 49(3): 369-375.
- Morden C, Weladji RB, Ropstad E, Dahl E, Holand Ø, Mastro Monaco G, Nieminen M (2011). Fecal hormones as a non-invasive population monitoring method for reindeer. *Journal of Wildlife Management* 75(6):1426-1435.
- Moreno A, Silván G, Illera JC, Illera J (2011). *Endocrinología de pequeños animales*. Madrid: LID Editorial empresarial SL.
- Mormède P, Foury A, Terenina E, Knap PW (2011). Breeding for robustness: The role of cortisol. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* 5(5):651-657.
- Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews LR (2000). Urinary corticosteroids: an indicator of stress in dairy cattle. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 60:218-221.
- Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews LR (2002). Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *General and Comparative Endocrinology* 126(2):229-241.
- Morrow-Tesch J, Dailey JW, Jiang H (1998). A video data base system for studying animal behavior. *Journal of Animal Science* 76(10):2605-2608.
- Morton DJ, Anderson E, Foggin CM, Kock MD, Tiran EP (1995). Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *The Veterinary Record* 136(3):60-63.
- Möstl E, Messmann S, Bagu E, Robia C, Palme R (1999). Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe A* 46(10):621-631.

- Möstl E, Maggs JL, Schrötter G, Besenfelder U, Palme R (2002). Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Veterinary Research Communications* 26(2):127-139.
- Möstl E, Palme R (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23(1-2):67-74.
- Moyes CD, Schulte PM (2007). *Principios de Fisiología Animal*. Madrid: Pearson Education SA.
- Munro CJ, Stabenfeldt G (1984). Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *The Journal of Endocrinology* 101(1):41-49.
- Munro CJ, Stabenfeldt G (1985). Development of a cortisol enzyme immunoassay in plasma. *Clinical Chemistry* 31(6):956.
- Munro CJ, Lasley BL (1988). Technology and application in polypeptide and steroid hormones detection. En: Albertson BD, Haseltine FP (Eds.) *Non radiometric methods for immunoassay of steroid hormones* (pp:289-329). New York: Liss Inc.
- Munro CJ, Stabenfeldt GH, Cragun JR, Addiego LA, Overstreet JW, Lasley BL (1991). Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Clinical Chemistry* 37(6):838-844.
- Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B, Ripoll C (2004). Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. *Steroids* 69:531-36.
- Ndibualonji B, Dehareng D, Beckers F, Van Eenaeme C, Godeau JM (1997). Continuous profiles and within-day variations of metabolites and hormones in cows fed diets varying in alimentary supplies before short-term feed deprivation. *Journal of Animal Science* 75(12):3262-3277.
- Neumann G, Gottschalk J, Eulenberger K, Grün E (2002). The stability of progesterone in feces of different wild animal species kept in a zoological garden. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 109(5):245-249.

- Nguyen TV, Jayaraman A, Quaglino A, Pike CJ (2010). Androgens selectively protect against apoptosis in hippocampal neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 22(9):1013-1022.
- Norris DO (2007). *Vertebrate Endocrinology* (4th ed.) London: Elsevier Academic Press.
- Norris DO, Lopez KH (Eds). (2011). *Hormones and Reproduction of Vertebrates: Mammals* (Vol. 5). London: Elsevier Academic Press.
- Nowak RM (1999). *Walker's Mammals of the World* (Vol. 1, 6th ed.). Maryland: The Johns Hopkins University Press.
- Ogutu JO, Owen-smith N, Piepho H, Kuloba B, Edebe J (2012). Dynamics of ungulates in relation to climatic and land use changes in an insularized African savanna ecosystem. *Biodiversity & Conservation* 21(4):1033-1053.
- Ostrander MM, Ulrich-Lai Y, Choi DC, Richtand NM, Herman JP (2006). Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology* 147(4):2008-2017.
- Ostrowski S, Blanvillain C, Mésochina P, Khairi I, Schwarzenberger F (2005). Monitoring reproductive steroids in feces of Arabian oryx: Toward a non-invasive method to predict reproductive status in the wild. *Wildlife Society Bulletin* 33(3):965-973.
- Owen-Smith R (1971). Territoriality in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) Burchell. *Nature* 231:294-296.
- Owen-Smith R (1973). *The behavioural ecology of the white rhinoceros* (Tesis Doctoral). Universidad de Wisconsin, Madison, EEUU.
- Owen-Smith R (1975). The social ethology of the white rhinoceros *Ceratotherium simum* (Burchell 1817). *Zeitschrift Für Tierpsychologie* 38(4):337-384.
- Owen-Smith RN (1988). *Megaherbivores: The influence of very large body size on ecology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Owen-Smith RN (2004). Rhinoceroses. En: Grzimek B (Ed.) *Grzimek's animal life encyclopedia* (2^a ed., pp:249-262). Michigan: Gale Group.

- Palme R, Fischer P, Schidorfer H, Ismail MN (1996). Excretion of infused ^{14}C -steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science* 43(1):43-63.
- Palme R, Möstl E (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *International Journal of Mammals Biology* 62(2):192-197.
- Palme R, Robia C, Messman S, Hofer J, Möstl E (1999). Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non invasive parameter of adrenocortical function. *Wien Tierärztliche Monatsschrift* 86:237-241.
- Palme R, Robia C, Baumgartner W, Möstl E (2000). Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolite concentration. *The Veterinary Record* 146:108-109.
- Parker PG, Waite TA (1997). Mating systems, effective population size, and conservation of natural populations. En: Clemmons JR, Buchholz R (Eds.), *Behavioral approaches to conservation in the wild* (pp: 243-261). Cambridge: Cambridge University Press.
- Partridge L, Halliday T (1984). Mating patterns and mate choice. En: Krebs JR, Davies NB (Eds.) *Behavioural ecology an evolutionary approach* (Vol. 2, pp:222-250) Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Patton ML, Swaisgood RR, Czekala NM, White AM, Fetter GA, Montagne JP, Lance VA (1999). Reproductive cycle length and pregnancy in the southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) as determined by fecal pregnane analysis and observations of mating behavior. *Zoo Biology* 18(2):111-127.
- Pelletier F, Bauman J, Festa-Bianchet M (2003). Fecal testosterone in bighorn sheep (*Ovis canadensis*): Behavioural and endocrine correlates. *Canadian Journal of Zoology* 81(10):1678-1684.
- Perrin MR, Brereton-Stiles R (1999). Habitat use and feeding behaviour of the buffalo and the white rhinoceros in the Hluhluwe-Umfolozi Game Reserve. *South African Journal of Wildlife Research* 29(3):72-80.
- Petrowski K, Wintermann G, Siepmann M (2012). Cortisol response to repeated psychosocial stress. *Applied Psychophysiology and Biofeedback* 37(2):103-107.

- Pincher HC (1945). Effect of Temperature on Fertility of the Male. *Nature* 155:272.
- Pinna G, Agis-Balboa R, Pibiri F, Nelson M, Guidotti A, Costa E (2008). Neurosteroid biosynthesis regulates sexually dimorphic fear and aggressive behavior in mice. *Neurochemical Research* 33(10):1990-2007.
- Pirovino M, Heistermann M, Zimmermann N, Zingg R, Clauss M, Codron D, Steinmetz HW (2011). Fecal glucocorticoid measurements and their relation to rearing, behavior, and environmental factors in the population of pileated gibbons (*Hylobates pileatus*) held in European zoos. *International Journal of Primatology* 32(5):1161-1178.
- Player IC, Feely JM (1960). A preliminary report on the square-lipped rhinoceros *Ceratotherium simum simum*. En: *The Lammergeyer* (Vol.1, pp:3-25). Pietermaritzburg, South Africa: The Journal of the Natal Parks, Game and Fish Preservation Board.
- Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL, Carlone GM (1994). Determination of parallelism and nonparallelism in bioassay dilution curves. *Journal of Clinical Microbiology* 32(10):2441-2447.
- Poessel SA, Biggins DE, Santymire RM, Livieri TM, Crooks KR, Angeloni L (2011). Environmental enrichment affects adrenocortical stress responses in the endangered black-footed ferret. *General and Comparative Endocrinology* 172(3):526-533.
- Pradhan NMB, Wegge P, Moe SR, Shrestha AK (2008). Feeding ecology of two endangered sympatric megaherbivores: Asian elephant *Elephas maximus* and greater one-horned rhinoceros *Rhinoceros unicornis* in lowland Nepal. *Wildlife Biology* 14(1):147-154.
- Prendergast BJ, Nelson RJ, Zucker I (2002). Mammalian Seasonal Rhythms: Behavior and Neuroendocrine Substrates. En: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT (Eds.) *Hormones, Brain and Behavior* (Vol. 2, pp:93-156). Chicago: Elsevier Science.
- Qian X, Droste SK, Lightman SL, Reul JM, Linthorst AC (2012). Circadian and ultradian rhythms of free glucocorticoid hormone are highly synchronized between the blood, the subcutaneous tissue, and the brain. *Endocrinology* 153(9):4346-4353.

- Rachlow JL, Berkeley EV, Berger J (1998). Correlates of male mating strategies in white rhinos (*Ceratotherium simum*). *Journal of Mammalogy* 79(4):1317-1324.
- Radcliffe RW, Czekala NM, Osofsky SA (1997). Combined serial ultrasonography and fecal progesterin analysis for reproductive evaluation of the female white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*): preliminary results. *Zoo Biology* 16:445-456.
- Radcliffe RW, Eyres AI, Patton ML, Czekala NM, Emslie RH (2001). Ultrasonographic characterization of ovarian events and fetal gestational parameters in two southern black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) and correlation to fecal progesterone. *Theriogenology* 55:1033-1049.
- Reddy DS, Castaneda DC, O'Malley BW, Rogawski MA (2004). Anticonvulsant activity of progesterone and neurosteroids in progesterone receptor knockout mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 310:230-239.
- Reeder DM, Kramer KM (2005). Stress in free-ranging mammals: Integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalogy* 86(2):225-235.
- Rehnus M, Hackländer K, Palme R (2009). A non-invasive method for measuring glucocorticoid metabolites (GCM) in Mountain hares (*Lepus timidus*). *European Journal of Wildlife Research* 55(6):615-620.
- Reid C, Slotow R, Howison O, Balfour D (2007). Habitat changes reduce the carrying capacity of Hluhluwe-Umfolozi Park, South Africa, for critically endangered black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Oryx* 41(2):247-254.
- Rieches R (29-31 Octubre, 1998). *Concerns with breeding F1 white rhinoceros in zoological institutions*. Paper presented at a workshop on problems associated with the low rate of reproduction among captive-born female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) (pp: 4-5). The International Rhinoceros Foundation, Zoological Society of San Diego, San Diego.
- Rizzi A (1998). Retention and selectivity. En: Katz E, Eksteen R, Schoenmakers P, Neil Miller N (Eds.) *Handbook of HPLC* (Vol. 78, pp:1-54). New York: Marcel Dekker Inc.

- Romero LM (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 128(1):1-24.
- Rookmaaker K (2000). The alleged population reduction of the Southern White Rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) and the successful recovery. *Säugetierkundliche Mitteilungen* 45(2):54-70.
- Roth TL, O'Brien JK, McRae MA, Bellem AC, Romo SJ, Kroll JL, Brown JL (2001). Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian cycle and early pregnancy in the Sumatran rhinoceros, *Dicerorhinus sumatrensis*. *Reproduction* 121:139-149.
- Roth TL (2006). A review of the reproductive physiology of rhinoceros species in captivity. *International Zoo Yearbook* 40:130-143.
- Rothschild DM, Serfass TL, Seddon WL, Hegde L, Fritz RS (2008). Using fecal glucocorticoids to assess stress levels in captive river otters. *Journal of Wildlife Management* 72(1):138-142.
- Rubinow DR, Schmidt PJ (1996). Androgens, brain, and behavior. *The American Journal of Psychiatry* 153(8):974-984.
- Salvador A (2012). Steroid hormones and some evolutionary-relevant social interactions. *Motivation and Emotion* 36(1):74-83.
- Sánchez-Criado JE, Juana Martín IM, Bellido C, Tena-Sempere M, Aguilar R, Blanco A (2004). Biological role of pituitary estrogen receptors ER α and ER β on progesterone receptor expression and action and on gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 79(5):247-258.
- Sandi C, Castro-Alamancos M, Cambroner J, Bailón C, Guaza C, Borrel J (1989). Interactions between the immune system and the neuroendocrine system. Implications of the hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis. *Archivos de Neurobiología* 52(6):277-286.
- Sapolsky RM (2004). Social status and health in humans and other animals. *Annual Review of Anthropology* 33:393-418.

- Sauerwein H, Müller U, Brüssel H, Lutz W, Möstl E (2004). Establishing baseline values of parameters potentially indicative of chronic stress in red deer (*Cervus elaphus*) from different habitats in western Germany. *European Journal of Wildlife Research* 50(4):168-172.
- Sauter SN, Roffler B, Philipona C, Morel C, Romé V, Guilloteau P, Blum JW, Hammon HM (2004). Intestinal development in neonatal calves: Effects of glucocorticoids and dependence on colostrum feeding. *Biology of the Neonate* 85(2): 94-104.
- Schibler U, Ripperger J, Steven AB (2003). Peripheral circadian oscillators in mammals: Time and food. *Journal of Biological Rhythms* 18(3):250-260.
- Schreiber A, Kolter L, Kaumanns W (1993). Conserving patterns of genetic diversity in endangered mammals by captive breeding. *Acta Theriologica* 38(2):71 – 88.
- Schuurs AH, Van Weemen BK (1977). Enzyme immunoassay. *Clinica Chimica Acta* 81(1):1-40.
- Schwarzenberger F, Möstl E, Bamberg E, Pammer J, Schmechlik O (1991). Concentrations of progestagens and oestrogens in the faeces of pregnant lipizzan, trotter and thoroughbred mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 44:489-499.
- Schwarzenberger F, Francke R, Göltenboth R (1993). Concentrations of faecal immunoreactive progestagen metabolites during the oestrous cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). *Journal of Reproduction and Fertility* 98(1):285-291.
- Schwarzenberger F, Speckbacher G, Bamberg E (1995). Plasma and fecal progestagen evaluations during and after the breeding season of the female vicuna (*Vicuna vicuna*). *Theriogenology* 43(3):625-634.
- Schwarzenberger F, Möstl E, Palme R, Bamberg E (1996a). Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 42(1-4):515-526.

- Schwarzenberger F, Tomasova K, Holeckova D, Matern B, Möstl E (1996b). Measurement of fecal steroids in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme-immunoassays for 20-oxo-pregnanes. *Zoo Biology* 15:159-171.
- Schwarzenberger F, Walzer C, Tomasova K, Vahala J, Meister J, Goodrowe KL, Zima J, Strauß G, Lynch M (1998). Faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Animal Reproduction Science* 53(1-4):173-190.
- Schwarzenberger F, Walzer C, Tomasova K, Zima J, Göritz F, Hermes R, Hildebrandt TB (1999). Can the problems associated with the low reproductive rate in captive white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) be solved within the next 5 years? *Verhandlungsbericht über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere* 39:283-289.
- Schwarzenberger F, Walzer C, Weiss R, Pucher HE, Leus K, Bircher P, Moran JF (31 mayo-4 Junio, 2000a). *Faecal cortisol metabolites in response to management practices and disturbance in different herbivores and carnivores (Ceratotherium simum, Diceros bicornis, Elephas maximus, Loxodonta africana, Okapia johnstoni, Rupicapra rupicapra and Lutra lutra)*. Paper presented at the 3rd scientific meeting of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (pp:201-204). EAZWV, Paris, France.
- Schwarzenberger F, Rietschel W, Vahala J, Holeckova D, Thomas P, Maltzan J, Baumgartner K, Schaftenaar W (2000b). Faecal progesterone, oestrogen, and androgen metabolites for noninvasive monitoring of reproductive function in the female Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *General and Comparative Endocrinology* 119(3):300-307.
- Schwarzenberger F, Fredriksson G, Schaller K, Kolter L (2004). Fecal steroid analysis for monitoring reproduction in the sun bear (*Helarctos malayanus*). *Theriogenology* 62(9):1677-1692.
- Schwarzenberger F (2007a). Non-invasive endocrine monitoring using fecal steroid analysis: opportunities and challenges. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36:87-88.

- Schwarzenberger F (2007b). The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook* 41(1):52-74.
- Shamsuddin AM, Harris CC (1983). Improved enzyme immunoassays using biotin-avidin-enzyme complex. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 107(10):514-517.
- Sheriff MJ, Bosson CO, Krebs CJ, Boonstra R (2009). A non-invasive technique for analyzing fecal cortisol metabolites in snowshoe hares (*Lepus americanus*). *Journal of Comparative Physiology. Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 179(3):305-313.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R (2011). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166(4):869-887.
- Shrader AM, Owen-Smith N (2002). The role of companionship in the dispersal of white rhinoceroses (*Ceratotherium simum*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52(3):255-261.
- Silván G (1991). *Correlaciones entre tamaño folicular y niveles de hormonas esteroides en ganado vacuno* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Slage KM, Ghosn SJ (1996). Immunoassays. Tools for sensitive, specific and accurate test results. *Laboratory Medicine* 27(3):177-183.
- Soltis J (2010). Vocal communication in African Elephants (*Loxodonta africana*). *Zoo Biology* 29(2):192-209.
- Støen O, Pitlagano ML, Moe SR (2009). Same-site multiple releases of translocated white rhinoceroses *Ceratotherium simum* may increase the risk of unwanted dispersal. *Oryx* 43(4):580-585.
- Stoops MA, Pairan RD, Roth TL (2004). Follicular, endocrine and behavioural dynamics of the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) oestrous cycle. *Reproduction* 128(6):843-856.
- Stouffer RL (2003). Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: Beyond steroidogenesis. *Human Reproduction Update* 9(2):99.

- Summers CH (2002). Social interaction over time, implications for stress responsiveness. *Integrative and Comparative Biology* 42(3):591-599.
- Swaigood RR, Dickman DM, White AM (2006). A captive population in crisis: testing hypotheses for reproductive failure in captive-born southern white rhinoceros females. *Biology Conservation* 129:468-476.
- Symonds HW, Prime GR, Pullar RA (1994). Preliminary evidence for the enterohepatic circulation of progesterone in the pig. *The British Veterinary Journal* 150(6):585-593.
- Taillon J, Côté SD (2008). Are faecal hormone levels linked to winter progression, diet quality and social rank in young ungulates? An experiment with white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) fawns. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62(10):1591-1600.
- Tatman CS, Stevens-Wood B, Smith BV (2000). Ranging behaviour and habitat usage in black rhinoceros, *Diceros bicornis*, in a Kenyan sanctuary. *African Journal of Ecology* 38(2):163-172.
- Taylor W (1971). The excretion of steroid hormone metabolites in bile and feces. *Vitamins and Hormones* 29:201-285.
- Tell LA, Lasley BL (1991). An automated assay for fecal estrogen conjugates in the determination of sex in avian species. *Zoo Biology* 10(4):361-367.
- Thanos PK, Cavigelli SA, Michaelides M, Olvet DM, Patel U, Diep MN, Volkow ND (2009). A non-invasive method for detecting the metabolic stress response in rodents: Characterization and disruption of the circadian corticosterone rhythm. *Physiological Research* 58(2):219-228.
- Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: The role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction* 5(2):105-113.
- Tiwary BK, Li W (2009). Parallel evolution between aromatase and androgen receptor in the animal kingdom. *Molecular Biology and Evolution* 26(1):123-129.

- Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R (2003). Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology* 130(3):267-278.
- Trivers RL (1972). Parental investment and sexual selection. En: Campbell B (Ed.) *Sexual selection and the descent of man* (pp:136-179). Chicago: Aldine Publishing Company.
- Tsai MJ, O'Malley B (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Revision Biochemistry* 63:451-486.
- Tsatsanis C, Dermitzaki E, Venihaki M, Chatzaki E, Minas V, Gravanis A, Margioris AN (2007). The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(13):1638-1655.
- Tubbs C, Hartig P, Cardon M, Varga N, Milnes M (2012). Activation of southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) estrogen receptors by phytoestrogens: Potential role in the reproductive failure of captive-born females? *Endocrinology* 153(3):1444-1452.
- Turner JW, Tolson P, Hamad N (2002). Remote assessment of stress in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*) by measurement of adrenal steroids in feces. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33(3):214-221.
- Urbanski HF (2011). Role of circadian neuroendocrine rhythms in the control of behavior and physiology. *Neuroendocrinology* 93(4):211-222.
- Van Coeverden G, Peter J, Putnam AS, Erb P, Scott C, Melnick D, Oryan C, Boag PT (2011). Conservation genetics of the black rhinoceros, *Diceros bicornis bicornis*, in Namibia. *Conservation Genetics* 12(3):783-792.
- Van Weemen BK, Schuurs AH (1971). Immunoassay using antigen enzymes conjugates. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* 15:232-237.
- Vasadze L, Petriashvili E, Museliani T, Nikolaishvili M, Djariashvili T (2007). Action of ACTH fragment on the rates aggressive behavior and the distribution of transmitter amino acids in the brain structures. *Georgian Medical News* 152:45-47.

- Vick MM, Wildt DE, Turner JB, Palme R, Wolfe BA, Pukazhenthil BS (2012). Glucocorticoid response to changes in enclosure size and human proximity in the Persian onager (*Equus hemionus onager*). *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* 15(1):52-61.
- Viljoen JJ, Ganswindt A, du Toit J, Langbauer WJ (2008). Translocation stress and faecal glucocorticoid metabolite levels in free-ranging African savanna elephants. *South African Journal of Wildlife Research* 38(2):146-152.
- Vingren JL, Kraemer WJ, Ratamess NA, Anderson JM, Volek JS, Maresh CM (2010). Testosterone Physiology in Resistance Exercise and Training: The Up-Stream Regulatory Elements. *Sports Medicine* 40(12):1037-1053.
- Wada H (2008). Glucocorticoids: Mediators of vertebrate ontogenetic transitions. *General and Comparative Endocrinology* 156(3):441-453.
- Wallner B, Möstl E, Dittami J, Prossinger H (1999). Fecal glucocorticoids documents stress in female Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). *General and Comparative Endocrinology* 113(1):80-86.
- Washburn BE, Tempel DJ, Millspaugh JJ, Gutiérrez RJ, Seamans ME (2004). Factors related to fecal estrogens and fecal testosterone in California spotted owls. *The Condor* 106(3):567-579.
- Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millspaugh JJ, Larson S, Monfort SL (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 120:260-275.
- Weibel L, Maccari S, Van Reeth O (2002). Circadian clock functioning is linked to acute stress reactivity in rats. *Journal of Biological Rhythms* 17(5):438-446.
- Weingrill T, Gray DA, Barrett L, Henzi SP (2004). Fecal cortisol levels in free-ranging female chacma baboons: Relationship to dominance, reproductive state and environmental factors. *Hormones and Behavior* 45(4):259-269.
- White AM, Swaisgood RR, Czekala N (2007a). Differential investment in sons and daughters: Do white rhinoceros mothers favor sons? *Journal of Mammalogy* 88(3):632-638.

- White AM, Swaisgood RR, Czekala N (2007b). Ranging patterns in white rhinoceros, *Ceratotherium simum simum*: Implications for mating strategies. *Animal Behaviour* 74:349-356.
- Wingfield JC, Lynn SE, Soma KK (2001). Avoiding the costs testosterone: Ecological bases of hormone-behavior interactions. *Brain, Behavior and Evolution* 57(5):239-251.
- Wingfield JC, Kitaysky AS (2002). Endocrine responses to unpredictable environmental events: Stress or anti-stress hormones? *Integrative and Comparative Biology* 42(3):600-609.
- Wright LI, Tregenza T, Hosken DJ (2008). Inbreeding, inbreeding depression and extinction. *Conservation Genetics* 9(4):833-843.
- Yalow RS (1978). Heterogeneity of peptide hormones: Its relevance in clinical radioimmunoassay. *Advances in Clinical Chemistry* 20:1-47.
- Young KM, Walker SL, Lanthier C, Waddell WT, Monfort SL, Brown JL (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and Comparative Endocrinology* 137(2):148-165.

♦ **Páginas web consultadas:**

Especies amenazadas y crímenes contra la vida salvaje: www.annamiticus.com

Genetics Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov>

International Rhino Foundation (IRF): www.rhinos.org

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): www.iupac.org

IUCN Red List of Threatened Species: www.iucnredlist.org

Rhino Resource Center (RRC): www.rhinoresourcecenter.com

Save the Rhino: www.savetherhino.org

Saving Rhinos: www.savingrhinos.org

Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS: www.forumsci.co.il/HPLC/program.html

VII. Referencias bibliográficas

SOS Rhino: www.sosrhino.com

South African Department of Environmental Affairs: www.environment.gov.za

The IUCN Red List of Threatened Species: www.iucnredlist.org

WikipedianProlific: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Rhinosizes.png>

