



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**IDENTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRÓGENOS Y DEGRADACIÓN
FÍSICA DE ORINA DE OCELOTE HEMBRA (*Leopardus pardalis*) EN
CAUTIVERIO EN EL ZOOLOGICO DE QUITO EN GUAYLLABAMBA**

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Profesor Guía

Jorge Leonardo Arias Cárdenas

Autor

Joel Jhonnatan Jara Martínez

Año

2014

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Jorge Leonardo Arias Cárdenas

Doctor MVZ

C.I.: 1706591441

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos del autor vigentes”.

Joel Jhonnatan Jara Martínez

C.I.: 1715505986

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por haberme dado la fuerza y la sabiduría para alcanzar mis sueños; a la Universidad de las Américas por haberme enseñado lo que es amar mi profesión y por darme la oportunidad de estudiar en el mejor ambiente posible; a mi director de tesis Doctor Leonardo Arias y a mi correctora de tesis Doctora Consuelo Torres de la Torre por su tiempo y ayuda desinteresada; al Ministerio del Ambiente y al personal del Zoológico de Quito.

Además, a mis padres que han sido el principal apoyo moral y profesional, y porque me han dado la mejor herencia de mi vida: mi educación superior; a mi hermana Yadira; a mis primos Roberto, Katherine y Marco por haberme ayudado cuando más lo necesite con apoyo económico, intelectual, práctico y moral, ya que sin ellos no hubiese podido llegar a donde he llegado; a mi novia Dazay que con su exigencia, y su gran amor me ha hecho tomar impulso para seguir superándome en todos los aspectos de mi vida. Y sin olvidar a mi perrito que cambió mi mundo y me enseñó amar a los animales y seguir la profesión más hermosa, la de Médico Veterinario. Dios bendiga a todos y cada uno de ellos.

DEDICATORIA

La elaboración de esta investigación está dedicada a mi familia, a mi novia Dazay quienes siempre confiaron en mí. A todos los veterinarios del mundo; asimismo, a todos los animales que son la razón por la cual practico esta profesión que amo, y sin olvidar a mi mejor amigo, mi hermano y el causante que haya seguido este camino tan gratificante.

RESUMEN

La presente tesis tiene por objetivo identificar los niveles de concentración de estrógeno (estradiol) en orina en la etapa de estro en ocelote hembra (*Leopardus pardalis*) mediante la prueba enzimática ELISA; además, tiene el objetivo de determinar la degradación física de la orina que se produce con el tiempo de exposición al ambiente.

Para el presente estudio se recolectaron 26 muestras de orina de dos hembras ocelote de 5 y 9 años respectivamente. Las muestras de orina fueron recolectadas en la etapa de estro y durante la última semana de gestación de una de las hembras. Las muestras fueron debidamente filtradas y etiquetadas. Un pequeño porcentaje de cada muestra se destinó para comprobar la degradación física y el restante para su congelación a -20 grados centígrados y posterior identificación de concentración de estradiol.

El 17β estradiol fue determinado mediante inmunoensayo utilizando un anticuerpo creado, específicamente, para medir estradiol; y sus metabolitos en orina, se midió cuantitativamente, el estradiol presente en las muestras; la intensidad del color generado se detectó a través de un lector manual de placas de Micro-ELISA capaz de medir 450 nm de longitud de onda.

La concentración de estradiol en orina en hembra ocelote en etapa de estro fue de $(93,51 \pm 1.14 \text{ pg/ml})$ ($p < 0.05$) y la concentración en etapa de gestación fue de $(131.3 \pm 1.14 \text{ pg/ml})$ ($p < 0.05$). Se llegó a la conclusión que las hembras en gestación producen niveles altos de estradiol una semana antes del nacimiento de las crías; así también que el apareamiento entre los dos felinos puede ocurrir un día después del pico de estradiol en la etapa de estro.

La degradación física de orina fue determinada a través de tres exámenes diagnósticos (uroanálisis, urocultivo y tiras reactivas). Se documentó el proceso de cuatro muestras de orina para observar los cambios físicos que se dan con su exposición a factores ambientales; 2 muestras de orina se colocaron en

reposo en un lugar abierto con luz solar, a una muestra se la ubicó sin luz solar y a otra muestra se la mantuvo en refrigeración. Mediante tiras reactivas de orina se monitoreó sus cambios en intervalos de una hora y a la orina refrigerada en intervalos de 12 horas y así llegar a medir su degradación. Se calculó urobilinógeno, pH y nitritos, ya que los tres valores determinan la degradación en el orina ya sea por bacterias o por pigmentación excesiva.

En cuestión de varias horas la urobilina cambió a un pigmento de color marrón, evidenciándose que su proceso de degradación estaba iniciando, de ahí la importancia del cuidado en la conservación de las muestras.

Los valores de Urobilinógeno en orina variaron de 1 a 3 mg/dl; y dieron positivo en nitritos y el pH promedio de las muestras fue de 8. Se concluyó que las muestras de orina se degradan de 10 a 15 horas al ambiente. Además, que la exposición a la luz solar, el aire y la contaminación externa aceleran el proceso de degradación. Se recomienda no excederse más de 8 horas en su recolección para que esta orina pueda ser utilizada en exámenes de medición de estradiol.

ABSTRACT

This thesis aims to identify the concentration levels of estrogen (estradiol) in the stage of estrus of the urine of a female ocelot (*Leopardus pardalis*) through enzymatic Elisa test. This work also intends to determine the physical degradation of urine as a result of environmental exposure.

To carry out this research, it was necessary to collect 26 urine samples of two female ocelots, which were 5 and 9 years old. The urine samples were collected at the stage of estrus, and the last week of gestation. The samples were filtered and labeled appropriately for subsequent division of physical degradation and they were frozen at -20 degrees Celsius.

The 17β estradiol was determined through immunoassay by using an antibody, raised specifically to measure estradiol and its metabolites in urine, which measured estradiol present in the sample quantitatively. The intensity of the color generated was detected by a micro plate reader capable of measuring titer of 450 nm wave length.

The concentration of estradiol in urine female ocelot in estrus stage reaches values (93.51 ± 1.14 pg / ml) ($p < 0.05$) and concentration in gestation is (131.3 ± 1.14 pg / ml) ($p < 0.05$). It is concluded that pregnant female ocelots give off significantly higher levels of estradiol peaking 5 days before the birth of its offspring.

Physical degradation of urine was determined through analysis of urine (urinalysis, urine culture and test strips). Four samples were process documented. Their changes were observed, 2 samples of urine were placed at rest in an open place with sunlight, one sample was kept in a place without exposure to sunlight, and the one left was kept in a fridge. The changes in urine were monitored by using urine dipsticks within certain time. Urobilinogen, pH,

and nitrite was measured hourly, showing the three values degradation in both urine bacteria and hyperpigmentation.

Within several hours the urobilin changed brown pigment that causes urine to degrade, hence the importance of care in the preservation of samples.

The urine Urobilinogen values ranged from 1 to 3 mg/dl, the urine were positive in nitrite and the average pH of the samples was 8. It was concluded that the urine samples were degraded within 10 to 15 hours at environment temperature and sunlight, so it is recommendable not to exceed 8 hours in their collection and subsequent freezing, by this way urine can be used in tests measuring estradiol.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	3
1.1 Ubicación geográfica y/o urbana	3
1.2 Características generales de los ocelotes	3
1.2.1 El Ocelote	3
1.3 Subespecies.....	4
1.3.1 Especies con parecido físico	5
1.4 Características morfológicas	5
1.5 Distribución y hábitat de lo ocelotes.....	7
1.5.1 Estatus en el medio silvestre	8
1.5.2 Estado de conservación	9
1.6 Comportamiento.....	12
1.7 Hábitos alimenticios.....	13
1.8 Reproducción, desarrollo y ciclo de vida	13
1.8.1 Estacionalidad Reproductiva	13
1.8.2 Desarrollo y ciclo de vida del ocelote	15
1.8.3 Ciclo Estral	17
1.8.4 17 β -Estradiol	19
1.8.5 Estudios de hormonas	21
1.8.6 Biotecnología reproductiva	23
1.8.7 Métodos para la recolección de orina en ocelotes.....	25
1.8.8 Métodos para el diagnóstico de estradiol y análisis de orina	28
2 CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO	31
2.1 Materiales y métodos.....	32
2.1.1 Materiales de campo	32
2.2 Toma de muestras y estado de reproducción	34
2.3 Características y análisis del proceso de degradación física .	38
2.3.1 Degradación física de la orina	43
2.3.2 Degradación bacteriana.....	44
2.3.3 Degradación de la urobilina	45
2.3.4 Proceso de degradación.....	46
2.4 Determinación y análisis de estradiol.....	52
2.4.1 Preparación de reactivos	52
2.5 Análisis estadístico	57

2.6	Resultados y discusión	60
2.6.1	Resultados.....	60
2.6.2	Discusión.....	66
3	CAPÍTULO III. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
3.1	Conclusiones.....	71
3.2	Recomendaciones.....	74
	REFERENCIAS.....	77
	ANEXOS	86

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de esta tesis surge con el fin de investigar y obtener la concentración de estrógeno (estradiol) en el periodo de estro en orina en hembra ocelote mediante la prueba enzimática ELISA, así como la degradación física de la orina con el fin de llegar a evidenciar los cambios influenciados por factores ambientales.

Se han realizado investigaciones sobre estrógenos de hembra ocelote a lo largo de América, en Brasil se han dado la mayor cantidad de estudios. En el estro la síntesis y concentración sérica de estrógenos alcanza sus picos más altos. En investigaciones realizadas en orina se llegaron a valores de 4.94 a 151.00 pg/ml (Rodríguez y Barnabe, 2010, p.11). De igual manera, en otros estudios con ocelotes se llegó a niveles de $(131.6 \pm 4.5\text{ng/g})$ en muestras fecales. La duración promedio de esta etapa es de 6 a 10 días (Morais et al., 1996, p. 4). Además en hembras ocelote las muestras de suero, en el estro se caracterizaron por concentraciones de estradiol, las cuales fueron de 59.84 a 307.77 pg/ml y la duración del ciclo estral fue de $18,4 \pm 1,6$ días (Tebet, 1999, p. 102).

A partir de muestras de orina recolectadas de manera no invasiva se utilizó un inmunoensayo de la empresa Arbor Assays que calcula 17β -Estradiol, fue el kit más idóneo por su fácil elaboración y por ser multi especies, probado en orina de otros felinos como lince y jaguares (Arbor Assays, 2011, p.1). Se elaboró el kit estradiol y se obtuvieron niveles de concentración de estrógenos de hembras ocelote en etapa de estro y en gestación. La concentración de estradiol en orina de hembra ocelote en etapa de estro llegó a valores de $(93,51 \pm 1.14 \text{ pg/ml})$ ($p < 0.05$) y la concentración en etapa de gestación a valores de $(131.3 \pm 1.14 \text{ pg/ml})$ ($p < 0.05$). Se debe conocer que la concentración de estrógenos en orina es un poco más baja que en heces y suero (Brown, 2006, p.327).

Además, con las especies en cautiverio se pudo relacionar su comportamiento en la etapa de estro, con lo establecido en la literatura (vocalizaciones, lordosis,

cola levantada) lo que permitió obtener una mayor precisión en la cuantificación de las concentraciones hormonales (estradiol) cuando se analizó la orina de estos animales.

Asimismo se estableció como se llega a degradar la orina al estar influenciada por factores ambientales, con el objetivo de agilizar el proceso de recolección de orina en zoológicos y centros de rescate donde muchas veces hay que esperar mucho tiempo para poder coleccionar las muestras por cuestiones de manejo de animales y de horarios de apertura. Se utilizaron 3 pruebas diagnósticas para establecer la degradación física de orina, estas fueron el uroanálisis, el urocultivo y las tiras reactivas, llegándose a determinar que la orina se degrada de 10 a 15 horas al ambiente, por la pigmentación excesiva de urobilina (1-3 md/dl) la cual sufre oxidación al entrar en contacto con el ambiente; así también por la proliferación bacteriana proveniente de la contaminación externa, que se mide mediante pH alcalino y nitritos positivos en la tira reactiva de orina.

El estudio de hormonas es la clave para la conservación de la especie, todo lo antes investigado, debe desembocar en el uso de técnicas de reproducción artificial y de biotecnología.

1 CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Ubicación geográfica y/o urbana

La parroquia San Francisco de Guayllabamba está ubicada a 25 kilómetros de la ciudad de Quito, en la provincia de Pichincha. Quito Zoo se ubica a 2 kilómetros de la entrada principal, específicamente, en el barrio los huertos familiares, con extensión aproximada de 12 hectáreas donde se mantiene y conserva la mayor cantidad de animales salvajes del país (Quito Zoo, 2014).

La parroquia se encuentra a 1620 msnm, y se distingue por tener un clima cálido seco y agradable durante todo el año, con una temperatura de 18 a 28 grados centígrados (Aquicito, 2014). La parroquia limita por el norte con el cantón Pedro Moncayo, al sur con las parroquias del Quinche, Yaruquí y Tababela, al este con el cantón Cayambe y al oeste con el río Guayllabamba (Guayllabamba, 2014).

En Quito Zoo existen alrededor de 40 especies, entre ellos felinos como el ocelote; además, oso de anteojos, aves como el cóndor andino, entre otros. El zoológico se preocupa por implementar programas de educación comunitaria, que promueve la relación entre la comunidad y la naturaleza; además pertenecen a organizaciones que impulsan la preservación de la biodiversidad como la ALPZA (Asociación Latinoamericana de Parques Zoológicos y Acuarios) ayudan a mejorar la calidad de vida de animales debido a que la mayoría se encuentran en peligro de extinción (Quito Zoo, 2014).

1.2 Características generales de los ocelotes

1.2.1 El Ocelote

El ocelote posee varios nombres en América se lo conoce como: tigrillo, tigre chico, canaguaro, pumillo, hualperro, canunii, gato tigre, onsa en idioma Guaraní, gallerino y manigordo (Moreno, Kays, Giacalone-Willis, Aliaga-Rossel, Mares y Bustamante, 2012, p.2).

Tabla 1. Taxonomía del ocelote: *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758)

Reino:	Animal
Filo:	Cordados
Subfilo:	Vertebrados
Clase:	Mamífero
Orden:	Carnívoros
Familia:	Félidos
Género:	<i>Leopardus</i>
Especie:	<i>L. pardalis</i>

Tomado de Sanderson y Watson, 2011, p.2

El género *Leopardus* es uno de los más antiguos en el mundo, el cual posee alrededor de 12 millones de años de edad (Swanson, Howard, Roth, Brown, Alvarado, Burton, Stanes, Wildt, 1996, p.87). Se dice que el primer ancestro felino surgió cerca de los 35 millones de años atrás del cual se originaron las 37 especies de felinos reconocidas en la familia, de las cuales 23 están amenazadas y al borde de la extinción (Rosero, Ospina, Nestor, 2011, p.90).

1.3 Subespecies

La palabra viene del francés ocelotl que significa jaguar, su específico epíteto viene del latín *pardus* que significa pantera, y su sufijo latín *alis* que significa relativo a (Murray & Gardner, 1997, p.7). Las especies reconocidas son:

- *Leopardus pardalis pardalis*, Selva Tropical Amazónica
- *Leopardus pardalis aequatorialis*, el norte de los Andes y América Central
- *Leopardus pardalis albescens*, este de México y el sur de Texas
- *Leopardus pardalis melanurus*, Venezuela, Guyana y Trinidad
- *Leopardus pardalis mitis*, Argentina, Paraguay (muy rara subespecie)
- *Leopardus pardalis nelsoni*, suroeste de México
- *Leopardus pardalis pseudopardalis*, Colombia
- *Leopardus pardalis puseaus*, Ecuador
- *Leopardus pardalis sonoriensis*, noroeste de México y el sur de Arizona
- *Leopardus pardalis steinbachi*, Bolivia (Feline Conservation, 2011, p.2).

1.3.1 Especies con parecido físico

- **Tigrillo (*Leopardus tigrinus*)**

El tigrillo es uno de los felinos con más nombres existentes en la naturaleza entre ellos: gato manchado, tigrina, oncilla, gato atigrado, lo que ha llevado a que los nombres antes mencionados sean también usados para el ocelote y margay, desembocando en muchos errores para diferenciarlos (Murray y Gardner, 1997, p.7). Los tigrillos son uno de los felinos salvajes más pequeños de América del Sur, llegando a pesar de 1.5 a 3 kilogramos, con apariencia a los gatos caseros (Anexo 1). Posee características comunes a sus parientes cercanos, pero sin olvidar que el tigrillo es el más pequeño de sus semejantes. El tigrillo tiene orejas más largas, un hocico reducido y ojos color café (Sunquist y Sunquist, 2002, p.131).

- **Margay (*Leopardus weidii*)**

El margay posee los mismos errores en su diferenciación, derivando que en algunas partes de la Amazonia en América del Sur los nativos se refieran a ellos como: al ocelote de árbol (Sunquist & Sunquist, 2002, p.131). En el siglo XVIII el naturalista Georges Buffon fue el primero en referirse a ellos como margay. Este nombre se deriva del guaraní Mbaracayá que significa gato salvaje. Su cuerpo y su cola los diferencian, su cuerpo por ser más pequeño y su gran cola que puede llegar a medir entre el 70% del largo de su cuerpo además sus ojos son color miel (Rosero et al., 2011, p.103).

1.4 Características morfológicas

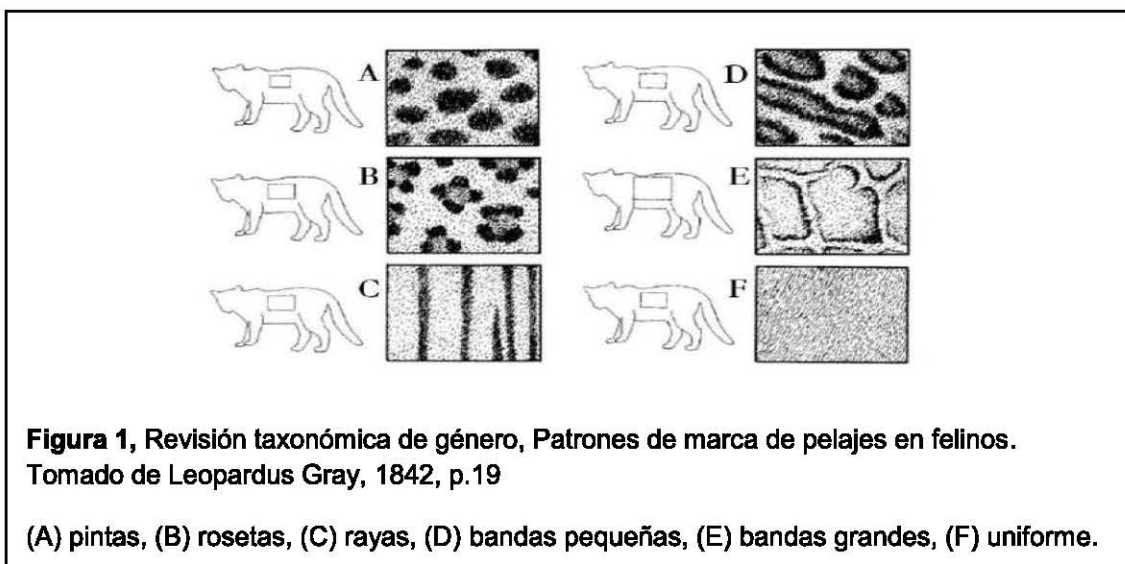
Los globos oculares son de gran tamaño, la mayoría de felinos son nocturnos y poseen una membrana reflejante en sus ojos especializada para la caza llamada tapetum lucidum (Varela, 2009, p.1). Su fórmula dentaria es $i3/3, c1/1, p2-3/2, m1/1$, sus caninos son alargados y de punta filosa. Son digitígrados, se apoyan sobre sus dedos haciendo que sus talones no toquen el suelo, presentan garras retráctiles, ya que dependen de estas para trepar toda clase

de obstáculos (Anexo 3), para defensa propia y para agarrar a sus presas (Oliveira, 2010, p.46).

Es el tercer felino más grande de la región neo tropical. Pesan de 8 a 10 kilogramos, pero en Texas Estados Unidos de Norteamérica, se encontró un ejemplar que llegó a pesar 20 kilogramos. El ocelote varía desde 72.6 cm a 100 cm de longitud, la longitud de la cola varía de 26 cm a 50 cm y su altura va de 40 a 50 cm (Anexo 4) (Oliveira & Cassaro, 2005, p.80).

El ocelote es un felino con cola anillada negra relativamente pequeña, y actúa como contrapeso cuando el felino se moviliza por los árboles (Sanderson y Watson, 2011, p.6). También, posee orejas redondeadas, las cuales son negras por detrás y con una mancha blanca llamada ocelo (Anexos 5). Asimismo, suelen poseer dos rayas negras lineales en las partes laterales de la cara. El pelaje es corto y pegado a su cuerpo. Las hembras son más pequeñas que los machos y sus ojos son de color café (Rosero et al., 2011, p.91).

El patrón de color de la capa del ocelote varía de crema, anaranjado o marrón rojizo, en ocasiones, es grisáceo y a veces con rosetas negras (Anexo 6) y el color de capa varía, incluso, dentro de una población. El cuello y el vientre son blancos, ocasionalmente, poseen manchas negras, y existen una o dos barras transversas en la parte interior de las patas traseras (Anexo 7). La mayoría de ocelotes llegan a su tamaño adulto a los 24 meses de desarrollo (Sunquist y Sunquist, 2009, p.145).



1.5 Distribución y hábitat de lo ocelotes

En Ecuador, se lo puede llegar a localizar en la Costa, la Amazonia y en la Sierra en las estribaciones de la Cordillera de los Andes, tanto en la parte oriental como occidental. Es un felino representativo del Ecuador; sin embargo, se conoce poco sobre su dispersión sobre el territorio ecuatoriano por la falta de registros de investigación y de confirmación de datos (Tirira, 2011, p.267).



Figura 2, Distribución geográfica del ocelote.

Tomado de U.S Fish / Wildlife Service, 2010.

Posee una gran distribución a lo largo de toda América. Actualmente se extiende desde el sur de Texas y la parte costera baja de México al igual que la de Costa Rica y continúa a través de América Central hasta llegar a Sudamérica en Ecuador, Perú y Paraguay (Wozencraft, 2005, p.540).

Se han reportaron avistamientos de ocelotes en estribaciones del volcán Pichincha, a 3600 msnm (Lonnberg, 1913, p.25). Su presencia en tierras bajas en la Amazonía es dudosa ya que no existe ningún registro. Los datos de avistamientos de tigrillos y ocelotes son sobre los 1000 metros en esa región del Ecuador, pero es probable que se lo encuentre en bosques secos tropicales en la Costa ecuatoriana (Oliveira, 2010, p.59). Vive en una amplia gama de

hábitats tropicales y subtropicales, bosque espinoso seco, manglar y la sabana inundada. Son muy dependientes de árboles y vegetación para no ser observados (Anexo 8-9) y en cautiverio regularmente usan fosas de cemento para descansar en su periodo diurno (Anexo 10) (Rosero et al., 2011, p.92).

1.5.1 Estatus en el medio silvestre

Su situación actual en el Ecuador, es muy escasa debido a la falta de registros, datos y de estudios. De la misma manera, las factores ambientales y biológicos limitan su presencia y distribución manteniéndola pobremente comprendida (Tirira, 2011, p.268). En los últimos años han desaparecido del trópico occidental del país, ya que la mayoría de la población se encuentra en trópico oriental (MacDonals y Loveridge, 2010, p.559).

Se encuentran en riesgo, por la pérdida de hábitat ocasionada por el ser humano, principalmente, por la deforestación, por la caza indiscriminada y también por la colonización que se está dando en los últimos años en varios sectores de los bosques de todo tipo. Se calcula que la mayoría de estos factores explicados afectó el 30% de la población en las últimas dos décadas, en las estribaciones de la Cordillera Occidental y la Región Costa (Swanson et al., 1996, p.87). El 29% muere porque son atropellados por automóviles al tratar de cruzar caminos buscando lugares para seguir sobreviviendo (Tewes, 1986, p.128).



Figura 3, Piel de ocelote de venta en Ecuador.

Tomado de Sanderson & Watson, 2011, p.101

1.5.2 Estado de conservación

Su conservación es primordial ya que son uno de los principales depredadores. Se alimentan de roedores y ungulados los que a su vez son depredadores y dispersores de semillas siendo esta interacción la principal contribución para la diversidad en los bosques tropicales (Moreno et al., 2012, p.2). Al estar al tope de la cadena alimenticia aumentan la biodiversidad limitando la población de los organismos más exitosos, permitiendo que otros organismos combatan con competidores más fuertes (Mansard, 1990, p.20).

Los ocelotes son especies focales se caracterizan porque son organismos utilizados para manejar reservas debido a que sus requerimientos de sobrevivencia representan elementos claves para mantener condiciones ecológicamente sanas. Es una especie sombrilla ya que facilita la preservación de otras especies porque sus necesidades ecológicas abarcan grandes espacios y contribuye al procedimiento de planeación de reservas ecológicas, son especies indicadoras ya que son sensibles a los cambios en su hábitat e indicadores de ecosistemas intactos. Además son especies emblemáticas, son de gran importancia, ya que llaman la atención de la gente para lograr un propósito de preservación (Anexo 11) (Miller y Rabinowitz, 2002, p.2).

Las especies del género *Leopardus* entre ellas el ocelote, tigrillo chico y el margay están protegidos por la legislación ecuatoriana, así lo indica el Ministerio del Ambiente en el registro No. 679, del 8 de octubre de 2002; y, No. 6, de 23 de enero de 2003; las cuales, detallan la prohibición por tiempo indefinido la captura, cacería, comercialización y transporte de especímenes vivos, elementos constitutivos y subproductos de la especies (Tirira, 2011, pp.210-212).

Por otro lado, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) en el año 2008 clasificó como especie casi amenazada al ocelote y vulnerable al tigrillo y margay, es decir, que según la categorías del libro rojo de mamíferos del Ecuador 2010 se determina de la siguiente manera: Casi

amenazada (NT, NEAR THREATENED) sus siglas en inglés y que determina que:

“un taxón es casi amenazado cuando ha sido evaluado pero, actualmente no satisface los criterios para En peligro Crítico, En peligro o Vulnerable, pero está próximo a calificar o es probable que califique para una categoría de amenaza en el futuro próximo”. (UICN, 2014, p. 11)

Del mismo modo, señala el tipo de amenaza Vulnerable (VU) “un taxón es vulnerable cuando la mejor evidencia disponible indica que enfrenta un alto riesgo de extinción en estado silvestre, como queda definido por cualquiera de los criterios para vulnerable”. Además la UICN conformó un grupo de gente especializada con la misión de llegar a preservar esta especie al igual que a los demás felinos neo tropicales (Tirira, 2011, p.31).

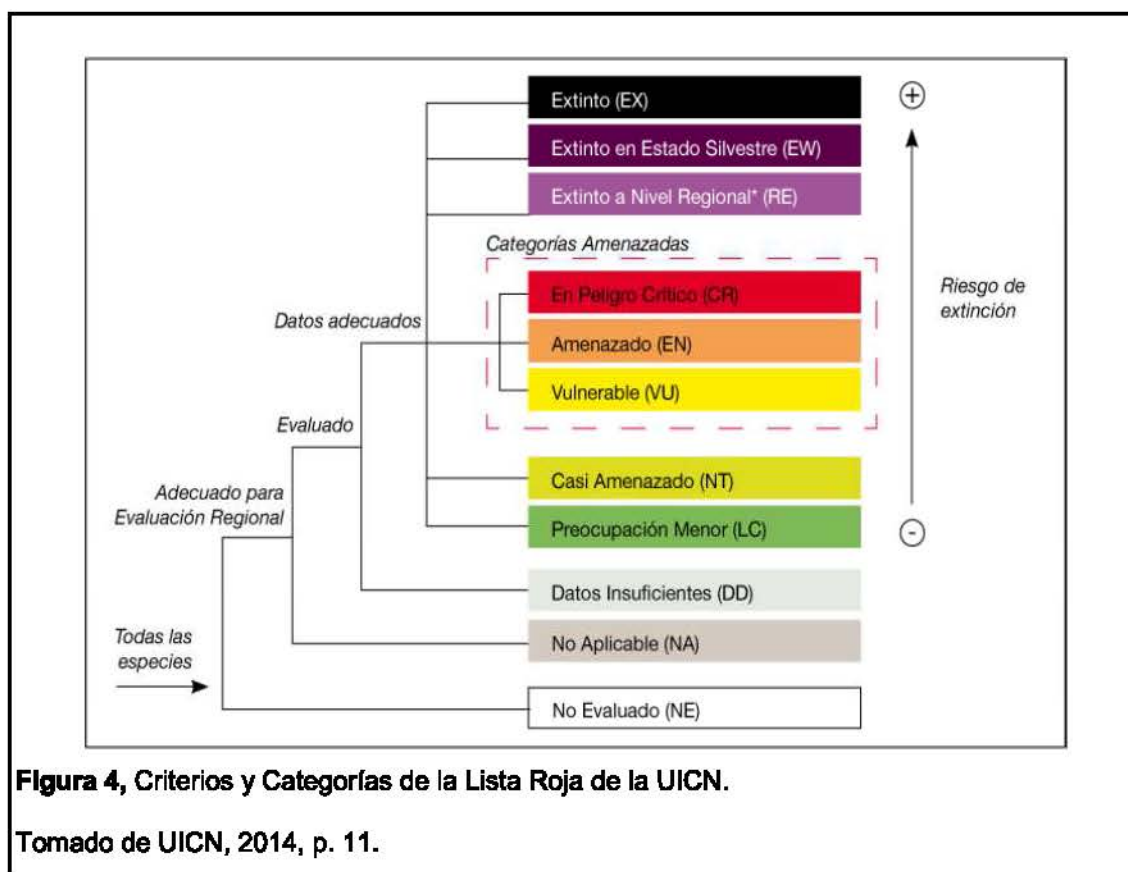


Figura 4, Criterios y Categorías de la Lista Roja de la UICN.

Tomado de UICN, 2014, p. 11.

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies amenazadas de fauna y flora silvestre (CITES) incluyó dentro del apéndice I al ocelote, tigrillo y margay, especies del género *Leopardus*, la información sobre la convención se fundamenta en la versión más nueva que entró en vigor el 12 de Junio de 2013, y de la cual Ecuador forma parte; por lo tanto, se compromete a no permitir el comercio de especímenes de las especies incluidas en los Apéndices I, II, II, excepto de acuerdo con las disposiciones de la convención, el apéndice I explica lo siguiente:

“Incluye a todas las especies en peligro de extinción que son o pueden ser afectadas por el comercio. Asimismo, el comercio de estas especies deberá estar sujeto a una reglamentación, particularmente, estricta a fin de no poner en peligro, aun mayor, su supervivencia y se autorizará solamente bajo circunstancias excepcionales” (CITES, 2013, p.7).

En el Ecuador existen áreas protegidas las cuales ocupan el 20% del territorio nacional continental e insular, donde se alberga la riqueza biológica y los servicios ecosistémicos de los cuales se benefician todos los sectores del país para propósitos turísticos, y trascienden fronteras por su importancia ecológica mundial. El Subsistema Patrimonio de Áreas Naturales del Estado (PANE) es uno de los cuatro subsistemas que en su art 405 promulgado en el 2008 define que el:

“Sistema Nacional de Áreas Protegidas garantizará la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de las funciones ecológicas, y su rectoría y regulación será ejercida por el Estado, quien asignará los recursos económicos necesarios para la sostenibilidad financiera del sistema, y fomentará la participación de las comunidades, pueblos y nacionalidades que han habitado ancestralmente las áreas protegidas en su administración y gestión” (Ministerio del Ambiente, 2014).

1.6 Comportamiento

Los ocelotes son animales solitarios por su forma de cazar, en la cual asechan a su presa a corta distancia (Rosero et al., 2011, p.93). El ocelote es el 24% activo en la mañana y el 76% en las noches, no obstante, en el medio salvaje cazan en la noche pero en cautiverio son más activos durante el día por razones de alimentación y manejo lo que hace que descansen por las noches (Rosamond Girfford Zoo, 2007, p.2).

A pesar de que los ocelotes cazan solos y las hembras crían solas a su camada sin ayuda del macho, no se comportan de manera asocial (Anexo 12) (Texas Wildlife, 2010, p.3). Los ocelotes dejan marcas de olor a lo largo de su territorio. Ambos sexos rocían orina en arbustos, árboles y en otros objetos dentro de su intervalo de terreno; también dejan sus heces descubiertas y en lugares prominentes, la continua defecación en los mismos lugares desemboca en la formación de letrinas (Emmons 1989, pp. 257).

El enriquecimiento ambiental es la práctica de un conjunto de técnicas en el cuidado de animales que se encuentran en cautividad, y consiste en mejorar su bienestar tanto físico y psicológico, estimulando el desarrollo de sus conductas e incrementando la utilización de espacio de manera positiva y así reducir los comportamientos anormales, optimizando su calidad de vida (Murray y Gardner, 1997, p.4).

En cautiverio a los ocelotes se les debe proporcionar un entorno complejo, formado de varios niveles, con vegetación y plataformas artificiales o naturales, lleno de escondites donde se sientan seguros de los humanos y de otros animales. También incorporar objetos en las instalaciones que estimulen el comportamiento en lo que respecta a la exploración, ya sea el alimento escondido en una caja debajo de una pila de paja, al interior de tubos de plástico, de bolsas o algún hueso de un animal que sea de gran tamaño, troncos para que se afilen las uñas los ocelotes, además ubicar el alimento en las alturas para estimular su comportamiento de caza. Con lo que respecta a la socialización con un congénere esta debe ser controlada y de forma gradual.

Es indispensable que los animales estén activos y saludables para que el estrés no cause problemas en su vida reproductiva (Murray y Gardner, 1997, p.4).

1.7 Hábitos alimenticios

Los hábitos alimenticios del ocelote cambian con las estaciones, la mayoría de sus presas son terrestres y nocturnas, generalmente se alimentan de animales que pesan menos de un kilogramo como la zarigüeya, ratones, ratas, conejos, agutíes, puerco espines, cuyes, pequeños primates, perezosos, ñeque centroamericano, venados y hasta pecarí de collar (Anexos 13) (Moreno, Ricardo, Samudio, 2006, p.7).

También se alimentan de murciélagos, aves, peces, culebras, lagartos y de cangrejos de tierra en época de lluvias (Emmons, 1987, p.273). Además cazan animales domésticos como cerdos y aves de corral. En cautiverio se alimentan de carne de pollo, de conejos y una dieta comercial (pellets, croquetas) a base de carne. La carne debe proceder de una fuente saludable y libre de enfermedades para los ocelotes. Para satisfacer el requerimiento de energía los ocelotes necesitan, normalmente, de 600 a 800 gramos de comida por día (Phoenix Zoo, 2014, p.1).

1.8 Reproducción, desarrollo y ciclo de vida

1.8.1 Estacionalidad Reproductiva

En cautiverio el ocelote puede hibridar con otras especies de pequeños felinos manchados. En la Guayana Francesa se dio la hibridación de un ocelote y una puma, llegaron a producir cuatro camadas y las crías siempre salieron con más parentesco hacia el ocelote (Swanson et al., 1996, p.87).

La estacionalidad reproductiva entre especies varía por muchos factores. En el caso de tigres que viven en altas latitudes presentan periodos de partos específicos entre el verano y el otoño. Las especies que viven en climas

tropicales muestran periodos de partos en temporadas específicas, pero también pueden llegar a reproducirse durante todo el año (Rodrigues y Barnabe, 2010, p.10).

De la misma manera, la estacionalidad reproductiva de los ocelotes está relacionada con el fotoperiodo y la concentración sérica de melatonina que es sintetizada y secretada por la glándula pineal. En la oscuridad esta es liberada y sintetizada (Brown, 2006, p.334).

En países con las 4 estaciones donde las noches son cortas y no se secreta mucha cantidad de melatonina se produce como consecuencia GnHR y LH, lo que provoca en la hembra el comienzo de un ciclo reproductivo. En periodos de oscuridad prolongados se daría una mayor secreción de melatonina y no habría GnHR. En conclusión, la melatonina llega a regular las funciones de las gónadas y controla su capacidad reproductiva dependiendo en la temporada en la que se encuentre (Wildt, Howard, Pelican, Brown y Pukazhenth, 2009, p.297).

La mayoría de felinos poseen características similares en lo que tiene que ver con la estacionalidad, y lo que concierne con las especies del género *Leopardus* se induce su ovulación y pueden llegar a tener su ciclo estral durante todas las temporadas del año (Morais et al., 1996, p. 4).

Los margays muestran ovulación espontánea frecuentemente lo cual los hace un poco más aptos para la reproducción. Los mecanismos de ovulación, normalmente, se los relaciona con la convivencia de las especies. Las hembras que pasan mucho tiempo solas en la selva llegan a necesitar ovocitos viables por largos periodos de tiempo hasta que puedan encontrar un macho y pueda darse el apareamiento. La ovulación inducida es el método más eficiente en este caso (Moreira et al., 2001, p.2).

1.8.2 Desarrollo y ciclo de vida del ocelote

Los machos ocelotes llegan a producir contenido espermático viable a partir de los 30 meses de edad, las hembras pueden comenzar la crianza a los 18 meses de edad, pero es más factible que lo realicen desde los 24 meses periodo en el cual pueden procrear su primera cría (Rosero et al., 2011, p.92).

La edad reproductiva máxima en estado salvaje es, aproximadamente, de 10 años. No obstante, en cautiverio aumenta la edad pero el porcentaje de probabilidad de concepción baja y no es muy alentador para su preservación. Sin embargo, el 71% de machos y el 73% de hembras se reproducen y solo el 63% de esos animales llegan a criar a sus recién nacidos de manera correcta. Otro porcentaje desalentador es que la probabilidad de concepción por estro es de 50% a 60% (Murray y Gardner, 1997, p.3).

En comparación con otros felinos de tamaño similar, los ocelotes tienen, típicamente, más largos intervalos entre nacimientos y pequeñas camadas (Tewes, 1986, p.128). En cautiverio, las hembras pueden dar a luz a más de una camada al año si los recién nacidos mueren o son removidos después de 10 a 20 días y estarían listas para otro ciclo, pero en estado silvestre es más probable que exista un intervalo de dos años entre camadas. Las hembras en cautiverio entran en celo varias veces al año es decir un ciclo de reproducción poliéstrico (varias etapas de celo) y el estro llega a durar entre 7 a 10 días (Sunquist y Sunquist, 2002, p.123).

El ocelote posee un número de vocalizaciones simpáticas a corta distancia, incluyendo un largo y sostenido aullido mientras se aparea (Sunquist y Sunquist, 2002, p. 123).

El apareamiento en animales se da al anochecer o temprano en la mañana de 1 a 5 veces en el transcurso del día (Ceballos et al., 2010, p.289). El ciclo estral ocurre cada cuatro o seis meses en estado salvaje. La cría puede llegar a nacer en cualquier época del año, el periodo de gestación dura entre 79 y 82

días y las hembras, algunas veces, paren tres crías. Han existido casos de camadas de cuatro gatitos (Feline Conservation, 2011, p.3).

Existen registros sobre el comportamiento al momento de aparearse en donde se observa que los felinos cambian su conducta al momento que la hembra entra al estro. La hembra emite vocalizaciones, y el macho olfatea su zona ano genital y sigue el rastro de la orina. Es importante conocer que la etapa de estro se caracteriza por el aumento del marcaje de olor de parte de los dos animales, y por la reducción de ingesta de alimentos. Si existiese alguna irregularidad en el proceso de concepción, la hembra volvería a llamar al macho después de 5 días (Mansard, 1990, p.18).

En vida silvestre, se da el nacimiento en una guarida o en un matorral muy denso (preferiblemente espinoso) de hierba, o en una impenetrable maraña de ramas o árboles caídos (Anexos 14). En cautiverio la hembra está en su guarida artificial y tiene una falta de apetito notoria (Animal Foundation, 2013. p.3).

En cautiverio, se conoce que los ocelotes llegan a vivir hasta 27 años. La longevidad en la naturaleza es menor. Si las hembras paren su primera camada a los dos años y medio, y después de eso tienen una cría cada dos años hasta que lleguen a tener doce años de edad, el rendimiento de la vida reproductiva puede llegar a ser de cinco crías (Rosero et al., 2011, p.92).

Tabla 2. Parámetros reproductivos de los felinos neotropicales.

Parámetros reproductivos de los pequeños felinos neotropicales			
Especie	Estro (días)	Ciclo (días)	Gestación (días)
<i>H. yaguarundi</i>	2,4 a 3,8	51,2 a 56	70 a 75
<i>L. pardalis</i>	4 a 5,3	20,8 a 29,5	70 a 85
<i>L. tigrinus</i>	3 a 9	15,2 a 17,6	73 a 78
<i>L. wiedii</i>	4 a 10	32 a 36	76 a 84
<i>O. colocolo</i>	Sin datos	Sin datos	80 a 85
<i>O. geoffroyi</i>	2 a 3	20	71 a 78
<i>O. guigna</i>	Sin datos	Sin datos	72 a 78
<i>O. jorobita</i>	Sin datos	Sin datos	63 a 70

Tomado de Varela, 2009, p.2.

1.8.3 Ciclo Estral

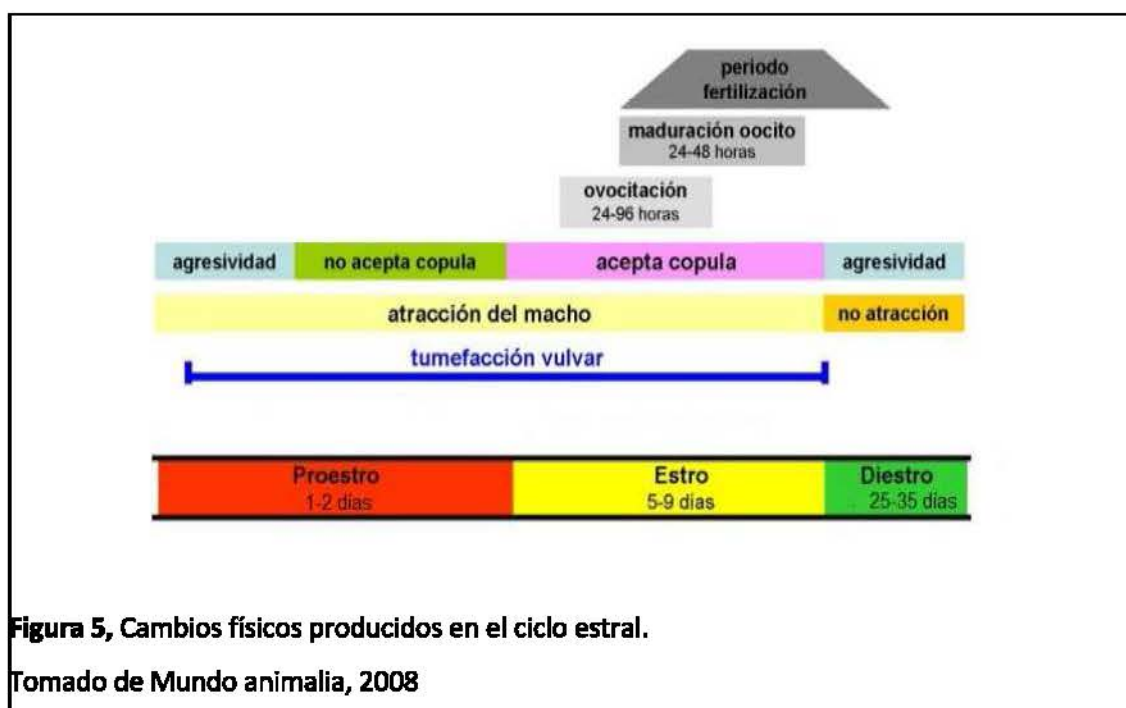
El ciclo estral de los felinos se divide en proestro, estro, interestro, diestro y anestro. El proestro es el periodo del ciclo que puede pasar inadvertido por su corta duración (1 a 2 días). Es el momento de síntesis y secreción de estrógenos y preparación para el apareamiento. La etapa de estro es muy importante ya que es la óptima para que la hembra acepte el servicio por parte del macho. Por este motivo es necesario que la hembra posea una salud estable para que no se afecte su fertilidad. Además esta etapa está relacionada estrechamente con el fotoperiodo, la altitud y la disponibilidad de comida (Feldman y Nelson, 2000, p.815).

En el estro, la síntesis y concentración sérica de 17β -Estradiol alcanza su pico más alto, pueden llegar de 40 a 140 pg/ml. En estudios realizados con ocelotes se llegó a niveles de $(131.6 \pm 4.5\text{ng/g})$ en heces y también a valores de 4.94 a 151.00 pg/ml en orina (Morais et al., 1996, p. 4). La duración promedio de esta etapa es de 6 a 10 días (Rosero et al., 2011, p.92).

El intervalo de tiempo oscila entre 4 a 10 días debido a los altos niveles de estrógeno plasmático en la felina (Sunquist y Sunquist, 2002, p.25). Esta cambia su comportamiento aumentando sus vocalizaciones, refriega su cuerpo contra las paredes, presenta lordosis (curvatura fisiológica en la región cervical o lumbar), conserva su cola levantada para facilitar la cópula, al quinto día del estro los signos de comportamiento son más fuertes (Brown, 2006, p. 329).

En la etapa del estro se da un cambio en el epitelio vaginal produciéndose la cornificación del mismo, es decir un engrosamiento del epitelio, presentando en la citología, células superficiales nucleadas y anucleadas como se da en la gata doméstica. Algunas hembras pueden tener edematización vulvar y secreción vaginal (Stornelli, 2007, p.2). En la mayoría de felinos neotropicales la ovulación se llega a dar por el estímulo del macho durante el servicio, ya que las hembras no suelen estar acompañadas de machos, y no sería muy conveniente que la hembra posea ovulación espontánea (Varela, 2009, p.2).

Si existe la ausencia del apareamiento o de la ovulación espontánea se da la fase llamada interestro, la cual se define como la etapa que le sigue a un estro y precede al siguiente estro. Su duración va de 8 a 11 días. El diestro es la fase donde existe un cuerpo lúteo funcional resultando en la secreción de progesterona. La vida media de los cuerpos lúteos es de 25 a 35 días, y si no existe fertilización se produce la llamada pseudogestación o embarazo psicológico. A esta fase le precede un periodo de interestro. El anestro es la fase caracterizada por la ausencia de ciclo estral, y ocurre cuando existe una disminución de horas de luz. El anestro felino está identificado por los niveles basales de progesterona y estrógenos (Feldman y Nelson, 2000, p.815).



En la parte fisiológica, durante la cópula, aumentan las señales hacia el hipotálamo dando como resultado la liberación de GnRH, y la de LH consecuentemente. Es así que, la ovulación se relaciona con el número e intervalo de cópulas, mientras más se den será mejor ya que aumentan la probabilidad de ovulación (Brown, 2006, p. 329). La onda óptima de LH se da en un periodo de cópula de entre 2 a 4 horas, además el pico de estrógenos puede llegar a darse de 1 a 3 días antes del pico de LH (cópula). El 35% de hembras felinas pueden llegar a demostrar ovulación espontánea, pero solo se da en ambientes donde machos y hembras viven continuamente, no

necesariamente debe existir contacto físico ya que se atribuye este efecto a las feromonas (Stomelli, 2007, p.3).

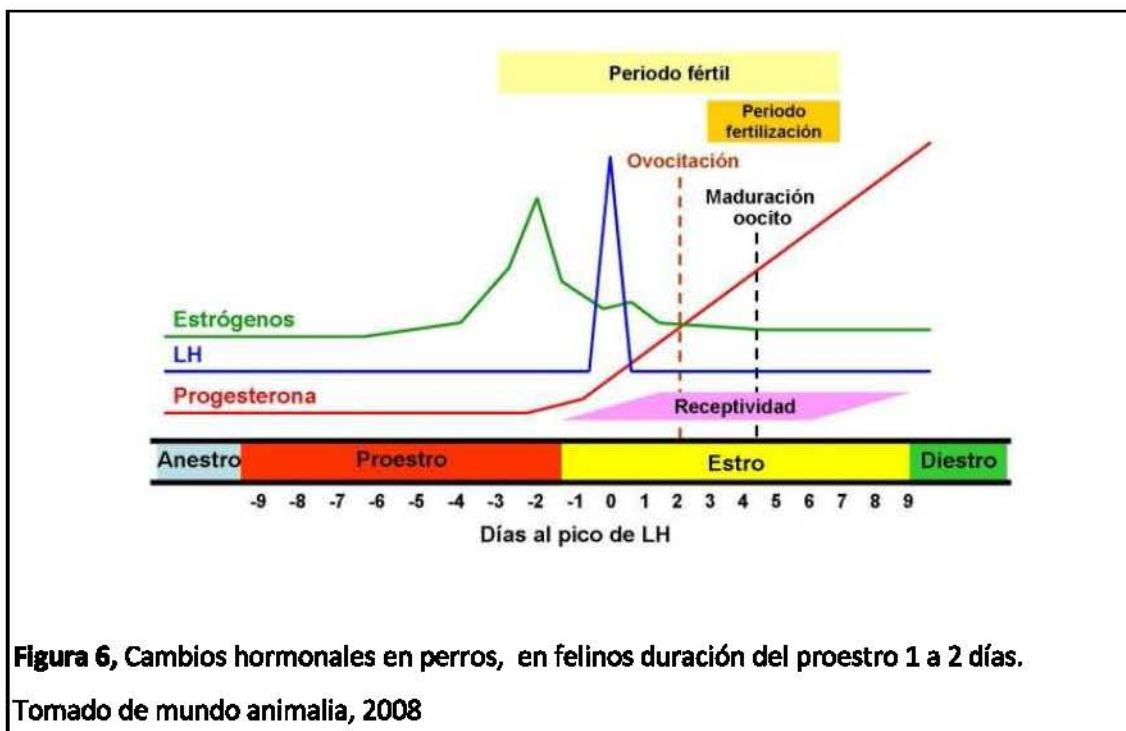


Figura 6, Cambios hormonales en perros, en felinos duración del proestro 1 a 2 días.

Tomado de mundo animalia, 2008

1.8.4 17 β -Estradiol

Las hormonas son la esencia de la reproducción, por lo tanto la comprensión de los factores que influyen la función endócrina es clave para maximizar el éxito reproductivo. Los primeros estudios comenzaron en la década de los setenta en gatos domésticos fundamentándose en patrones hormonales, exámenes de sangre para analizar esteroides ováricos y la duración del ciclo reproductivo (Brown, 2006, p.329).

El estudio de hormonas por medio de orina, además de ser un método no invasivo nos permite tener una muestra precisa que no cambia con las fluctuaciones de tiempo como lo hacen las muestras en suero o saliva. La medición hormonal en orina está muy bien establecida en literatura médica ya sea humana o animal. Evaluaciones de disminución de metabolitos de estrógenos urinarios también han sido de gran importancia en la detección de patologías. El mejor método para medir el balance hormonal en hembras es en la orina (Brown, 2006, p.331).

Es el más importante de los estrógenos naturales y además el más secretado naturalmente, el estradiol también llamado C₁₈H₂₄O₂ así como E₂ es un regulador clave de crecimiento, diferenciación y de función en una amplia gama de tejidos, en los cuales se incluye el tacto reproductivo de hembras, glándulas mamarias, cerebro, y sistemas cardiovascular y esquelético como en el desarrollo de las características sexuales secundarias. Las investigaciones en torno al estradiol se han centrado predominantemente en problemas reproductivos tales como infertilidad y ovulación (Brown, 2006, p.333).

El efecto biológico, predominante del E₂ está mediado a través de dos distintos receptores intracelulares: ER α y ER β cada uno está codificado por genes únicos y procesan el dominio funcional de las características de una hormona esteroide/tiroide. ER α es la forma predominante la cual se expresa en útero, cérvix y vagina. La ER β demuestra un más limitado patrón y es principalmente expresado en el ovario, próstata, testículos, vaso, pulmones, hipotálamo y el timo (Arbor Assays, 2011, p.3).

En hembras no preñadas el 17 β -Estradiol se produce en el ovario y en cuerpo lúteo en respuesta al estímulo de la hormona FSH (Folículo estimulante). La medición del estradiol durante el ciclo de ovulación es de mucha importancia en la evaluación de la función de los ovarios, ya que estos reflejan la madurez folicular. Los niveles de estradiol son valiosos para evaluar si existen causas de infertilidad en las hembras, su desarrollo sexual, comportamiento sexual en el estro, o la determinación de niveles bajos que nos darían alguna alteración en el ciclo estral; además, para el monitoreo de incremento exponencial durante ciclos normales o en ciclos estimulados durante una superovulación (producción de un número mayor de ovocitos mediante la administración de gonadotropinas) antes de realizar una fertilización in vitro, ya que una concentración muy alta de estrógenos afectarían el procedimiento. El gato leopardo y el ocelote son los felinos que poseen los niveles más altos de estradiol (Stornelli, 2007, p.6).

El estradiol también influye en el crecimiento de hueso, desarrollo y maduración del cerebro, y de consumo de alimento. También es conocido por mantener

funciones de órganos durante un trauma severo. El estradiol es conjugado en el hígado a sulfato y también a derivados glucorónicos para posteriormente ser excretado. La desactivación incluye la conversión a estrona y estriol que son estrógenos menos activos (Arbor Assays, 2011, p.3).

El 17β -estradiol es excretado en su forma original y como conjugado. El estradiol total y estradiol conjugado son efectivos para monitorear dinámicas moleculares mediante un inmunoensayo. Por lo que, la actividad luteal es mejor que sea definida usando un grupo específico de antisuero que tenga reacción cruzada con metabolitos de embarazo libres y conjugados (Brown, 2006, p.330).

1.8.5 Estudios de hormonas

Uno de los primeros estudios que se realizaron fueron en los zoológicos de Brasil con *L. pardalis*, *L. tigrina*, *L. wiedii*. La función ovárica se monitoreo por medio de hormonas fecales, los cuales mostraron altos niveles de estradiol en el ocelote ($131.6 \pm 4.5\text{ng/g}$); concentraciones medias en los margays ($101.7 \pm 3.7 \text{ ng/g}$); y bajas concentraciones en el tigrillo ($59.0 \pm 2.0 \text{ ng/g}$) ($p < 0.05$). Según los resultados basados en los picos de estradiol, las tres especies tienen ciclo estral similar (margay: 19.5 ± 2.1 días; ocelote: 16.5 ± 1.5 días; tigrillo: 15.8 ± 1.5 días) pero los ocelotes mostraron un incremento de los niveles de concentración del estradiol fecal durante la primavera y el verano; los margays un incremento durante el otoño y el invierno; y los tigrillos durante el invierno y el verano (Morais et al., 1996, p.3).

En 1999 se estudió el ciclo estral en ocelotes por medio de análisis hormonal en suero. En la investigación los animales mostraron picos de estradiol y así se confirmó que la especie es poliéstrica, siendo similar a sus parientes los gatos domésticos, tigres y guepardos. En ocelotes las muestras de suero, en el estro se caracterizaron por concentraciones de estradiol las cuales fueron de 59.84 a 307.77 pg/ml. Después de la estimulación con eCG/hCG, la concentración de estradiol fue de 115.9 a 513.6 pg/ml (Tebet, 1999, p. 102). Además, en hembras que no ovulan o con ovulación sin fecundación, las concentraciones

séricas de progesterona aumentaron y la inhibición del estro fue observada, muy similar a la pseudogestación de gatas domésticas y de leopardos (Rodríguez y Barnabe, 2010, p.11).

Se realizó otro estudio en animales en cautiverio de patrones reproductivos endócrinos de ocelote (*Leopardus pardalis*, n = 2), tigrillas (*Leopardus tigrinus*, n = 2) y margays (*Leopardus wiedii*, n = 2). Las hembras se mantuvieron separadas y expuestas a las fluctuaciones naturales de fotoperíodo. Los cambios cíclicos en los esteroides ováricos fueron controlados mediante el análisis de metabolitos de estrógeno en muestras fecales (Moreira et al., 2001, p.3).

Los intervalos entre picos de estrógenos fecales dieron que la duración del ciclo estral sea de $18,4 \pm 1,6$ días para los ocelotes (rango, 7-31 días, n = 75 ciclos), $16,7 \pm 1,3$ días para las tigrillas (rango, 11-27 días, n = 23 ciclos) y $17,6 \pm 1,5$ días para los margays (rango, 11-25 días, n = 32 ciclos). Las observaciones laparoscópicas de ovarios confirmaron que ocelotes y tigrillos ovulan con inducción. Los margays tienen una ovulación espontánea con fase luteal sin crías. En ocelotes, los cambios cíclicos en la excreción de estrógenos se observaron durante cada mes del año, sin embargo, sólo una hembra cicló de forma continua (Moreira et al., 2001, p.7).

En las otras dos tigrillas, se pudo observar períodos acíclicos de varios meses de duración. Estos datos demuestran similitudes entre las tres especies de felinos de los géneros *Leopardus*, incluidas las pruebas que demuestran que son poliéstricas pero experimentan períodos inexplicables de inactividad ovárica (Brown, 2006, p. 330).

Además existe un estudio de medición de estradiol en orina de lince ibérico en Huelva España, en el cual se monitorearon 4 hembras donde se determinaron metabolitos de estradiol en orina. Los picos más altos fueron de 15 a 35 pg/ml durante la última semana de gestación de una de las felinas, en una hembra que no aceptó al macho no existieron cambios durante la fase reproductiva y no reproductiva en lo que corresponde a estradiol. Se concluyó

que la fase lútea en el lince ibérico puede ser monitoreada con estrógenos urinarios (Jewgenow et al., 2009, p.5).

1.8.6 Biotecnología reproductiva

La idea de conservación en especies silvestres es mucho más compleja. Para especies ex situ es decir especies en condiciones artificiales fuera de su hábitat natural, el principal objetivo es tener crías que sean genotípicamente adecuadas para conservar la integridad de la población fuerte y saludable. El problema se suscita en que a veces las dos especies que deben emparejar son incompatibles en muchos aspectos y no se llega a dar su apareamiento. Por esta razón es importante tener un individuo valioso y conservar sus genes para luego añadirlos a la población o para posteriores investigaciones y toma de contenido espermático. Es importante mezclar individuos de centros de cría con individuos salvajes para que se dé una conservación de especies (Wildt et al., 2009, p.310).

De las técnicas de reproducción asistida, la inseminación artificial es la más utilizada y la que más ha dado frutos. A lo largo de las investigaciones, 8 especies de felinos han concebido crías mediante este método, entre ellas el ocelote para mejorar la producción de crías ex situ (Wildt et al., 2009, p.298). El estudio realizado reportó una inseminación artificial en ocelotes y tigrillos, la cual consistió en una terapia de eCG/hCG usando semen congelado. Se realizó esta técnica en 10 hembras sin embargo solo una resultó preñada (Swanson et al., 1996, p.87).

La Asociación Mundial de Zoológicos y Acuarios-WAZA indica que el uso de las técnicas de reproducción artificial y de biotecnología de crio-preservación puede ayudar a la conservación de especies, ya que la crio-preservación de gametos y embriones, al igual que los bancos de germoplasma, pueden ser usados para programas de conservación y de fuentes genéticas para poblaciones in situ en reservas y en parques naturales y en poblaciones ex situ (WAZA, 2005, pp.33-34).

En lo que respecta a biotecnología reproductiva la terapia hormonal para la ovulación o súper ovulación utilizada en gatos domésticos puede ser utilizada en felinos salvajes. La terapia incluye la administración de gonadotropina coriónica humana, para inducir la ovulación y gonadotropina coriónica equina o de hormona folículo estimulante porcina para estimular el desarrollo folicular ovárico, seguido de gonadotropina coriónica humana u hormona luteinizante porcina para inducir la maduración final del ovocito y de la ovulación. Evaluando la respuesta ovárica folicular por medio de laparoscopia y de formación de anticuerpo por ELISA también se evalúa la respuesta a las hormonas reproductivas (estradiol y progesterona) por medio de inmunoensayo (Rodríguez y Barnabe, 2010, p. 65).

El protocolo de súper ovulación significó ser la primera investigación de valoración de carácter ovárico, inmunológico y hormonal en gatos no domésticos (*L. pardalis*, *L. tigrinus*) tratados con régimen de gonadotropina exógena. Estos hallazgos son potencialmente importantes para los esfuerzos actuales de desarrollar y llevar a la práctica las tecnologías de reproducción asistidas para la preservación de poblaciones felinas en peligro de extinción. En el estudio la concentración de estradiol en orina fue de 4.94 a 151.00 pg/ml en ocelotes y de 0.15 a 37.22 pg/ml en tigrillas, la concentración aumentó casi 200 pg/ml más después del régimen de gonadotropina en la hembra ocelote y 50 pg/ml en la hembra tigrillo (Rodríguez y Barnabe, 2010, p.73).

En una de las hembras que participó en el estudio las hormonas no afectaron su gestación debido a que los ocelotes son altamente tolerantes a tratamientos hormonales exógenos, pero necesitan una gran dosis para generar folículos. La serie de hallazgos indican que estas especies de felinos pueden ser manejadas con un intensivo régimen de gonadotropinas exógenas para poder ser asistidos en procedimientos de reproducción sin comprometer su función ovárica (Rodríguez y Barnabe, 2010, p.75).

1.8.7 Métodos para la recolección de orina en ocelotes

El primer método para la obtención de orina estéril en un felino es a través de cistocentesis la que consiste en la extracción estéril de una muestra de orina, por punción en la vejiga con una aguja. El segundo es la "micción libre", en la que la orina se acumula en un contenedor estéril o limpio cuando sale del organismo. El tercero consiste en recoger la orina de un contenedor o de una superficie después de que haya sido excretada. La obtención de orina mediante micción libre o por el tercer método causa menos estrés y dolor hacia el animal que la cistocentesis. Para fines cualitativos, como medir pH y otros metabolitos como la glucosa, proteínas, hormonas entre otros, puede ser mejor recoger la orina mediante el método de la "micción libre" (Biji et al., 2004, p. 347).

La técnica mediante cistocentesis puede practicarse en especies pequeñas y sería muy recomendada para realizarla en el ocelote. La cistocentesis ha sido de gran importancia, siendo utilizada por más de 80 años, como instrumento tanto diagnóstico como terapéutico. Existen muchos problemas con la recolección de muestras de orina mediante cateterización y micción libre ya sea por el comportamiento de animales salvajes o por la falta de asepsia, el diagnóstico mediante cistocentesis elude estos inconvenientes en pacientes felinos con enfermedades no obstructivas del tracto urinario inferior (Biji et al., 2004, p. 347).

El método más fácil para el paciente ocelote hembra, es el de recoger la orina libremente de un contenedor. De esta manera, un recipiente limpio es ubicado debajo de un recipiente plástico como lavacara con agujeros para que se pueda recoger la orina mediante una jeringa. La orina que pasa a través del tracto urogenital, puede contener contaminación bacteriana, lo cual puede llegar a afectar la muestra (IDEXX, 2006, p.1).

▪ Métodos con jaulas

Existen muchos métodos que sirven para obtener las muestras de orina de las hembras ocelote. En 1980 se creó un método para la recolección de orina pero esta técnica se la practica en felinos enjaulados, por medio de jaulas de fibra de vidrio con agujeros en su base y con un recipiente que por medio de otros orificios permite la succión de orina a través de jeringuilla cuando el animal realiza su micción. Para realizar esta técnica se debe engañar al animal para que entre en la jaula sin necesidad de utilizar métodos farmacológicos. Esta técnica funciona en un 82% de los casos (Biji, 2004, p.347).

Un método, muy utilizado, el cual consiste en ubicar colectores de acero inoxidable (placas) de manera vertical, los que poseen en su interior canales laterales con terminación en V para llegar a la base para permitir que la orina llegue a un vaso contenedor (WAZA, 2011, p.24). La efectividad de esta técnica es la que ha dado mejores resultados en muchas investigaciones practicadas en lince en España ya que los felinos tienden a rociar su orina para marcar su territorio en objetos nuevos y brillantes (Jewgenow, Goritz, Vargas, y Dehnhard, 2009, p.2).



Figura 7, Colector vertical de acero inoxidable para orina de felinos.

Tomado de Jewgenow et al., 2009, p.5.

El primer flujo de orina que sale del organismo por la mañana, limpia de células todo el tracto urinario de las hembras y es beneficioso para evaluar procesos patológicos en la porción distal de la vejiga (uretra, vagina). La orina que se recolecta por micción desde una jaula a un piso, mesa, recipiente o plástico son menos apropiadas debido a la contaminación ambiental (Biji, 2004, p.347).

Se debe tomar en cuenta los factores de contaminación en el momento de interpretación ya que pueden llegar a ser de gran utilidad. También puede ser la única opción para animales salvajes, que viven en zoológicos y centros de rescate, donde la recolección puede ser un desafío; de igual manera, la marcación territorial de forma intermitente puede impedir la recolección de volúmenes adecuados de orina (Biji, 2004, p.347).

La ventaja de la recolección de orina de un contenedor radica en que no se necesita de mecanismo ni de equipamiento especial, y tampoco existe riesgo de lastimar el tracto urinario al animal, en este caso de la hembra ocelote. No se gana nada con la obtención de muestras de orina por otras vías, por ejemplo cistocentesis o por micción libre. Si las muestras del uroanálisis son normales, la obtención de orina por estas vías nos servirán para la localización anatómica del proceso patológico en otro tipo de estudios de enfermedades infecciosas (Chew y DiBartola, 1998, p.11).

Las muestras de orina de animales por medio de recolección de un contenedor deben ser usadas en la evaluación de hematuria que es sangre en la orina, ya que las otras técnicas pueden ser las causantes de provocar dicha hematuria y contaminar las muestras debido al trauma que ocasionan. Se recomienda que esta técnica sea la utilizada en pequeños felinos (Chew y DiBartola, 1998, p.11).

1.8.8 Métodos para el diagnóstico de estradiol y análisis de orina

- **Técnica ELISA**

La técnica ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) tiene por fundamento, la detección de un antígeno inmovilizado sobre una base sólida por medio de anticuerpos que de manera directa o indirecta producen reacción al producto colorido que poseen y el cual puede ser medido mediante un espectrofotómetro (instrumento químico para medir la longitud de onda). Gracias a esta técnica se han podido realizar estudios científicos en bioquímica y medicina. La detección de hormonas en orina puede ser identificada fácilmente con esta técnica (Arbor Assays, 2011, p.3).

- **Estradiol EIA kit**

El estradiol es idéntico a través de todas la especie, razón por la cual el kit es llamado multi especies, la sensibilidad del kit es de 39.4 pg/ml (Anexos 15). El kit de estradiol DetectX es un inmunoensayo que utiliza un anticuerpo creado específicamente para medir estradiol y sus metabolitos en orina y en heces. El kit no se lo utiliza para medir concentraciones de estradiol en suero, plasma o saliva ya que la concentración en estas muestras es muy baja para ser medida sin una concentración significativa. El kit mide cuantitativamente el estradiol presente en las muestras reconstituidas. Un estradiol estándar esta proporcionado para generar una curva estándar para el ensayo, las muestras son pipeteadas dentro de una placa de microtitulación recubierta de un anticuerpo para unirse a anticuerpos de conejo.

Un conjugado de estradiol peroxidasa es añadido a las pruebas estándar en los orificios de la placa. La reacción de unión se inicia con la adición del anticuerpo policlonal al estradiol en cada pozo. Después de una incubación de dos horas la placa se lava y el sustrato es añadido.

El sustrato reacciona con la unión conjugada estradiol-peroxidasa. Después de una corta incubación, la reacción es detenida y la intensidad del color generado es detectada por un lector de placas de micro titulación capaz de medir 450 nm de longitud de onda (Arbor Assays, 2011, p.4).

- **Urocultivo**

Es el cultivo de orina que permite investigar y así diagnosticar si existe la presencia de bacterias en la orina con alguna afección sintomática o asintomática en el tracto urinario de animales. Se basa por la presencia de un número elevado de bacterias (>100.000 bacterias). Los valores normales deben ser negativos y son un signo de que no existe infección, si el examen es positivo, significa que microorganismos (bacterias u hongos) se encuentran en la muestra de orina y el animal puede llegar a tener una infección de las vías urinarias. También puede haber contaminación externa de bacterias que no causan infecciones y depende mucho del cuidado y asepsia en la recolección de la muestras (Albéitar, 2014).

- **Uroanálisis**

Es una prueba sencilla y una herramienta diagnóstica que consiste en exámenes realizados sobre la orina. Se compone de un examen físico-químico. Es necesaria para una evaluación del sistema urinario, y debe ser incluido para conocer el estado de salud de cualquier animal. El examen físico evalúa, el color, el olor, el volumen y la apariencia de la orina. En el examen químico se evalúa el pH, proteínas, bilirrubina, glucosa, leucocitos, nitritos, urobilinógeno y sangre, estos parámetros sirven para indicar anomalías fisiológicas y enfermedades del tracto urinario (Chew y DiBartola, 1998, p.13).

- **Tira reactiva para orina Uro-dip 10 e**

Consisten en tiras de plástico impregnadas con diferentes reactivos que se introducen en la orina. Realizan la detección de los siguientes parámetros: gravedad específica, glucosa, hemoglobina, proteínas, pH, urobilinógeno,

nitritos, cetonas, y leucocitos. Las tiras reactivas pueden llegar a ser usadas para una evaluación de manera general de la salud o de componentes de la orina para diagnóstico y monitoreo de patologías o de degradación de orina, ya sea de carácter metabólico, sistémico que afectan la función renal o enfermedades del tracto urinario bajo (Erbamannheim, 2010, p.1).

La muestra debe ser ubicada en un recipiente nuevo y examinado lo más antes posible. Si la prueba posee mucho tiempo a la intemperie, refrigerarla y después dejar que regresa a temperatura ambiente. Después de haber mojado la tira, se la retira y se da un tiempo para que reaccione. Todos los datos adicionales se encuentran incluidos en el envase (Erbamannheim, 2010, p.2).

2 CAPÍTULO II. MARCO METODOLÓGICO

Objetivo General.

Identificar los niveles de estrógenos y degradación física de orina de ocelote hembra (*Leopardus pardalis*) en cautiverio en el Zoológico de Quito en Guayllabamba

Objetivos Específicos.

- Determinar los cambios físicos de la orina durante el proceso de degradación.
- Identificar la concentración de estrógenos en orina y determinar el nivel hormonal en el periodo de estro en ocelotes hembras mediante un kit de estradiol inmunoensayo.
- Comprobar que el método de recolección de un contenedor o superficie sea factible y que la orina recogida después de estar en contacto con el ambiente por algunas horas sea viable para llegar a medir concentraciones de estrógenos

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Materiales de campo

Los materiales son:

- Dos lavacaras rectangulares de plástico con agujeros en su parte media que desembocan en un recipiente de plástico donde se va almacenar la orina.
- 20 metros de plástico de polietileno doble transparente de 1.5 metros de ancho
- Dos contenedores de acero inoxidable de 30 por 30 cm de ancho
- Guantes de procedimientos estériles
- 40 contenedores para análisis de orina estériles de 100ml
- Un cooler para almacenar las muestras.
- 40 jeringuillas de 10 ml
- Mascarillas de tela
- Puntas para micropipetas
 - **Equipos:**
 - Agitador orbital para microplacas
 - Agitador Vortex

- Micropipetas 20- 200 y 100-1000 ug/ml
- Lector manual para placas de micro-ELISA
- Cabina de flujo laminar
 - **Reactivos:**
 - Estradiol Kit EIA
 - Muestras de orina de ocelote
 - Agua destilada de 1000 ml
 - **Métodos**
 - Tiras reactivas Uro-dip 10e
 - Para el presente estudio se eligió el Kit 17 β -Estradiol inmunoensayo DetectX debido a que utiliza un anticuerpo creado específicamente para medir estradiol y sus metabolitos en orina y se diferencia de los demás por ser el de más fácil realización y por ser el único señalado como multi especies, es decir, puede ser realizado en cualquier especie animal.

2.2 Toma de muestras y estado de reproducción

Es importante conocer que hay diferentes zoológicos y centros de rescate en nuestro país; sin embargo, no tienen la infraestructura adecuada y no poseen muchas hembras ocelote. Esto se pudo notar ya que en el Zoológico de Tarqui solo vivían 4 machos.

En el Centro de Rescate Yanacocha en la ciudad de Puyo se encontró dos hembras de 8 meses de edad que fisiológicamente no proveían de mucha ayuda para la Investigación; y otra hembra estaba en el Zoológico de Baños en estado de salud delicado por lo que no se la utilizó para el estudio.

La institución con infraestructura más adecuada fue el Zoológico de Quito. Los animales de estudio fueron dos ocelotes hembras (n=2), quienes convivían con el ocelote macho. Se procedió a sacar la autorización de investigación científica por parte del Ministerio del Ambiente para poder realizar el estudio en las hembras ocelote (Anexo 16).

En la presente tesis se categorizaron a las hembras como reproductoras si han tenido crías, o no reproductoras si no han tenido crías. Se estimó la edad de las hembras en base a los años que han estado en cautiverio. La identificación, su estado de reproducción y su edad estimada se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Información general para las hembras ocelotes

Identificación del animal	Especie	Edad	Peso Kg	Estado de reproducción
Cleo	Ocelote	5 años	15	Reproductora
Salomé	Ocelote	9 años	10	Reproductora

Su hábitat artificial es de aproximadamente 200 m² con árboles, arbustos, vegetación y guaridas (Anexos 17). Además, en la parte posterior existen 8 jaulas en total: 4 en la parte superior y 4 en la parte inferior (Anexos 17). Las medidas de las jaulas son de 1.20 X 1.20 m y 1.55 de altura. Poseen una estructura con barrotes en su interior los que son accionados de forma manual al momento de entrada y salida de los animales a su hábitat artificial (Anexos 18).

Estas jaulas de cemento están conectadas con su hábitat artificial, por medio de pasadizos circulares donde ocasionalmente se esconden. Además, existen puertas de malla metálica para que se pueda acceder a la limpieza y ubicar alimento y recipientes con agua.

En el hábitat artificial las dos hembras tienen contacto directo con el macho y son mantenidas bajo fotoperiodo natural y a base de una dieta provista de carne de gallina; minerales y vitaminas; y con una pileta de agua fresca ad libitum. Los ocelotes son provistos de alimento sin días de ayuno. Las hembras son muy fértiles y han parido en el transcurso de este tiempo alrededor de 10 crías saludables. El promedio de crías es dos en cada parto.

Las visitas al zoológico permitieron conocer el comportamiento de las hembras. Se sospechó que la hembra Salomé estaba preñada, dicho presentimiento se suscitó por su apatía y por su falta de apetito. También se presumía que la hembra Cleo estaba entrando en la etapa de estro por su carácter agresivo hacia el macho, así que las muestras obtenidas de las dos hembras son de gran importancia. El comportamiento en el estro (por ejemplo, frotarse con alguna superficie, vocalizaciones, olfatear, y marcaje con orina) y el apareamiento se observaron con detenimiento y fueron documentados en video y fotografías.

De la hembra en gestación se obtuvo sus valores en los últimos días de labor y en el día del parto específicamente. En el caso de Cleo se obtuvo sus muestras en los días de estro y en el día que contrajo la monta del macho.

Las muestras de orina para el análisis de estradiol fueron colectadas durante 2 semanas y se obtuvieron 13 muestras de cada ocelote hembra (n=26) como se puede observar en la Tabla 4. Se consiguieron alrededor de 6 muestras más pero no se pudieron utilizar por su alto grado de contaminación.

Para la toma de muestras se utilizó el kit de estradiol que permitió la obtención de 52 muestras, incluidos los duplicados. El costo alto del kit no permitió tener provisiones para más exámenes. La orina se recogió del método de recolección por medio de placas de acero inoxidable y por medio de recolección en plástico de polietileno, ya que fueron las técnicas más efectivas por la cantidad de orina la que varió de 15 ml a 25 ml diarios por cada hembra. En la jaula se ubicó, en toda la base, el plástico de polietileno doble capa de 1.50 X 1.50 m y mediante una jeringuilla de 10 ml se absorbió toda la orina que estaba esparcida por toda su superficie (Anexos 19).

Además, se colocó un colector en cada jaula que consistía en una placa vertical de acero inoxidable de 15 x 30 cm, con canales a sus lados que desembocaban en una terminación en V, de la placa, en donde caía la orina en un recipiente estéril, allí las hembras marcaban su territorio (Jewgenow et al., 2009, p.2). De igual manera, se puso con, anterioridad, unas lavacaras con una estructura especial simulando a la caja de arena de un gato casero pero no se obtuvo éxito (Anexos 20).

Tabla 4.*Recolección de muestras de orina y volumen de cada una de ellas*

Número	Días	Cleo	Salomé
1	Lunes 26 de Mayo	5 ml	I
2	Martes 27 de Mayo	25 ml	15 ml
3	Miércoles 28 de Mayo	40 ml	17 ml
4	Jueves 29 de Mayo	35 ml	20 ml
5	Viernes 30 de Mayo	15 ml	8 ml
6	Sábado 31 de Mayo	25 ml	10 ml
7	Domingo 1 de Junio	30 ml	20 ml
8	Lunes 2 de Junio	40 ml	20 ml
9	Martes 3 de Junio (Apareamiento Cleo)	25 ml	20 ml
10	Miércoles 4 de Junio	10 ml	28 ml
11	Jueves 5 de Junio	20 ml	8 ml
12	Viernes 6 de Junio	2 ml	25 ml
13	Sábado 7 de Junio (parto, 2 crías, Salomé)	10 ml	20 ml
14	Domingo 8 de Junio	I	20 ml

Las muestras representadas en el gráfico fueron las que se utilizaron para el análisis de laboratorio, la letra I significa Inexistente. Se obtuvo resultados negativos en la recolección, en días anteriores, por el fracaso en otras técnicas utilizadas y debido a la contaminación con heces o por partículas de suciedad en las muestras porque a veces las hembras movían el plástico y la orina se regaba. Todas las muestras fueron filtradas con papel filtro para garantizar su pureza.

Una vez que la orina fue depositada por las hembras, cada una de las muestras se colocó en un contenedor de plástico para el análisis de orina dependiendo del tamaño de la micción. Se realizó la medición, se etiquetó y se respaldó mediante registros fotográficos la degradación a estudiar. Este procedimiento facilita el transporte al no tener que manipularlos y hay menos riesgo de alterarlos. Además, permite exponer las muestras a las condiciones climatológicas del área de estudio, así como aislarlas del suelo para evitar el contacto directo con el estrato y por ello acelerar el proceso de degradación física y hormonal.

Luego de recolectar la orina estas fueron refrigeradas a 4 grados centígrados, con fundas de hielo y gel congeladas, hasta ubicarlas en un lugar para su congelación a -20 grados centígrados, y después ser llevadas al laboratorio de Biotecnología de la Universidad de la Américas, en días posteriores, para la realización de los exámenes de laboratorio. En temperatura de - 20°C la orina permanece estable para el análisis hormonal, al menos 3 meses (Jewgenow et al., 2009, p.2). Todas las mediciones de hormonas se llevaron a cabo en duplicado para garantizar un mejor promedio en las concentraciones de estradiol.

2.3 Características y análisis del proceso de degradación física

Dentro de los aspectos físicos de la orina se deben valorar, el volumen, el aspecto, el color y el olor. La observación de la orina en un recipiente transparente y con luz natural nos permite realizar un diagnóstico presuntivo, antes de proceder al análisis físico y químico (Chew y DiBartola, 1998, p.13).

El volumen puede ser de gran ayuda para definir enfermedades, pero evaluar a ciertos animales es muy difícil si no están bajo control, mucho más si son animales salvajes. Este parámetro es influenciado por condiciones, como el tamaño del animal, alimentación, actividad, temperatura, y disponibilidad de agua (Chew y DiBartola, 1998, p.14).

El aspecto de la orina puede llegar a ser transparente y si existe una variación, debe ser objeto de estudio, incluso de manera microscópica. Puede haber

muchas razones responsables de cambios en la orina, ya sean partículas extrañas, materia fecal, moco; al igual puede llegar a existir una pequeña cantidad de espuma (Campuzano y Arbeláez, 2007, p.6).


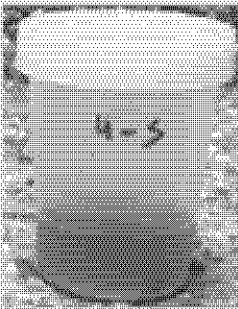
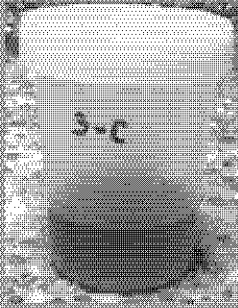
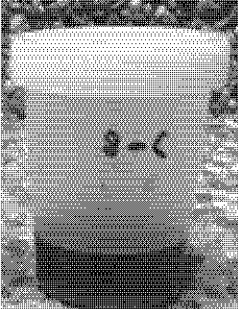
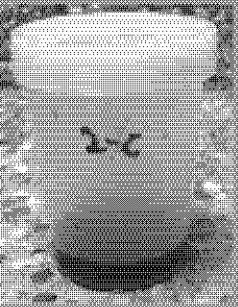
La orina normal posee un color casi ámbar como amarillo claro, y depende de los pigmentos de la orina, como puede ser la bilirrubina. Es de gran importancia aclarar que un color diferente no necesariamente indica enfermedad. En este caso puede ser por la alimentación de los felinos (Campuzano y Arbeláez, 2007, p.5).

El olor normal de la orina es característico de cada especie o de género. La orina felina es de olor fuerte y es muy concentrada por su base de amoniaco, quizás si su olor es demasiado penetrante podría significar un felino enfermo por algún tipo de infección o por la falta de agua (Campuzano y Arbeláez, 2007, p.5).

Se realizaron 4 urocultivos, 2 de la hembra Cleo y 2 de la hembra Salomé para diagnosticar alguna infección en el tracto urinario de carácter sintomático o asintomático de las felinas y que posteriormente llegue a ser una variable importante en el proceso de degradación física. También 6 uroanálisis, 3 de la hembra Cleo y 3 de la hembra Salomé para verificar si existían componentes eliminados, producto del metabolismo de la orina. Los 3 uroanálisis de cada hembra fueron similares sin cambios importantes en el transcurso del tiempo, al igual que los 4 urocultivos que no mostraron ninguna anomalía.

Tabla 5. Análisis del color

COLOR DE LA ORINA Y SU POSIBLE SIGNIFICADO

 COLOR	MUESTRA	Causas patológicas	Causas NO patológicas
Amarillo claro ámbar		Orina más concentrada, puede existir bilirrubina.	Uso de tetraciclinas fenacetina o Consumo de zanahoria
Rojizo		Hematuria, hemoglobinuria, mioglobinuria, deshidratación.	Uso de fármacos o colorantes como rifampicina, anilinas, consumo de remolacha, estro en hembras.
Marrón		Metahemoglobinemia mioglobinuria, pigmentos bilíares, mezclada con heces.	Sulfamidas.
Negro		Melanina, alcaptonuria, hematuria, urobilina degradada	Complejos de hierro, fenoles.

COLOR DE LA ORINA Y SU POSIBLE SIGNIFICADO

COLOR	MUESTRA	Causas patológicas	Causas NO patológicas
Incolora o transparente		Poliuria o diuréticos.	Consumo elevado de agua pura.
Turbia		Piuria, fecaluria.	Consumo elevado de proteínas.

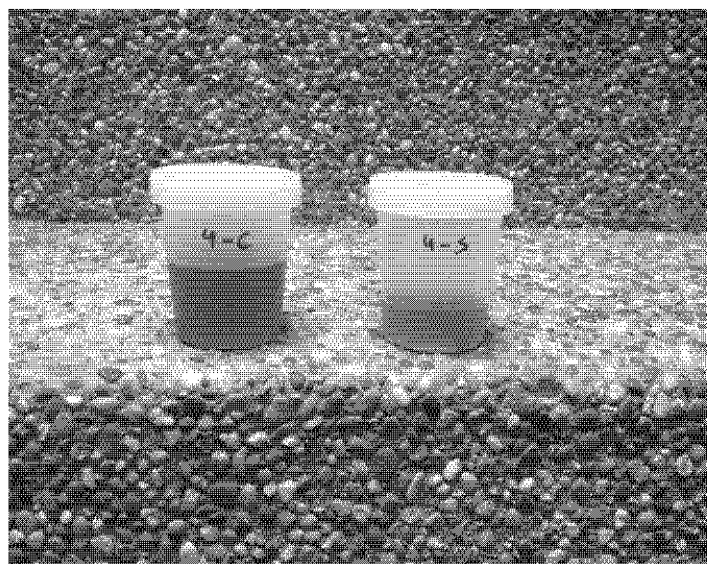


Figura 8, Muestra de orina del día 4, 4-C color rojizo, y 4-S color ámbar. 35 y 20 ml respectivamente, 2014.

El volumen recogido fue de aproximadamente 20 ml por cada hembra. Los felinos bebían agua normalmente y realizaban su micción alrededor de su hábitat, en dos arbustos específicos, en unas rocas de la parte trasera y en su jaula respectivamente. Las muestras de la hembra Cleo y de la hembra Salomé variaron, fueron de color ámbar y rojizo (figura 8).

Los resultados de uroanálisis (Anexos 21) expusieron valores normales en las dos hembras, los valores a destacar son el aspecto turbio, la lipiduria y la presencia escasa de bacterias mixtas y de cristales fosfato amorfos.

La lipiduria o el hallazgo de lípidos en la orina se considera normal en felinos en poca cantidad, su origen puede ser por el alto contenido protéico de la orina por la dieta de las felinas. Los cristales fosfato amorfos no poseen importancia clínica y quizás se deben a la refrigeración de la muestra. Las muestras de las dos hembras poseen células escamosas y transicionales pero a un número bajo, provienen del epitelio que cubre la vejiga y de la porción distal de la uretra. La apariencia turbia de la orina puede verse afectada por todo lo antes mencionado. La presencia escasa de bacterias mixtas se debe a la contaminación externa de la muestra por el tipo de recolección en recipientes. De igual manera los resultados de los urocultivos no mostraron desarrollo bacteriano en el tiempo de incubación (Medicin ABC, 2012).

El color ámbar es normal en la orina y en días que fueron rojizos, se puede asociar por el tipo de dieta que reciben, es muy frecuente en felinos pero se debe llegar a descubrir el origen si persiste. Asimismo, el color rojo en la orina también puede darse en la etapa de estro y de gestación (Bowles y Lorenz, 2013, p.2).

La determinación del olor representa una evidencia diagnóstica útil si se percibe un olor diferente en la orina de la felina. La única forma para evaluar el olor es a través del olfato, los olores se clasifican en normal, amoniacal, putrefacto y desagradable. La orina de la felinas no presentó ningún olor extraño, más bien el característico de un felino, es decir olor fuerte amoniacal (Medicin ABC, 2012).

2.3.1 Degradación física de la orina

La degradación es un deterioro o descomposición considerable de una sustancia por medios físicos, químicos o biológicos a un estado en el cual disminuyen sus características esenciales debido a la acción de factores que desembocan en una pérdida de calidad (Definición ABC, 2014).

En condiciones naturales o artificiales, en lo que respecta al hábitat de los animales, la orina está sometida a factores ambientales que afectan su descomposición. Los factores ambientales se dividen en factores bióticos y abióticos. Los factores bióticos son aquellos componentes de un ecosistema que poseen vida es decir seres vivos que interactúan con el entorno. Los factores abióticos son los distintos componentes que determinan el espacio físico en el cual habitan los seres vivos (temperatura, luz, humedad, etc). Es alta la posibilidad de que la muestra se vea afectada por contaminación externa, por insectos, animales, luz solar, temperatura y precipitaciones pluviales (Emmons 1987, pp. 257).

Los factores ambientales abióticos que más influyen en la orina antes de que sea recolectada son; la luz solar, el agua, el aire, la temperatura y la humedad ambiental. La luz solar tiene un impacto determinante sobre el clima, genera calor el cual es acumulado en el ambiente. La orina que se encuentra en el plástico de polietileno o en el colector de acero, almacena calor, lo cual hace que se lleve a cabo el proceso de evaporación y se vaya perdiendo el agua de la orina. Además, la orina se oxida rápidamente al contacto con el aire y se foto oxida con la luz solar también, haciendo que se pigmente. La lluvia se puede mezclar con la orina diluyéndola y contaminándola.

Los factores bióticos que la contaminan son; los insectos, la hembra ocelote al movilizarse dentro de su jaula y los microorganismos externos que la afectan. Las altas temperaturas, la alta humedad originada por la evaporación hacen de Guayllabamba un sitio con un clima caluroso. Es un lugar donde los factores ambientales pueden contaminar de manera natural las muestras de orina.

En el Zoológico de Quito, al estar aislados los felinos en sus jaulas la exposición de la orina es de menor intensidad a los factores ambientales. Al no existir un registro de cómo la orina cambia o cómo es su degradación física no es posible realizar comparaciones. La investigación se diseñó para controlar la mayor cantidad de factores y describir los cambios físicos en la orina de la hembra ocelote que es recolectada de manera no invasiva para que esta pueda ser utilizada en exámenes de medición de estradiol.

Con lo que respecta a la degradación física de la orina el proceso de recolección se daba, aproximadamente, 7 horas después de que la orina era excretada de la hembra ocelote, en este periodo que la orina estuvo al ambiente, es necesario conocer que cambios se dan sobre ella y si puede suscitarse un efecto negativo en los resultados de estradiol.

Cuando la muestra sobrepasa varias horas sin refrigeración o congelación, se producen muchos cambios en su composición, las bacterias presentes desdoblan la urea y esta se convierte en amoníaco, en consecuencia aumenta el pH. Además los cilindros urinarios que son partículas existentes en la orina se descomponen después de varias horas. El color amarillo característico de la orina, llega a oscurecer si se la deja reposar en algún recipiente, porque se produce la oxidación del urobilinógeno a urobilina (pigmento marrón de la orina) (Albeitar, 2014).

2.3.2 Degradación bacteriana

La muestra de orina puede mantenerse en refrigeración hasta 48 horas deteniendo la proliferación bacteriana, ya que no existen cambios en su color y apariencia, pero se recomienda que solo debe estar 24 horas en este estado; no obstante, puede estar hasta 6 horas en temperatura ambiente sin refrigeración hasta ser transportada hacia el laboratorio o para su congelación (Albeitar, 2014).

Según el urocultivo de cada hembra (Anexos 21) no existe desarrollo bacteriano en la orina, si las muestras son recogidas por el método de

recolección de un recipiente, aumenta la posibilidad que existan bacterias por el paso de la orina por el tracto urinario bajo y por la contaminación exterior también. El uroanálisis mostró bacterias mixtas que indican la contaminación de la muestra por factores externos. En 6 horas puede darse crecimiento bacteriano si no se refrigera la orina iniciándose el proceso de degradación lo que desencadenaría en aumento de pH en la muestra y en consecuencia la degeneración de los componentes de la orina (Albeitar, 2014).

El pH de las muestras de orina de las 2 hembras fue de 7 según los uroanálisis. El pH demuestra aumento de bacterias, valores mayores o iguales a 7 pueden indicar la presencia de bacterias que alcalinizan la orina. Además, los valores de nitratos indican de igual manera la presencia de bacteriuria (a cualquier grado), si la prueba no se realiza en muestras recientes se transforman esos nitratos en nitritos por las cantidades mensurables de bacterias contaminantes. Por lo tanto, la tira reactiva con nitritos positivos es una señal indirecta de la presencia de bacterias (Guía Salud, 2012, p.5).

2.3.3 Degradación de la urobilina

El urobilinógeno es un producto sin color que proviene de la reducción del pigmento biliar bilirrubina, el urobilinógeno se forma en el intestino a partir de acción bacteriana, una parte se oxida convirtiéndose en urobilina, se reabsorbe y pasa a la circulación, parte es excretada en heces y en orina, y cuando es expuesta al aire se oxida es decir se degrada debido a reacciones de oxidación, esta reacción se da por las interacciones químicas susceptibles al aire y a la luz ultravioleta y afecta a los pigmentos de la orina ya que estos actúan como foto sensibilizadores es decir aumentan los efectos de la radiación UV (Guía Salud, 2012, p.7).

En cuestión de varias horas la urobilina cambiará a un pigmento de color marrón que hace que la orina se degrade, de ahí la importancia del cuidado en la conservación de las muestras. Los valores de urobilinógeno son: (normal), 1, 3, 6, 12 mg/dl (Erbamannheim, 2010, p.2).

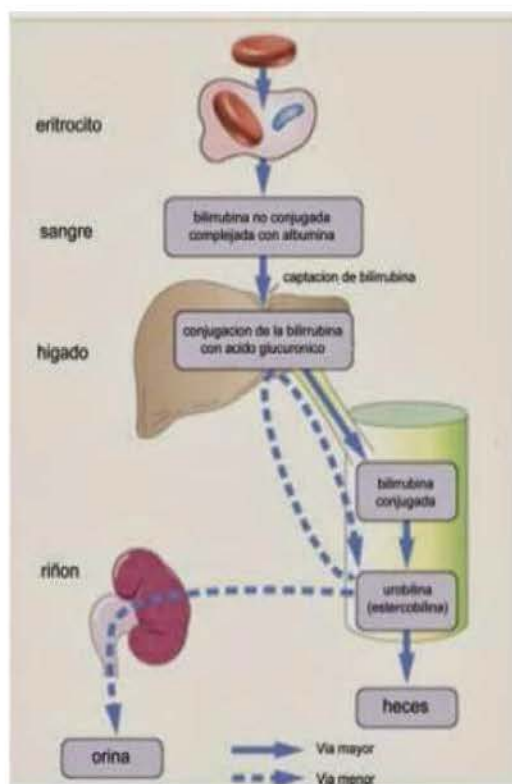


Figura 9, Vía de excreción normal de la bilirrubina y del urobilinógeno.

Tomado de MVZ Cartagena, 2013

2.3.4 Proceso de degradación

Se destinó alrededor de 10 ml para la degradación física de 6 muestras, 3 de la hembra Cleo y 3 de la hembra Salomé que poseían gran contenido, de las cuales 4 muestras fueron documentadas. De cada muestra se destinó una parte para la realización de uroanálisis y de urocultivo. Los valores del uroanálisis del laboratorio mostraron valores de bacterias mixtas escasas, que provienen de la contaminación exterior de las muestras. Se observó sus cambios a temperatura ambiental entre 10°C a 25°C en el transcurso del día; 2 muestras (1 Cleo, 1 Salomé) de orina se dejaron reposar a la intemperie con luz solar, una de las muestras de Salomé fue guardada en un lugar sin luz solar y de igual manera se refrigeró una muestra de orina de Cleo para ver su evolución a 4°C. Todos los cambios se registraron en fotografías y la elaboración de una tabla para explicar los cambios.

Mediante tiras reactivas de orina se monitoreó los cambios a lo que respecta a urobilinógeno, pH y nitritos (Anexos 22). Los tres valores determinan degradación en el orina ya sea por bacterias y/o por pigmentación excesiva.

Se diseñó una tabla que permitió estructurar todo lo observado. Los cambios que llegó a tener la orina se registraron en 5 grupos: horas al ambiente o días en refrigeración, color, valores de urobilinógeno, de nitritos y de pH. Las horas al ambiente muestran cuánto tiempo ha estado influenciada por factores ambientales la orina. El color es para tener una referencia de la primera muestra recogida hasta que se pigmenta y se degrada totalmente. Los valores de urobilinógeno nos detallan el cambio que poseen los pigmentos de la orina al transcurso de las horas y los valores de nitritos y de pH nos demuestran los cambios que ocurren a lo que respecta a proliferación bacteriana.




La orina recogida para degradación se midió a través de la tira reactiva y se anotaron los valores de urobilinógeno, pH y nitritos. Luego se colocaron las muestras al ambiente en un lugar con luz solar, y se evaluó en el transcurso de cada hora mediante la tira reactiva si se iban dando cambios en los tres valores antes mencionados. A las 10 horas es decir 3 horas después de la recolección en el zoológico, las muestras expuestas a luz solar, cambiaron de color a marrón y el valor marcó 3 mg/dl de urobilinógeno, subió el pH a 8 y los nitritos salieron positivos (color rosa pálido). A las 20 horas se completó el proceso de degradación cambiando la orina a un color negro con olor desagradable y un valor de urobilinógeno (normal) quizás por la destrucción ocasionada por la luz solar, también marcó un pH de 8 y haciéndose imposible medir los demás valores por el exceso de coloración que no demostró nada en la tira reactiva (Anexos 22).

En lo que respecta a la orina para degradación física mantenida sin luz solar, se realizó el mismo proceso antes mencionado y mostró una mejoría en lo que respecta a su degradación de urobilina. Se demoró más en cambiar de color, su primer cambio se dio a las 15 horas después de la recolección (1 mg/dl) y el tercer cambio a las 25 horas (1 mg/dl). Eso demuestra que es de gran ayuda que las muestras no estén influenciadas por luz solar.

La orina almacenada en refrigeración se midió cada 12 horas después de la recolección y no sufrió cambios en 2 días, en lo que respecta a los valores de la tira reactiva. En el tercer día se vio un cambio en los valores y la coloración se tomó marrón y posteriormente en 8 días se tomó negra. La orina se degrada en refrigeración de 3 a 4 días y no sirve para la medición de estradiol.

Las muestras tomadas después de varias horas mostraron diferencias. Todos los valores se vieron afectados de 10 a 15 horas dando a conocer que no sirven las muestras más allá de ese tiempo. Además, que las muestras de color rojizo se degradan más rápidamente que las de color ámbar. El urobilinógeno puede dar un falso negativo si está mucho tiempo expuesto a la luz solar. Los factores ambientales más determinantes, son la luz, la temperatura alta, la lluvia, el aire y las bacterias ya que pueden acelerar el proceso de degradación física de orina (Tabla 7).


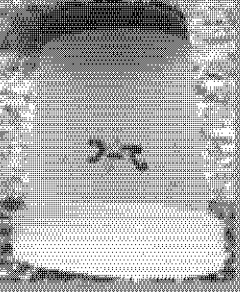
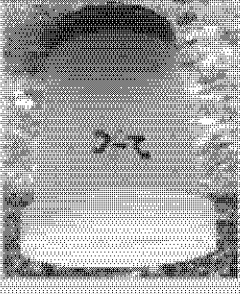
Tabla 6. Valores de tira reactiva en orina

Urobilinogen		urobilinogen and sterkobilinogen
pH		
Nitrites		specific for nitrite (70% of bacteriuria)

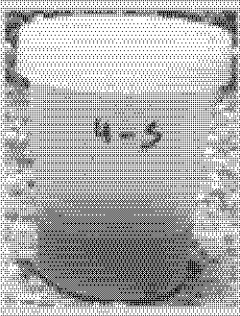
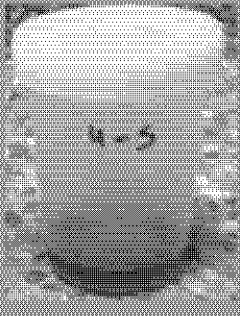
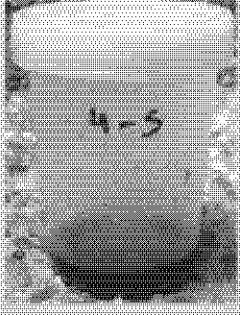
Tomado de Erbmannhelm, 2010, p.2.

Tabla 7. Degradación física de orina

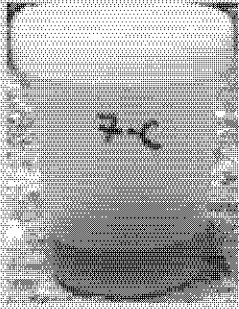
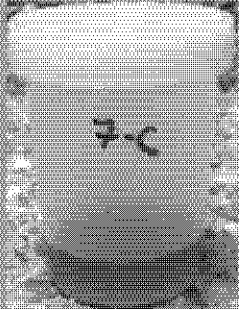
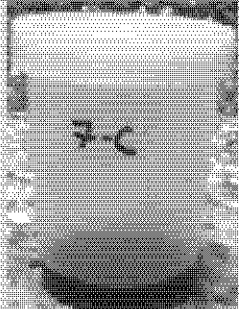
Degradación física: cambios y razones.

Horas de ambiente	Muestras de orina	Color	Valores de Urobilínogeno	Valores de nitritos	Valores pH
7 horas		Rojizo	1 mg/dl	Negativo	7
10 horas		Marrón oscuro	3 mg/dl	Positivo	8
20 horas		Negro	Normal	Error	8

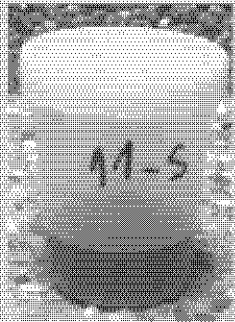
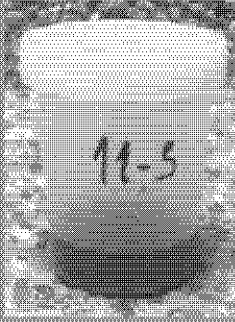
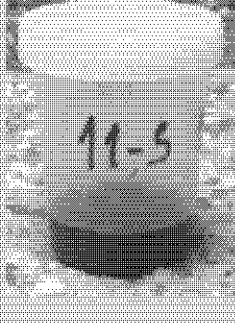
Degradación física: cambios y razones

Horas al ambiente	Muestras de orina	Color	Valores de Urobilinógeno	Valores nitritos	Valores pH
7 horas		Ámbar	Normal	Negativo	7
11 horas		Marrón	1 mg/dl	Positivo	7
22 horas		Negro	Normal	Error	8

Degradación física: cambios y razones

Días en refrigeración	Muestras de orina	Color	Valores de Urobilinógeno	Valores nitritos	Valores pH
1 día		Ámbar	Normal	Negativo	7
3 días		Ámbar	1 mg/dl	Negativo	7
6 días		Negro	3 mg/dl	Error	Error

Muestras mantenida sin luz solar

Horas al ambiente	Muestras de orina	Color	Valores de Urobilinógeno	Valores nitros	Valores pH
7 horas		Rojizo	Normal	Negativo	7
15 horas		Marrón oscuro	1 mg/dl	Positivo	8
25 horas		Negro	1 mg/dl	Error	8

2.4 Determinación y análisis de estradiol

2.4.1 Preparación de reactivos

El kit se mantuvo a 4 grados centígrados en refrigeración hasta el momento que se lo utilizó. Posteriormente, se lo dejó a temperatura ambiente en un promedio de 35 minutos antes de realizar el procedimiento. El kit está

conformado de una microplaca de 96 pocillos, el estradiol estándar, el anticuerpo estradiol DetectX, el conjugado estradiol DetectX, la solución tampón concentrada, el tampón de lavado concentrado, el sustrato TMB, y la solución de interrupción (Anexos 23) (Arbor Assays, 2011, p.8).

Se procedió a la preparación de Assay Buffer o solución tampón con la adición de agua destilada en una concentración 1:4 dando un total de 10 ml de solución, el wash buffer o tampón de lavado. Se diluyó con agua destilada en una concentración de 1:20 dando un total de 50 ml de solución.

Para la preparación del estándar se procedió a colocar en un tubo eppendorf (tubo micro centrifuga) estéril 450 μL de Assay Buffer, luego se agregó 50 μL del estándar de estradiol y se agitó mediante un mezclador vortex por un par de minutos. Se procedió a colocar en otros 4 tubos eppendorf 375 μL de Assay Buffer, en el segundo tubo se colocó 125 μL de la solución del primer tubo y se hizo lo mismo con los otros tubos eppendorf, al final se desechó 125 μL del último tubo para mantener la concentración final como se ve en la (Tabla 8).

Tabla 8. Preparación del estándar

	Std1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
Assay Buffer (μL)	450	375	375	375	375
Adición	Stock	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4
Vol de Adición (μL)	50	125	125	125	125
Final Conc (pg/mL)	10,000	2,500	625	156.25	39.06

Tomado de Arbor Assays, 2011, p.8

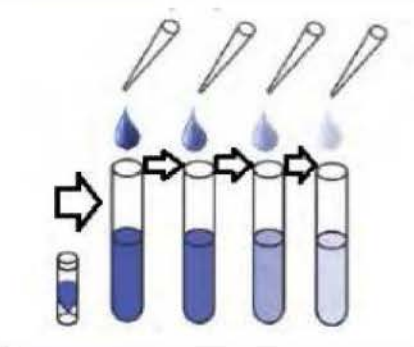


Figura 10, Preparación del estándar.

Tomado de Arbor Assays, 2011, p.8.

Luego de la elaboración de los estándares se procedió a la disposición de las muestras en la microplaca. Los estándares se ubicaron en los pocillos de color rojo dispensando 50 μ l de muestra. Se añadió 75 μ l de assay buffer en las dos placas de color morado que actuaron como enlace no específico y 50 μ l en las placas que actuaron como enlace máximo. En las placas de color naranja se añadió 75 μ l de agua destilada como blanco negativo de la reacción.

En las placas de color verde se dispensó 50 μ l de muestra de la orina de cada hembra, su disposición fue la siguiente: primero la orina de la hembra Cleo y después de la hembra Salomé y así sucesivamente. Luego se añadió 25 μ l del estradiol conjugado DetectX y 25 μ l de anticuerpo de estradiol DetectX en cada pocillo, exceptuando los pocillos de color morado (Arbor Assays, 2011, p.9).



Figura 11, Disposición de microplacas.

Tomado de My Assays, 2014.

Tabla 9. Estándares

Callbrador	Pocillo	Conc. Pg/ml	Datos micro	Datos micro (promedio)	SEM	Ajuste	Recuperación %
Standard1	B1	10000	1220	1220	2,27	10540	105,4
	B2		1220			11170	111,7
Standard2	C1	2500	1040	1040	1,14	2256	90,24
	C2		1040			2224	88,95
Standard3	D1	625	812	811	1,14	684,2	109,5
	D2		810			677,1	108,3
Standard4	E1	156,3	465	464	1,14	149,3	95,52
	E2		462			147,7	94,56
Standard5	F1	39,06	203	205	1,14	39,58	101,3
	F2		206			40,14	102,7

Tabla 10. Datos desglosados de las muestras (ver Figura 10)

Muestra	Pozos	Datos Micro	%	Conc.	Conc. (Promedio) Pg/ml
1-c	C3	0,538	210	41,82	41,26
	C4	0,54		40,69	
2-c	D3	0,541	208	40,14	40,7
	D4	0,539		41,26	
2-s	E3	0,501	295	66,85	66,45
	E4	0,502		66,06	
3-c	F3	0,501	295	66,85	66,45
	F4	0,502		66,06	
3-s	G3	0,501	295	66,85	68,85
	G4	0,503		66,06	
4-c	H3	0,495	308	71,73	70,9
	H4	0,497		70,07	
4-s	A5	0,495	309	71,73	71,31
	A6	0,496		70,9	
5-c	B5	0,494	314	72,57	72,99
	B6	0,493		73,41	
5-s	C5	0,495	309	71,73	73,27
	C6	0,498		70,9	
6-c	D5	0,495	308	71,73	70,9
	D6	0,497		70,07	
6-s	E5	0,48	343	85,11	84,64
	E6	0,481		84,17	

Muestra	Pozos	Datos Micro	%	Conc.	Conc. (Promedio) Pg/ml
7-c	F5	0,49	325	76	77,32
	F6	0,487		78,65	
7-s	G5	0,471	362	94,02	93
	G6	0,473		91,98	
8-c	H5	0,472	364	93	93,51
	H6	0,471		94,02	
8-s	A7	0,44	436	130,7	131,3
	A8	0,439		132	
9-c	B7	0,492	319	74,27	75,13
	B8	0,49		76	
9-s	C7	0,454	402	112,9	112,3
	C8	0,455		111,7	
10-c	D7	0,532	227	45,34	45,64
	D8	0,531		45,95	
10-s	E7	0,458	392	108,2	107
	E8	0,46		105,9	
11-c	F7	0,54	210	40,69	41,26
	F8	0,538		41,82	
11-s	G7	0,453	405	114,1	113,5
	G8	0,454		112,9	
12-c	H7	0,527	236	48,42	48,11
	H8	0,528		47,79	
12-s	A9	0,451	409	116,5	115,9
	A10	0,452		115,3	
13-c	B9	0,541	203	40,14	39,59
	B10	0,543		39,04	
13-s	C9	0,526	241	49,05	49,37
	C10	0,525		49,69	
14-s	D9	0,536	216	42,97	42,69
	D10	0,537		42,4	
B0	G1	0,588	100	19,08	19,26
	G2	0,587		19,44	
NSB	A1	0,625	0	8,451	7,101
	A2	0,638		5,752	

Después de todo el proceso que se realizó, la microplaca fue llevada a un agitador orbital donde se mantuvo por dos horas asegurando la adecuada mezcla de los reactivos (Anexos 24). Posteriormente se lavó la placa 4 veces con un volumen 300 μ l de tampón de lavado desechando cada vez el contenido y secando con papel absorbente. Después se añadió 100 μ l del sustrato TMB a cada pozo, y se dejó reposar la microplaca a temperatura ambiente durante 30 minutos (Arbor Assays, 2011, p.9).

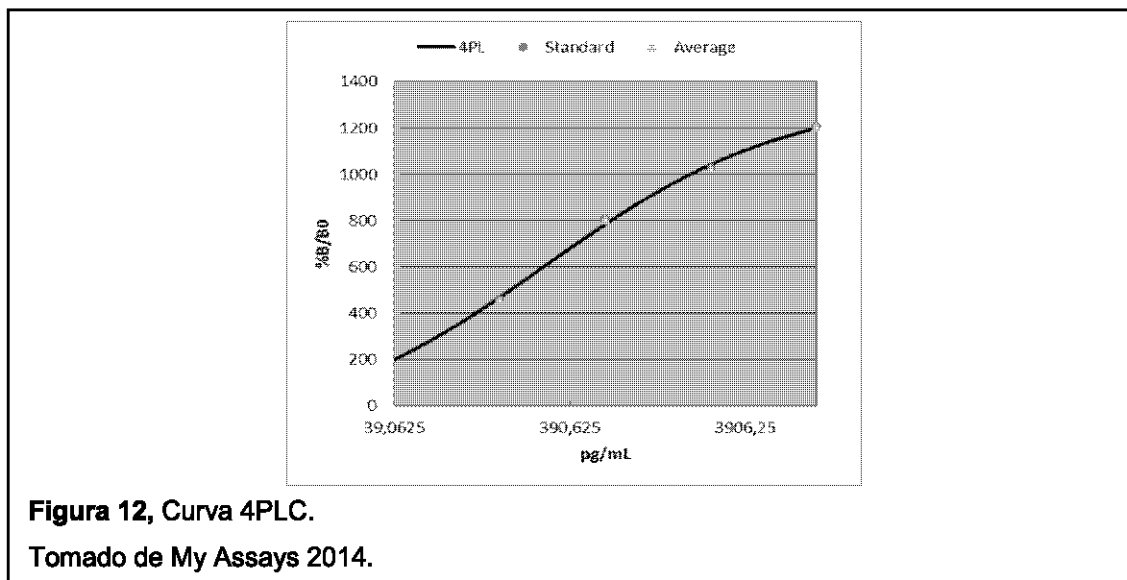
Finalmente se añadió 50 μ l de la solución de interrupción a cada pozo y fue llevada al lector manual para placas de microelisa (Sirio S, Radim/SEAC co, Roma Florencia, Italia) a una densidad óptica generada por cada pocillo a 450nm. Esta técnica es muy buena para la medición de hormonas en orina ya que da los valores precisos en cada muestra para poder hacer las mediciones de una manera eficaz y eficiente (Radim Diagnostics, 2013).

2.5 Análisis estadístico

El método estadístico que se utilizó para la realización de la investigación es el denominado "descriptivo" o también conocido como análisis exploratorio ya que los datos obtenidos fueron de pocos animales quienes fueron muestreados de acuerdo al sexo, estado fisiológico y a la edad, es decir hembras, preñez o no presencia de preñez y alrededor de 5 a 9 años de edad, respectivamente. Se midió la concentración semanal de las hormonas en la orina de una manera simple, se tabularon los datos para demostrar la concentración hormonal. Asimismo se utilizaron gráficos para explicar de una manera más práctica los resultados.

Estos datos fueron planteados mediante un software 4PLC (4-Parameter Logistic curve) curva logística de 4 parámetros. Esta función constituye un refinamiento del llamado modelo exponencial de una magnitud, el cual es utilizado para diversos modelos de crecimiento y decrecimiento como por ejemplo el aumento y disminución de niveles hormonales en un periodo determinado. El análisis cuantitativo de las muestras usa el 4PLC, que es el

método adecuado para datos de función sigmoidea. Es comúnmente usado para el análisis de ajuste de curvas en inmunoensayos.



El software lo provee la empresa Arbor Assays, el mismo distribuidor del cual se consiguió el kit. Esta brinda diferentes servicios a sus clientes para el desarrollo de la investigación. El servicio llamado "My Assays" nos sirve para la tabulación de datos estadísticos y de curvas de valores (My Assays, 2014).

Todas las muestras primero son corregidas con el promedio del valor del grupo en blanco de la microplaca, y se da el ajuste 4PLC de los valores estándares. Las concentraciones se ajustan a la curva, además los valores más bajos y más altos que no se encuentren entre los valores estándar no aparecerán en la curva logística. Luego se procedió a pasar los valores de "My Assays" a Microsoft Excel y elaborar gráficos individuales de los datos obtenidos, gráficos diferenciando los ciclos de las dos hembras y otros demostrando la concentración de hormonas y los picos específicamente (My Assays, 2014).

La estadística descriptiva de los valores de estradiol de las dos hembras en las distintas etapas (estro y gestación) se expresó como la media \pm SEM (error estándar de la media) es de 1.14 (tabla 9) y fue provista por el programa My Assays. El SEM es un dato estadístico informado es decir el tipo de error

causado por la variación aleatoria del muestreo al repetir una prueba en las mismas condiciones, si las condiciones cambian significativamente el error estándar de la media será alto (Yanez, 2007, p.46).

Es un método que se utiliza para calcular la desviación estándar de una distribución de muestreo. Representa la dispersión de la media de una muestra de valores si se continúa con la toma de muestras, proporcionando una idea de la precisión de la media. El SEM es inversamente proporcional al tamaño de la muestra, cuanto mayor sea el tamaño de la muestra, menor será el error estándar de la media (Yanez, 2007, p.46).

Prueba de “t” Student

Se empleó la prueba de “t” de Student mediante el programa Statistix 10 que es un programa de análisis estadístico que se puede utilizar para analizar rápidamente los datos. Si al realizar un muestreo no existe la posibilidad de extraer una gran cantidad de muestras, utilizar una distribución normal puede presentar mucho riesgo estadístico. Toda inferencia estadística que se desea realizar con muestras pequeñas, aumenta en validez si se la practica con la distribución “t” Student.

La prueba “t” Student se utiliza para comprobar si dos grupos de medidas de un fenómeno son distintas o no, es decir se la aplica cuando se desea comparar dos medias. Se la utiliza cuando las medidas corresponden a las mismas unidades y cada grupo de medidas puede caracterizarse por un promedio y una medida de variación alrededor del promedio – la varianza o desviación estándar. Generalmente se lo emplea en muestras pequeñas de menos de 30 valores (Yanez, 2007, p.46).

Hipótesis nula: los valores de los promedios de estradiol de las hembras ocelote son similares.

Hipótesis alternativa: el valor de uno de los promedios de las muestras de estradiol de las hembras ocelote es mayor que el otro.

Estadístico de la prueba: t

Nivel de significancia (alfa): 0.05

One-Sample T Test

Null Hypothesis: $\mu = 0,05$

Alternative Hyp: $\mu \neq 0,05$

Variable	Mean	SE	T	DF	P	Lower 95% C.I.	Upper 95% C.I.
Cleo	60,289	5,0241	11,99	12	0,0000	49,343	71,236
Salomé	86,555	7,7192	11,21	12	0,0000	69,737	103,37

Cases Included 13 Missing Cases 0

Tomado de Statistix 10.0

2.6 Resultados y discusión

2.6.1 Resultados

Degradación física de orina

Los resultados de los análisis de orina (uroanálisis, urocultivo y tiras reactivas) a lo largo de la tesis nos informaron de la excelente salud que poseen las hembras ocelote en el Zoológico de Quito, razón por la cual durante estos años han sido tan fértiles. Todas las muestras tomadas a las 7 horas de recolección mostraron valores normales (Anexos 21). Las muestras estuvieron en un punto normal y muy cerca del límite para ser utilizadas para medición hormonal (estradiol) ya que existieron valores que pudieron alterar la orina.

En lo que respecta a los cambios físicos en la orina, el urobilinógeno de las muestras sobresa, este pigmento sube de manera abrupta de 10 a 15 horas a temperatura ambiental y cuando está expuesto a rayos solares se foto oxida de manera más rápida. Los valores oscilan entre 1-3 mg/dl y hace que la

pigmentación de la orina pase de ámbar a marrón y luego a negro; además, los nitritos se hacen positivos y el pH aumenta de 7 a 8 mostrando valores relacionados con proliferación bacteriana. Las muestras se vieron afectadas por contaminación externa específicamente, ya que los urocultivos no mostraron ningún desarrollo bacteriano.

Es conveniente recolectar la muestra de 7 a 8 horas después de su exposición. Si existe una eventualidad para recoger la orina se puede esperar algunas horas para colectarla si la muestra no está influenciada por luz directa, ya que la muestra que estuvo bajo sombra mostró valores bajos de pigmentación. La orina en refrigeración no cambió y sus valores se mantuvieron normales durante 3 días, al sexto día se volvió negra, el urobilinógeno subió a 3 mg/dl, los nitritos y el pH no se pudieron medir por el exceso de pigmentación que coloreo toda la tira reactiva.

Muestras de orina destinadas para medición hormonal pueden estar 2 días en refrigeración y solamente horas al ambiente. La congelación de la orina es primordial para mantener las muestras en buen estado, la degradación física y hormonal a -17 grados centígrados se interrumpe (Jewgenow et al., 2009, p.2). Las muestras se colocaron en un congelador especial a -20°C para proporcionar el mejor estado para ser tratadas con el kit de EIA.

Concentración de estradiol

Los datos obtenidos por lector manual para placas de microelisa (Sirio S, Radim/SEAC co, Roma Florencia, Italia) analizaron los pozos seleccionados en menos de dos minutos concretamente. Mediante el programa My Assays de la empresa Arbor Assay se comenzó la tabulación de los datos para observar las concentraciones y la curva proporcionada.

La curva de calibración fue proporcionada por el software My Assays, el cual utiliza una curva logística que interpola y saca la concentración de todos los datos que se utilizaron en el kit.

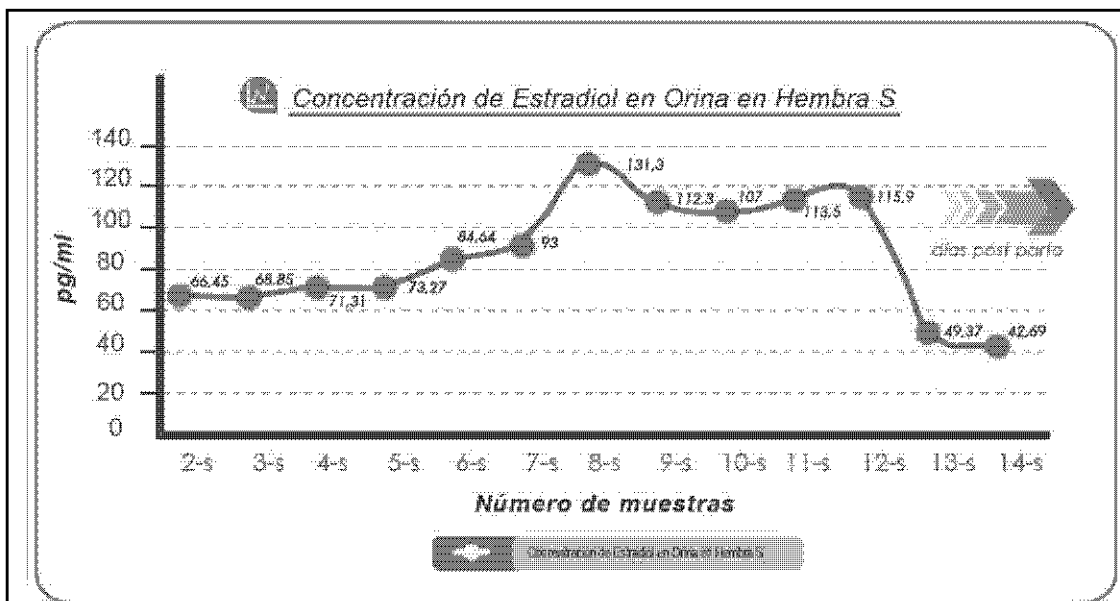
Todos los datos y el promedio de los duplicados de cada muestra de orina que da la concentración de estradiol se encuentran en la Tabla 10.

La concentración de estradiol en orina en hembra ocelote en etapa de estro llego a valores de $(93,51 \pm 1.14 \text{ pg/ml})$ ($p < 0.05$) y la concentración en etapa de gestación a valores de $(131.3 \pm 1.14 \text{ pg/ml})$ ($p < 0.05$).

El pico más alto de todos los datos es de la hembra Salomé con la muestra 8-S, 5 días antes del parto de la felina. Los datos de días anteriores se mantienen altos y suben paulatinamente hasta el día del parto 13-C donde bajan. Con lo que respecta a la hembra Cleo su pico fue la muestra 8-C y después de eso cayeron su niveles abruptamente. Los valores de la hembra Cleo no son tan altos como los de la hembra Salomé, demostrando que las concentraciones de estradiol pueden llegar a sus valores máximos en etapa de gestación. Los dos datos son muy importantes para conocer cómo se da el funcionamiento de su fisiología hormonal. Los gráficos individuales nos muestran la curva ascendente y descendente de cada hembra.

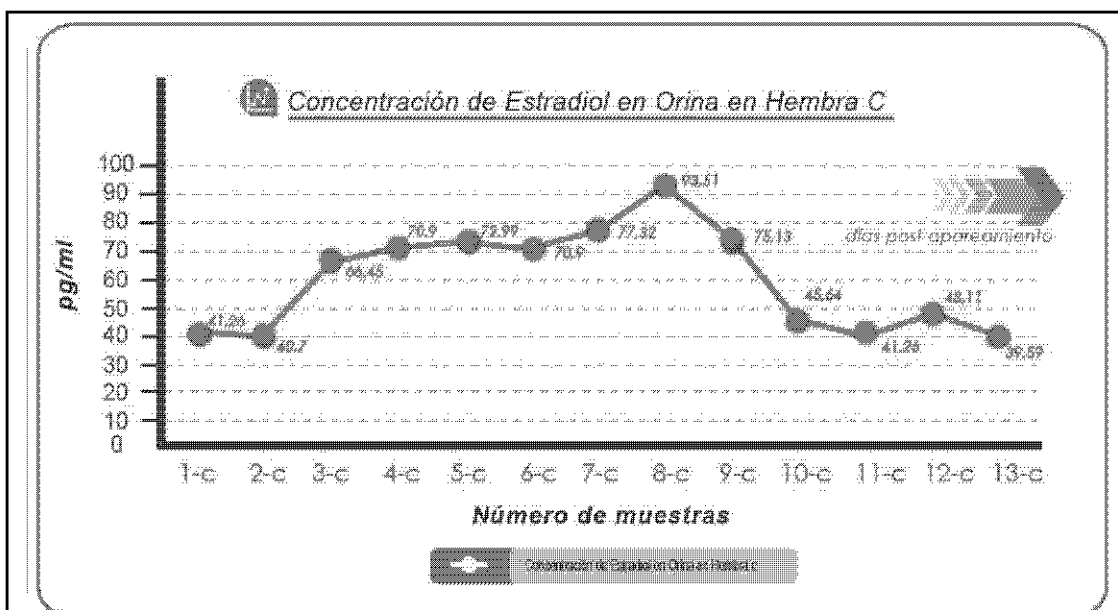
Prueba de “t” Student

Decisión: se acepta la hipótesis alternativa ya que el valor de p asociado a t es 0.0000. ($p < 0.05$)



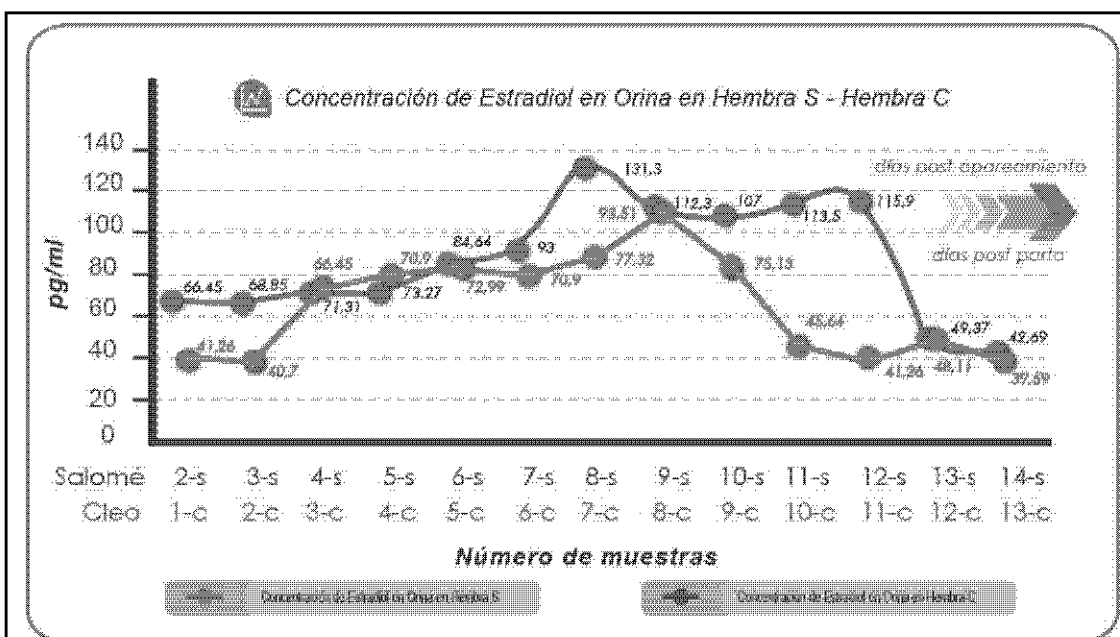
Número de muestras	pg/ml
2-s	66,45
3-s	68,85
4-s	71,31
5-s	73,27
6-s	84,64
7-s	93
8-s	131,3
9-s	112,3
10-s	107
11-s	113,5
12-s	115,9
13-s	49,37
14-s	42,69

Figura 11, Concentración de Estradiol Salomé, 2014.



Número de muestras	pg/ml
1-c	41,26
2-c	40,7
3-c	66,45
4-c	70,9
5-c	72,99
6-c	70,9
7-c	77,32
8-c	93,51
9-c	75,13
10-c	45,64
11-c	41,26
12-c	48,11
13-c	39,59

Figura 12, Concentración de Estradiol Cleo, 2014.



Salomé	
Número de muestras	pg/ml
2-s	66,45
3-s	68,85
4-s	71,31
5-s	73,27
6-s	84,64
7-s	93
8-s	131,3
9-s	112,3
10-s	107
11-s	113,5
12-s	115,9
13-s	49,37
14-s	42,69

Cleo	
Número de muestras	pg/ml
1-c	41,26
2-c	40,7
3-c	66,45
4-c	70,9
5-c	72,99
6-c	70,9
7-c	77,32
8-c	93,51
9-c	75,13
10-c	45,64
11-c	41,26
12-c	48,11
13-c	39,59

Figura 13, Concentración de Estradiol de las dos hembras.

Los valores de la hembra en gestación, como se muestra en la figura 11, suben significativamente. En su encerramiento se la veía muy inquieta sin ganas de comer y muy agresiva. En cambio, la hembra en estro era muy juguetona y emitía ronroneos casi desde los primeros días que fue observada. Los valores se asemejan a otros estudios en ocelote hembras en Brasil, donde la concentración de estradiol fue de 4.94 a 151.00 pg/ml en orina (Rodríguez y Barnabe, 2010, p.73).

La concentración de estrógenos no es tan alta como en heces o en suero, pero de igual manera son datos muy válidos por la complejidad de su obtención, que demuestran los valores de estradiol en etapa de estro y gestación de una hembra ocelote.

2.6.2 Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, las técnicas no invasivas de recolección de orina; entre ellas la de una superficie (plástico polietileno) o de un colector (placas de acero) resultaron muy útiles y de igual manera se presentaron como una opción distinta, nueva y muy eficaz que permitió la recolección de muestras de orina de un animal silvestre en cautiverio, que en muchas ocasiones puede resultar un proceso complicado y tornarse un reto. Estas muestras se destinaron para análisis de orina e igualmente para que se calcule la concentración de estradiol de las hembras ocelote permitiéndonos diferenciar los periodos que se caracterizan por niveles de estradiol altos (estro y gestación).

Si bien los valores obtenidos resultaron menores a otros reportados en la tesis, como por ejemplo en el estudio en suero de ocelotes en Brasil durante el periodo de estro, los cuales mostraron concentraciones de estradiol de 59.84 a 307.77 pg/ml (Tebet, 1999, p. 102). Esta diferencia entre los valores se debe a la menor concentración que existe en orina de estradiol y además a la sensibilidad del kit, y no se podría llegar a realizar una comparación con otros estudios realizados en suero, saliva o heces. No obstante los valores se

encuentran en rango aceptable en relación a estos estudios, demostrando su validez y complejidad.

La hembra Cleo se presume se encontraba al comienzo del ciclo estral, por el aumento paulatino de estradiol que supone el inicio de proestro y estro (apareamiento) por lo que su comportamiento sexual coincidió con lo descrito para la especie, es decir emitía vocalizaciones, refregaba su cuerpo contra las paredes de su jaula, presentaba lordosis etc.

No se conocía que la hembra Salomé estaba preñada, pero al ver sus valores hasta los últimos días se descubrió que seguía produciendo gran cantidad de estradiol hasta casi la última semana de su parto, por la gran producción de la placenta. El principal estrógeno producido durante la gestación es el estriol, que aumenta su concentración a lo largo del embarazo hasta llegar a niveles muy altos, pero de igual manera la placenta también genera estradiol a niveles considerables. Los valores de concentración de estradiol en la tesis pueden llegar a ser relativamente bajos, a comparación con los altos niveles de estriol que deben existir en el suero materno de la hembra.

Durante la gestación los niveles de estradiol se mantienen en niveles basales y es la progesterona la que se mantiene muy alta, no obstante según los resultados del estudio se comprobó que los estrógenos aumentan significativamente durante la última semana de gestación, lo que afecta su comportamiento, haciendo que la hembra se vuelva hiperactiva, agresiva contra la otra hembra y receptiva al macho como se pudo comprobar al mirar su comportamiento.

No se debe omitir que pueden existir muchos factores que desembocan en una variación en lo que respecta a los niveles de concentración de estradiol, pueden variar, ya sea por tipo de alimento, metabolismo, o producción esteroidea.

Además, se comprobó en el estudio que la falta de fotoperiodo no afecta de manera muy directa a las hembras del Zoológico de Quito. Las felinas pasan

alrededor de 15 horas encerradas en sus jaulas posteriormente al cierre del zoológico recibiendo, muy tenuemente, luz solar, pero al momento de ser liberadas buscan al macho, por lo que no se afecta su ciclo, ya que las dos hembras han parido a sus crías durante estos años en Guayllabamba.

De la hembra Cleo se concluyó que su pico más alto fue de 93,51 pg/ml de la muestra 8-C y su más bajo de 39 pg/ml de la muestra 14-C, datos que son un poco menores que los de la hembra Salomé que van desde 42,69 pg/ml hasta 131,3 pg/ml y que nos presumen que los niveles de estradiol en etapa de estro están en rango a los valores de la última etapa de gestación. Los dos datos son muy importantes para conocer cómo se da el funcionamiento de su fisiología hormonal, que pueden ser de gran valor si se sigue con los estudios, para posteriormente realizar biotecnologías reproductivas en hembras que tengan problemas de infertilidad.

Se presumía que el pico máximo en la etapa de estro sería el día del apareamiento por parte del macho, en consecuencia se observó que el pico de estradiol puede darse un día antes de la monta del macho lo cual induce a la producción y aumento de la onda de LH, si se da el apareamiento por parte del macho en el estro se observa que los valores de estradiol descienden y se presume que se da la concepción, sino un periodo de interestro debería presentarse.

El 17β -Estradiol es la hormona más importante del embarazo en las hembras felinas, ya que puede prevenirlo con anterioridad por sus niveles altos en orina y así manejar con planificación el nacimiento de las crías. Los resultados del presente estudio sugieren que la actividad ovárica de la hembra ocelote se puede monitorear en base a estradiol en orina, si las muestras son recogidas diariamente, con el objetivo a largo plazo de utilizar la información recopilada y llegar a monitorear los niveles de estradiol en un protocolo de super ovulación en hembras con problemas de fertilidad en cautiverio.

Si los dos valores de concentración de estradiol obtenidos (estro y gestación) fueran de una misma hembra, y además se hubieran obtenido muestras diarias o semanales durante casi 100 días, desde el inicio del ciclo estral; su primer

celo y hasta su gestación, se daría un gráfico como la (figura 14). Se puede presumir que los dos datos obtenidos de la concentración de estradiol en orina, es decir el estro de la hembra Cleo y la gestación de la hembra Salomé, nos grafica cómo podría ser el transcurso del ciclo reproductivo de una hembra ocelote en lo que respecta a sus niveles de estradiol.

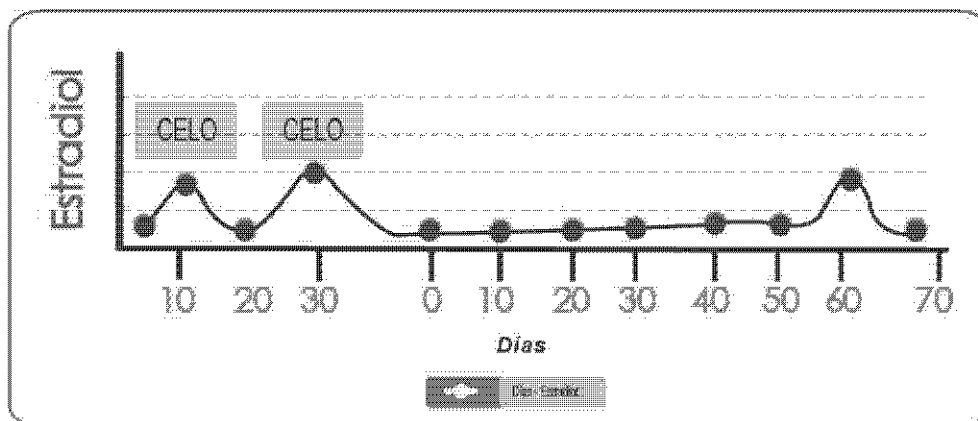


Figura 13, Cambios de estradiol desde el primer celo hasta la gestación.

Tomado de Mundo animalia, 2008

No existen otros estudios relacionados con la determinación de la degradación de orina en el ambiente, ya que generalmente se utilizan heces para medir estradiol en animales por la facilidad en la recolección. El objeto del estudio es el de permitir recolectar orina de hembra ocelote después de un determinado tiempo desde que es excretada y que todavía se encuentre viable para ser utilizada en medición de concentración de estrógenos, se determinó si la orina estaba en buena condición con la ayuda de herramientas diagnosticas de medición de degradación; urocultivo, uroanálisis y medición de tres valores en tiras reactivas (urobilinógeno, pH y nitritos).

El plástico de polietileno solo funcionaría en lugares cerrados como jaulas, y el colector de acero inoxidable sería eficiente en cualquier clase de hábitat artificial, con un poco de perspicacia se puede llegar a coleccionar muestras de orina de un ocelote. El proceso de colecta de orina en zoológicos o centros de rescate puede ser a veces un inconveniente ya que hay que esperar mucho

tiempo para poder recolectar las muestras por cuestiones de manejo de animales y de horarios de apertura.

En lo que respecta a la degradación física, la orina que se recolectó de 7 a 8 horas se mantuvo viable ya que según los estudios de uroanálisis y de urocultivo, las hembras se encontraban en un gran estado de salud resultando muy beneficioso para que su orina no contenga elementos extraños que no permitan los estudios de hormonas o de analitos en orina. Un factor clave que ayudo a mantener la muestra viable, fue la estructura cerrada de la jaula que no dejaba pasar muchos rayos solares. La orina puede ser recolectada después de hasta 8 horas sin que ocurra su descomposición, siempre y cuando no existan muchos factores que la afecten como pueden ser luz solar, lluvia, o contaminación natural.

La pigmentación excesiva de urobilina que comienza cuando la muestra está en reposo es un marcador para evaluar la degradación física de orina mediante tiras reactivas. Este proceso ocurre de 10 a 15 horas y evidencia valores de 1-3 mg/dl de igual forma otros marcadores son el pH alcalino y nitritos positivos en la tira reactiva que indican bacteriuria en un 70% de los casos, sea esta por infección del animal o por contaminación externa, que se presume fue el caso en las muestras obtenidas por el método de recolección en recipientes. La orina expuesta a luz solar y al aire se degrada más rápidamente por la foto oxidación, al igual que la orina de color más oscuro, así también la lluvia puede llegar a contaminar la muestra. Los analitos antes mencionados son los marcadores principales para medir la degradación física de orina mediante tiras reactivas.

En lo que respecta a su congelación a -20 grados centígrados, la orina permaneció viable durante 3 meses para cualquier tipo de examen sin ningún problema. Se lo comprobó al realizarse una prueba mediante tira reactiva de orina, uroanálisis y urocultivo, los cuales no mostraron ningún valor alterado.

3 CAPÍTULO III. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.1 Conclusiones

- La degradación física de la orina se suscita por la oxidación que recibe por su exposición a la luz solar y al aire; la urobilina se foto oxida cuando la muestra se deja reposar por algunas horas, lo que desencadena en el aumento de pH y la aparición de nitritos por la proliferación bacteriana. Bajo ningún motivo la orina debe estar expuesta directamente a rayos solares y en todo momento debe estar cubierta de la luz y en un recipiente cerrado herméticamente. Si no se procede de manera inmediata en la recolección de orina, la muestra puede quedar inservible en un lapso de 10 horas o menos.
- Los cambios físicos que se dan en la orina durante su proceso de degradación son elementos claves para el posterior éxito de la investigación. La observación súbita de cambio de coloración de orina amarilla a una de color marrón sugiere que la orina se ha degradado, de ahí la importancia del cuidado en la conservación de las muestras. Además, la orina adquiere una elevada turbidez y un desagradable olor amoniacal.
- Es viable la determinación de degradación física de orina, ya que existen muchas herramientas para su diagnóstico. El examen de orina es uno de los métodos más antiguos de la medicina que nos permiten conocer los componentes urinarios de maneras muy simples. Mediante uroanálisis se analiza la orina física y químicamente, además con el urocultivo se encuentran los microorganismos que la afectan y mediante tiras reactivas se miden analitos de manera práctica. Se pudo observar que la orina se pigmenta por su exposición al sol, ya que la foto oxida, y viene a ser un elemento clave de su degradación, de igual manera la proliferación bacteriana por contaminación externa llega a contaminar la orina haciendo que se descomponga totalmente entre 10 a 12 horas al

ambiente. El color cambia de ámbar a marrón y después a negro en cuestión de horas, y es fundamental recolectar, refrigerar y posteriormente congelar la orina para detener este proceso.

- Los factores ambientales pueden llegar a contaminar de manera natural la muestra de orina en un alto porcentaje, ya que por más que se proceda a desinfectar la jaula y los materiales diariamente y el proceso de colecta de la orina se lo realice con toda la asepsia posible, las muestras se contaminarán al final de cuentas. El método de recolección en un recipiente no es la mejor opción si se desea tener una muestra libre de contaminación y que sirva para el diagnóstico de infecciones del tracto urinario, ya que todos los uroanálisis realizados estaban infectados con bacterias mixtas.
- Existen muchas dificultades en la recolección de orina de un animal silvestre en cautiverio, no siempre pueden ser planificadas con exactitud, se depende mucho del comportamiento del animal, así también de las instalaciones, del equipo que se posee y de la "cooperación" del individuo, pero con un poco de paciencia es factible realizar medición de estradiol en orina de hembra ocelote.
- Algunos métodos para la obtención de datos endocrinólogos requieren de acciones invasivas que pueden causar mucho estrés y dolor a los felinos. Generalmente, se necesita anestesia general para su procedimiento y resulta muy cruel practicarlos. Métodos no invasivos como la medición de metabolitos excretados en orina o hasta en heces, son alternativas excelentes ya que no requieren manipular a los animales y evidencian concentraciones hormonales útiles para cualquier clase de estudios.
- La identificación de concentración de estradiol en orina de hembras ocelote es factible si se llega a dar una pronta colecta de orina en cualquier de los métodos de recolección no invasivos. La presente tesis sugiere que se pueden monitorear estrógenos urinarios (estradiol) de la

hembra ocelote si se la recolecta frecuentemente y si se utiliza el adecuado kit comercial. Además, la identificación del nivel de estradiol resulta de mucha utilidad ya que permite diferenciar sus niveles, sean estos basales (bajos) o de niveles altos en periodos de proestro, estro o de gestación.

- Las muestras de orina destinadas para medición hormonal pueden estar 2 días en refrigeración y solamente horas de 10 a 12 al ambiente. La congelación de la orina es primordial para mantener las muestras en buen estado. La degradación física y hormonal a -17 grados centígrados se interrumpe y están viables en un periodo de 3 meses. Las muestras deben ser colocadas en un congelador especial a -20°C para proporcionar el mejor estado para ser tratadas con el kit de EIA.
- La planeación es un factor clave para la recolección de orina debido a que se necesitan de muchas técnicas para tener varias opciones si alguna falla. La técnica de colocar un plástico en la base de la jaulas fue muy efectiva, ya que la cantidad de volumen de orina que se recogía era de gran caudal y no se estresaba a los animales; además, se presume que les gustaba el sonido que hacía la orina rozando con el polietileno. El contenedor de acero inoxidable también resultó de manera muy efectiva. La orina se encontró en condiciones medianamente óptimas para la medición de estradiol, el permanecer mucho tiempo expuesta al ambiente no es recomendable y se presume que estuvo al límite de su validez.
- La cantidad necesaria de orina que se necesita para la realización del kit de estradiol es de 5 ml por muestra, si se llega a dar más cantidad de orina sería de gran ayuda para realizar uroanálisis y urocultivo y así monitorear posibles infecciones sintomáticas o asintomáticas que pueden llegar a mermar su vida reproductiva.

- El Kit 17 β -Estradiol inmunoensayo DetectX fue el que se eligió para el presente estudio debido a que utiliza un anticuerpo creado específicamente para medir estradiol y sus metabolitos en orina, y se diferencia de los demás por ser el de más fácil realización y por ser el único señalado como multi especies (estradiol es idéntico a través de todas las especies) es decir puede ser realizado en hembras de todo tipo. Además, el estradiol es el más activo y el más importante de las tres hormonas estrogénicas del organismo, porque es producido por los ovarios y sus niveles en orina son óptimos para estudios de mediciones.
- Mediante los resultados se comprobó que existe una actividad esteroideogénica incluso durante la gestación, en la cual, el estradiol aumenta significativamente y de manera constante mostrando picos durante la última semana antes del nacimiento de la crías. Los picos se pueden suscitar por la producción de la placenta. Además, el apareamiento se puede dar un día después del pico de concentración de estradiol en el estro y está relacionado con la onda óptima de LH que a su vez se relaciona con el número e intervalo de cópulas ya que aumenta la probabilidad de ovulación.
- Históricamente, estas especies no se han reproducido bien en cautiverio y las crías que nacen no logran sobrevivir por diferentes motivos. Sin embargo, se espera que la comprensión de las similitudes y las diferencias biológicas den lugar a estrategias de gestión para la mejora de la fase reproductiva.

3.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar análisis de orina antes de proceder a calcular la concentración de estradiol, ya que puede ser muy beneficioso para prever si existe alguna anomalía en la orina que pueda afectar los resultados, que en algunas veces son muy difíciles y costosos de

obtener. El método de diagnóstico por medio de tiras reactivas es muy fácil de realizarlo y sirve para medir si la orina está en proceso de degradación o contaminada con productos del metabolismo o agentes patógenos, también es recomendable corroborar los datos obtenidos mediante tiras reactivas con un uroanálisis y un urocultivo para despejar dudas o diagnosticar patologías. Además, se sugiere la filtración de la orina con papel filtro para garantizar su pureza al momento de analizarla.

- Antes de realizar un estudio sobre perfiles hormonales, es preferible investigar bien sobre todos los pasos que deben realizarse, y se recomienda que se los ejecute en heces ya que en la práctica es mucho más fácil su recolección y también se los colecta de manera no invasiva.
- Se recomienda no dejar mucho tiempo en la recolección de orina (máximo 8 horas), ya que puede verse afectada la muestra, el éxito en la colecta de las muestras no siempre es el óptimo, y depende mucho de las políticas de los centros de rescates o de los zoológicos, así que la planeación del tiempo es la clave para obtener los mejores resultados en las pruebas a realizarse. Adicionalmente se sugiere no exponer ninguna muestra de orina a la luz solar, ya que se puede alterar.
- Comprender la fisiología reproductiva de una hembra felina así como participan las hormonas en su ciclo reproductivo, es muy importante para conocer y prever los ciclos estrales. La observación de manifestaciones de cambios de conducta y el mecanismo de acción de las hormonas gonadales permitirá una mejor comprensión de sus variaciones en el ciclo estral de los pequeños felinos y nos dará mejores resultados y mejores posibilidades de manejo, sin olvidarnos, de igual manera, de las particularidades reproductivas del macho que es, asimismo, muy importante en el asunto de conservación.
- El bienestar animal es lo primero, se recomienda que al realizarse estudios sobre animales ya sean silvestres o domésticos, se priorice el respeto y su cuidado. La innovación de técnicas no invasivas es el futuro

de las investigaciones, tratar de no herir o estresar al animal es el objetivo principal de un Médico Veterinario y Zootecnista, dándonos una mejor calidad en la muestras ya que no se verán afectadas por efectos del estrés.

- El kit comercial que debe ser adquirido para la realización de cualquier investigación debe ser buscado en el mercado nacional o internacional con anterioridad y si es posible buscar ayuda por medio del gobierno para que no exista un alto costo y un tiempo de espera excesivo al momento de su importación, asimismo se recomienda la recolección de más muestras de orina para proceder a realizar un estudio más extenso del tema a tratarse.
- Se recomienda la realización de más estudios sobre hormonas esteroideas en felinos, la continuidad de investigaciones es la única forma de llegar a preservar no solo a los ocelotes sino a todas las especies, las hormonas son la esencia de la reproducción, por lo tanto la comprensión de los factores que influyen la función endocrina es clave para maximizar el éxito reproductivo.
- Se recomienda el uso de técnicas de reproducción artificial y de biotecnología de crio-preservación ya que pueden ayudar a la conservación de especies, la crio-preservación de gametos y embriones, son la tecnología del futuro y pueden ser usados para programas de conservación y de fuentes genéticas para poblaciones in situ y en ex situ.

REFERENCIAS

- Albéitar. (2014). La obtención de la muestra de orina. España, Zaragoza: Exopol. Recuperado el 17 de agosto de 2014, de <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/7224/Articulos-otros-temas-archivo/La-obtencion-de-la-muestra-de-orina.html>
- Aliaga-Rossel, E., Moreno, R., Kays, R. y Giacalone, J. (2006). Ocelot (*Leopardus pardalis*) predation on Agoutis (*Dasyprocta punctata*), Panamá, Ancón: Biotrópica. Recuperado el 15 de enero de 2014, de http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F32251362_Ocelot_%28Leopardus_Pardalis%29_Predation_on_Agouti_%28Dasyprocta_Punctata%29%2Ffile%2F79e415093ec71995d5.pdf&ei=c9mZU6JNi7ewBOXogYgJ&usg=AFQjCNFTtS_QagBqzqDni7WjFBIPf47dWg&sig2=ZcECorn5t8amGQwLvZxShg
- Aquicito. (2014). Guía Turística de las Parroquias del Distrito Metropolitano de Quito. Ecuador, Quito: Quito Turismo. Recuperado el 12 de febrero de 2014, de [www.Quito.com.ec/parroquias/index.php?option=com_content & view=section&id=12&Itemid=19](http://www.Quito.com.ec/parroquias/index.php?option=com_content&view=section&id=12&Itemid=19)
- Assays, A. (2011). Detectx 17 β -Estradiol Enzyme Immunoassay kit. USA, Michigan: Arbor Assays. Recuperado el 13 de febrero del 2014, de <http://www.arborassays.com/documentation/inserts/K030-H.pdf>
- Biji, T., Kurien, N., Everds & Scofield., R. (2004). Recolección experimental de orina en animales. España, Madrid: Sociedad Española para las ciencias del animal de laboratorio. Recuperado el 30 de diciembre de 2012, de <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.unav.edu%2Fdepartamento%2Fexperimentacion-animal%2Ffiles%2Ffile%2FORina.pdf&ei=c->

CZU7GUJKmrsQSw4IGoCg&usg=AFQjCNE6SUD-
QNoaJ52cHLHsO0dLU1jog&sig2=-Q-CWWd55vRJQ-6KGgBwHA

Bowles, M. Lorenz, M. (2013). Cambios de coloración de la orina. España, Bilbao: Berri librería médica. Recuperado el lunes 6 de junio de 2014, de <http://www.berri.es/pdf/DIAGNOSTICO%20DIFERENCIAL%20EN%20PEQUE%C3%91OS%20ANIMALES/9788496344488>

Brown, J. (2006). Comparative endocrinology of domestic and non-domestic felids. (1ª.ed.) España, Madrid: Fundación Biodiversidad.

Campuzano, G., Arbeláez, M. (2007). El uroanálisis: el gran aliado del médico. Colombia, Medellín: Urología Colombiana.

Ceballos, G., Rurik, L., Medellín, R., Bonacic, C., Pacheco, J. (2010). "Los Felinos de América": Cazadores Sorprendentes. (1ª. ed.). México, México D.F: Telmex

Chew, D., DiBartola, S. (1998). Interpretación del Uroanálisis Felino. (1ª. ed.). Estados Unidos, Wilmington: Purina.

Convención sobre el Comercio Internacional de Especies amenazadas de fauna y flora silvestre. (2013). Apéndices I, II y III en vigor a partir del 12 de Junio de 2013. Suiza, Ginebra: CITES. Recuperado el 15 enero del 2014, <http://www.cites.org/sites/default/files/esp/app/2013/S-Appendices-2013-06-12.pdf>

Definición, ABC. 2014. Definición de degradación. Recuperado el 23 de agosto de 2014. <http://www.definicionabc.com/general/degradacion.php>

- Emmons, L.H., Sherman, P., Bolster, D., Goldizen, A. y Terborgh, J. (1989). Ocelot behavior in moonlight. (1ª.ed.). USA, Gainesville: Sandhill Crane Press
- Emmons, L.H. (1987). Comparative feeding ecology of felids in a Neotropical rainforest. Behavioral Ecology and Sociobiology. (1ª.ed.). USA, Washington D.C: Smithsonian Institution
- Erbamannheim. (2010). Diagnostic test stripes Uro-dip 10e for urine analysis. Alemania, Mannheim: ERBA diagnostics
- Feldman, C., Nelson, R. (2000) Reproducción de gatos, endocrinología y reproducción en perros y gatos. (2ª. ed.). México, México DF: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Feline Conservation. (2011). Ocelot. USA: Feline Conservation Federation. Recuperado el 30 de diciembre de 2012, de <http://www.felineconservation.org/FCF-Youth-Education/Cat-Facts-Series/Ocelot.pdf>
- Guayllabamba. (2014). Ecuador, Quito: Guayllabamba net. Recuperado el 15 de marzo de 2014. <http://www.guayllabamba.net/index.php/parroquia/situacion-geografica>
- Guía Salud. (2012). Conservación y transporte de la muestra de orina. Recuperado el 11 de junio de 2014, de http://www.guiasalud.es/egpc/ITU/resumida/documentos/apartado04/diagnostico_biologico.pdf
- IDEXX VetLab. (2006). Urine Collection Methods. USA, Westbrook: IDEXX Laboratories. Recuperado el 17 de marzo de 2014, de

http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/smallanimal/vetlab/ua/urine-collection-methods.pdf

Jewgenow, K., Goritz, F., Vargas, A. y Dehnhard, M. (2009). Seasonal Profiles of Ovarian Activity in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) Based on Urinary Hormone Metabolite Analyses. Department for Reproduction Biology (IZW). Berlin, Germany, Berlin: Leibniz-Institute for Zoo and Wildlife Research

Lönnberg, E. (1913). Mammals from Ecuador and related forms. Sweden, Stockholm: Arkiv für Zoologi

Macdonald, D. & Loveridge, A. (2011). Biology and Conservation of Wild Felids. USA, New York: Oxford University Press.

Mansard, P. (1990). Breeding an ocelot kitten at Ridgeway trust. UK, London: Ratel.

Mansard, P. (1991). Ocelot in Management guidelines for exotic cats. UK, London: Association of British Wild Animal Keepers, Bristol.

Medicin ABC. (2012). El análisis de orina. Recuperado el lunes 6 de junio de 2014. <http://www.medicinabc.com/2012/11/el-analisis-de-la-orina.html#axzz34BuurjsQ>

Miller, B. y Rabinowitz, A. (2002). ¿Por qué conservar al jaguar? México, México DF: Universidad Nacional Autónoma. Recuperado el 15 de mayo de 2014, de http://www.panthera.org/sites/default/files/Miller_Rabinowitz_2002_Porqueconservaraljaguar.pdf

Ministerio del Ambiente. (2014). Protege Ecuador, la responsabilidad es de todos. Ecuador: Ministerio del Ambiente. Recuperado el 13 de enero del 2014, de <http://www.ambiente.gob.ec/11699/>

Ministerio del Ambiente. (2014). Sistema único de información ambiental. Ecuador: SUIA. Recuperado el 13 de enero de 2014, <http://web.ambiente.gob.ec/?q=node/59>

Mundo animalia. (2008). El embarazo psicológico. Grupo intercom. Recuperado el 16 de agosto de 2014, http://www.mundoanimalia.com/articulo/el_embarazo_psicologico_la_pseudogestacion_

Morais, R., Moreira, W., Mucciolo, R., Lacerda, O., Gomes, M., Swanson, W., Graham, L., y Brown, J. (1996). Testicular and ovarian function in South American small felids assessed by fecal steroids. (1ª. Ed.). USA, White oak: Proceedings of American Association of Zoo Veterinarians Congress

Moreira, N., Monteiro-Filho, E., Moraes, W., Graham, L., Pasquali, O., Gomes, M., Moraes, R., Brown, J. (2001). Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus, Brasil: Zoo Biology, recuperado el 28 de diciembre de 2012, de http://www.researchgate.net/publication/229523160_Reproductive_steroid_hormones_and_ovarian_activity_in_felids_of_the_Leopardus_genus/file/72e7e5161a78525dbe.pdf

Moreno, R., Ricardo, S., Samudio, R. (2006). Competitive Release in diets of ocelot (*Leopardus pardalis*) and puma (*Puma concolor*) after jaguar (*Panthera onca*) decline. Panamá: Journal of Mammalogy. Recuperado el 30 de diciembre de 2012, de [www.researchgate.net/publication/32251446_Competitive_Release_in_Diets_of_Ocelot_\(Leopardus_Pardalis\)_and_Puma_\(Puma_Concolor\)_After_Jaguar_\(Panthera_Onca\)_Decline/file/79e415093ec716ea29.pdf](http://www.researchgate.net/publication/32251446_Competitive_Release_in_Diets_of_Ocelot_(Leopardus_Pardalis)_and_Puma_(Puma_Concolor)_After_Jaguar_(Panthera_Onca)_Decline/file/79e415093ec716ea29.pdf)

- Moreno, R., Kays, R., Giacalone-Willis, J. Aliaga-Rossel, E., Mares, R. y Bustamante, A. (2012). *Ámbito de Hogar y actividad circadiana del ocelote (Leopardus pardalis)*. Panamá, Universidad de Panamá: Mesoamericana
- Murray, J y Gardner, G. (1997). *Leopardus pardalis*. *Mammalian Species*. USA, Georgia: American Society of Mammalogists. Recuperado el 27 de marzo de 2014, de <http://www.science.smith.edu/msi/pdf/i0076-3519-548-01-0001.pdf>
- My Assays. (2014). *Analysis Software Solutions*. Recuperado el 11 de junio de 2014, de <http://www.myassays.com/home.aspx>
- Oliveira, T., Cassaro, K. (2005). *Guía de campo dos felinos do Brasil*. Brasil, São Paulo: Instituto Pró-Carnívoros.
- Olivera, F. (2010). *Revisão taxinômica do genero Leopardus Gray 1842*. Sao Paulo: Universidad de Sao Paulo. Recuperado el 24 de febrero del 2014, de http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=12&ved=0CDMQFjABOAO&url=http%3A%2F%2Fwww.teses.usp.br%2Fteses%2Fdisponiveis%2F41%2F41133%2Fde-09122010-104050%2Fpublico%2FFO_Nascimento.pdf&ei=XSZwU8XrFsnKsASl-4G4Cg&usg=AFQjCNFpl1P2ATk9yqPeZMytjoADhyYV4g&sig2=wZ4d6rprZhQg1Vis3oe6wQ&bvm=bv.66111022,d.cWc&cad=rja
- Phoenix Zoo. (2014). *Ocelot*. USA, Phoenix: Phx Zoo. Recuperado el 23 de Febrero de 2014, de <http://edventures.phoenixzoo.org/pdf/animalFactSheets/ocelot.pdf>
- Quito Zoo. (2014). *Ocelote*. Ecuador, Quito: Quito Zoo. Recuperado el 12 de febrero de 2014. <http://www.quitozoo.org/index.php/zoo/animales>

- Rosero, J., Ospina, R., Nestor, F. (2011). Planes de manejo para la conservación de 16 especies focales de vertebrados en el departamento del Valle del Cauca. (1ª.ed.). Colombia, Cali: Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC.
- Radim Diagnostics. (2013). Sirio S Elisa microplate reader. Italia, Roma: Radim Diagnostics. Recuperado el 10 de junio de 2014. <http://www.radim.com/SchedaProdotto.aspx?idCont=2824>
- Rodrigues, R. y Barnabe, R. (2010). Wildlife Cats Reproductive Biotechnology, management and conservation. Germany, Saarbrucken: VDM. Verlag Dr. Muller.
- Rosamond Gifford Zoo. (2007). Ocelot. USA, Syracuse: Rosamond Gifford Zoo at Burnet Park. Recuperado el 15 de marzo de 2014, de <http://www.rosamondgiffordzoo.org/assets/uploads/animals/pdf/Ocelot.pdf>.
- Sanderson & Watson. (2011). Small wild cats: the animal answer guide. (1ª.ed.). USA, Baltimore: The John Hopkins University Press
- Stornelli, MA. (2007). Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. Brasil, Belo Horizonte: Rev Bras Reproduction Animal
- Sundquist, M. y Sundquist, F. (2002). Wild cats of the world. USA, Chicago: The University of Chicago Press.
- Sunquist, M. y Sunquist, F. (2009). Family Felidae (Cats) Handbook of the Mammals of the World. España, Barcelona: Ediciones, Barcelona.
- Swanson, W., Howard, J., Roth, T., Brown, J., Alvarado, T., Burton, M., Stanes, D., Wildt, D. (1996). Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-

thawed spermatozoa in ocelots. Usa, Dallas: Journal of Reproduction & Fertility.

Tebet, J. (1999). Aspectos clínicos e fisiológicos do ciclo estral da jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Brasil, San Pablo: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Tewes, M. (1986). *Ecological and behavioral correlates of ocelots' spatial patterns*. USA, Moscow: University of Idaho.

Tirira, D. (2001). Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador. (1ª.ed.). Ecuador, Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador y UICN.

Tirira, D. (2011). Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador. (2ª.ed.). Ecuador, Quito: Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador.

U.S. Fish & Wildlife Service. (2010). The ocelot. USA, Arlington: U.S. Fish and Wildlife Service Endangered Species Program. Recuperado el 20 de diciembre de 2013, de <http://www.fws.gov/endangered/esa-library/pdf/ocelot.pdf>

UICN. (2014). Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Suiza: IUCN Red List. Recuperado el 3 de marzo de 2014, de <http://jr.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>

Varela, N. (2009). Aspectos básicos del manejo médico de los pequeños felinos del neotrópico. Colombia, Cali: Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre

WAZA. (2011). Towards sustainable population management. (Vol 12). Switzerland, Gland: WAZA office IUCN center.

- WAZA. (2005). Building a Future for Wildlife - The World Zoo and Aquarium Conservation Strategy. Switzerland: WAZA Executive office. Recuperado el 17 de febrero de 2014, de http://www.waza.org/files/webcontent/1.public_site/5.conservation/conservation_strategies/building_a_future_for_wildlife/wzacs-en.pdf
- Wildlife, T. (2010). Valley Cat: Ocelot Conservation and Recovery in South Texas. San Antonio: Texas Wildlife Association. Recuperado el 15 de febrero de 2014, de http://ckwri.tamuk.edu/fileadmin/user_upload/PHOTOS/News_Articles/TWA_ocelot.pdf
- Wildt, D., Howard, J., Pelican, K., Brown, J. y Pukazhenth, B. (2009). Contributions of reproductive science to wild felid conservation. (1ª.ed.) España, Madrid: Fundación Biodiversidad.
- World Animal Foundation. (2013). Ocelot fact sheet. USA, Kentucky: World Animal Foundation. Recuperado el 30 de diciembre de 2012, de <http://www.worldanimalfoundation.net/f/Ocelot.pdf>
- Wozencraft, W. (2005). Order Carnivora. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. (3ª.ed). USA: Johns Hopkins University Press.
- Yáñez, Patricio. (2007). Biometría y Bioestadística Fundamentales. Ecuador, Quito. Universidad Politécnica Salesiana.

ANEXOS

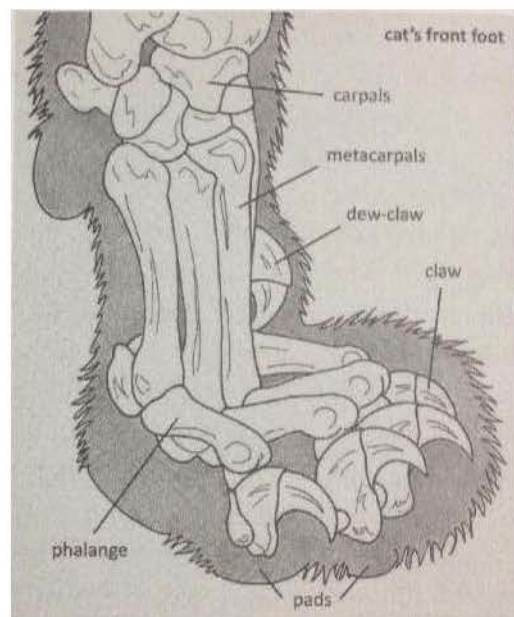
ANEXO 1. Tigrillo

Tomado de Ceballos et al. Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes. 2010, p. 35

ANEXO 2. Margay

Tomado de Ceballos et al. Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes. 2010, p. 169

ANEXO 3. Garras retráctiles de pequeños felinos

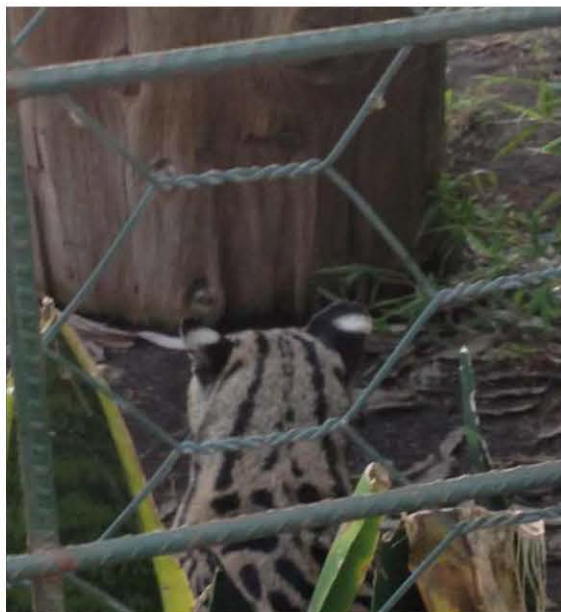


Garra retráctil delantera, formada por 5 dedos. Tomado de Sanderson & Watson. Small wild cats, the animal answer guide. 2011, p.28

ANEXO 4. Características morfológicas



Es de gran tamaño, y su pelaje hermoso varía de coloración. Tomado de Ceballos et al. Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes. 2010, p. 180

ANEXOS 5. Puntos denominados ocelos en la base de las orejas

Tomado de Ceballos et al. Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes.
2010, p. 214

ANEXO 6. Patrón de coloración en *Leopardus pardalis*

Patrón de coloración en *Leopardus pardalis* izquierda macho *Leopardus pardalis albescens*, Sinaloa México, derecha *Leopardus pardalis mitis*. Tomado de Olivera, Revisión taxonómica de *Leopardus*, 2010, p.72

ANEXO 7. Color de la capa del cuello y vientre.

Color blanco de cuello y vientre y además posee barras transversas en la parte interior de las patas traseras. Tomado de Ceballos et al. Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes. 2010, p. 183

ANEXO 8. Hábitat del ocelote

Descansa escondido entre la cubierta densa. Vive en las selvas secas y húmedas. Tomado de Ceballos et al. Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes. 2010, p. 180

ANEXO 9. Gran trepador**ANEXO 10. Descanso en su periodo diurno**

ANEXO 11. Especie Emblemática

Tomada de Tirira, D. Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador. 2001, portada.

ANEXO 12. Comportamiento de los ocelotes

ANEXOS 13. Alimentación

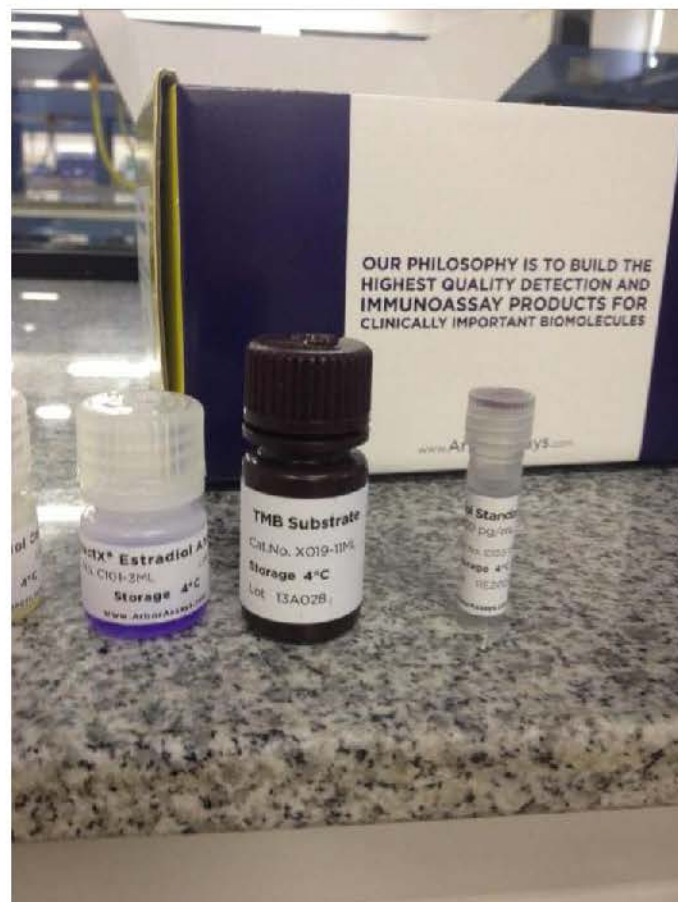
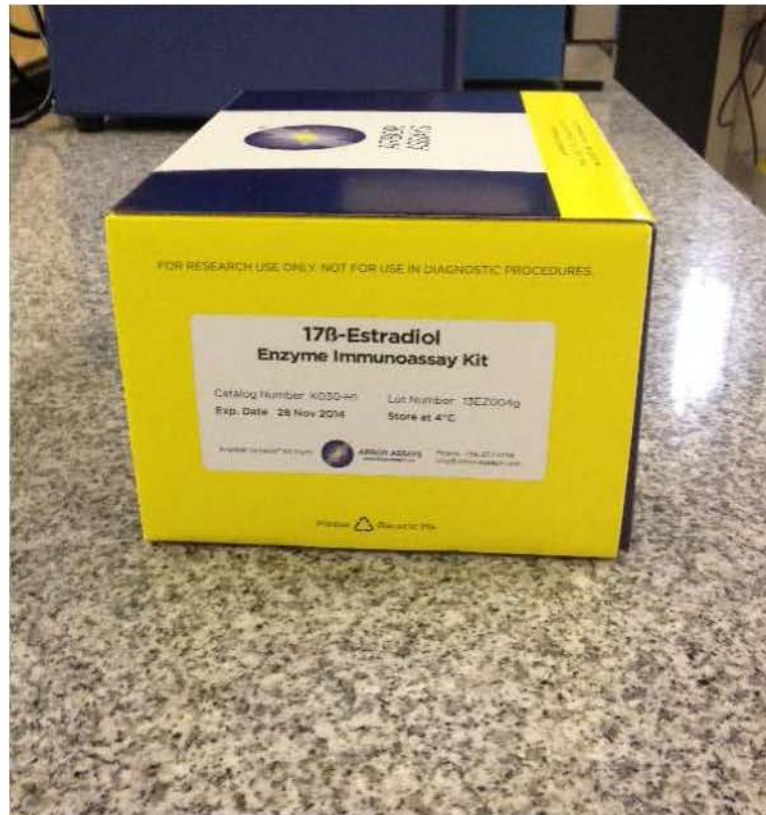
Su destreza le permite realizar movimientos muy diversos para capturar una gran variedad de presas como, monos, conejos, ratones, murciélagos, lagartos, aves, cangrejos y peces. Tomado de Ceballos et al. *Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes*. 2010, p. 182



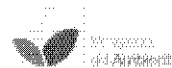
Ocelote alimentándose de iguana. Tomado de Ceballos et al. *Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes*. 2010, p. 181

ANEXOS 14. Nacimiento de gatito ocelote.

El camino de un gatito ocelote es muy difícil debe sortear muchos obstáculos como cazadores, vehículos, depredación por otros carnívoros y enfermedades. Tomado de Ceballos et al. Los Felinos de América: Cazadores Sorprendentes. 2010, p. 166

ANEXOS 15. Estradiol Kit EIA

ANEXO 16. Autorización de investigación científica provista por parte del Ministerio del Ambiente



DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE
PICHINCHA

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

N° 01 - 2014 - IC - FAU - DPAP - MA
Quito, 03 de enero de 2014

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a Joel Jhonatan Jara Martínez, con C.G. No. 171559598-6, de nacionalidad ecuatoriana, y a Jorge Leonardo Arias, C.C. 1706591441, de nacionalidad ecuatoriana, para que lleven a cabo la investigación titulada "Identificación de los niveles de estrógenos y degradación física de la orina de ocelote hembra (*Leopardus pardalis*) en cautiverio en el Zoológico de Guayllabamba - Pichincha. De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de autorización de extracción e investigación de Joel Jhonatan Jara, mediante Oficio de 18 de Noviembre de 2013.
2. Valoración técnica del proyecto: Ing. Diego Morillo G.
3. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Dirección Provincial del Ambiente Pichincha, Unidad de Patrimonio Natural.
4. Complementos autorizados de la investigación: Se autoriza la toma de muestras de orina de los ocelotes durante tres meses, en intervalos de 2 a 3 veces por semana, mediante el método de recolección utilizando un contenedor Siji, ubicados en sitios estratégicos de las jaulas de los mencionados. Los animales en estudio serán 3 ocelotes hembra de 5 a 6 años de edad, la cantidad de muestras de orina que se autoriza son 18.
5. Duración: Desde 03 de Enero 2014, hasta 03 de Enero de 2015, de acuerdo al cronograma de trabajo establecido.
6. Obligaciones de los investigadores:
 - a. ENTREGAR UNA COPIA IMPRESA (EN AMBAS CARAS), Y UNA DIGITAL DE LOS RESULTADOS FINALES DE LA INVESTIGACIÓN, EN CASTELLANO INCLUYENDO LA LOCALIZACIÓN EXACTA (COORDENADAS UTM) DE LOS ESPÉCIMENES COLECTADOS Y OBSERVADOS, COPIA DE LAS FOTOGRAFÍAS, GRABACIONES Y OTROS DOCUMENTOS PRODUCTO DE LA MISMA.
 - b. EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME FINAL VENCE EL 03 DE ENERO DE 2015.
7. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el párrafo anterior se responsabiliza a Joel Jhonatan Jara Martínez y a Jorge Leonardo Arias.

Afectamente,

Ing. Guillermo Santiago Tapia Noboa
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA

ANEXOS 17. Hábitat Artificial



ANEXOS 18. Jaulas

- **Interior de las jaulas:**



ANEXOS 19. Recolección de las muestras



ANEXOS 20. Otros materiales para colecta de orina

- **Lavacaras con malla mosquitero**



- **Recolector de orina de acero inoxidable**

ANEXOS 21. Urianálisis y urocultivos



Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
 Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
 e-mail: resultados@livex.com.ec
 Quito-Ecuador

INFORME DE RESULTADOS

CASO:	O-1918 A	NOMBRE PACIENTE:	Salome
CLIENTE:	Jonathan Jara	MUESTRAS:	Orina
DIRECCION DEL CLIENTE:	La Rumiñahui	ESPECIE:	Felina
		RAZA:	Ocelote
		SEXO:	Hembra
		EDAD:	8 años
		TELEFONO:	22475312
		RESPONSABLE:	P. Cabezas
		CONDICIONES AMBIENTALES DE ENSAYO:	18 ° C – 25 ° C

URIANÁLISIS

METODO DE OBTENCIÓN: No informa

ELEMENTAL:

Color	Ámbar
Aspecto	Turbio 2+
pH	7.0
Densidad	>1.050
Proteínas	0.3 g/L
Glucosa	-
Cuerpos cetónicos	-
Bilirrubina	-
Urobilinógeno	-
Sangre	-

MICROSCOPICO:

Leucocitos	0 / campo (400x)
Eritrocitos	0 / campo (400x)
Células renales	0 / campo (400x)
Células transitorias	0-1 / campo (400x)
Células escamosas	2-4 / campo (400x)
Cilindros	0 / campo (400x)
Cristales	Fosfatos amorfos 2+
Bacterias	Tipo Mixta 1+
Lípidos	1+
Otros	-



Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
 Telf: 2411-837 / 095003160 Fax: 2412-494
 e-mail: resultados@livex.com.ec
 Quito-Ecuador

INFORME DE RESULTADOS

CASO:	O-1818 A	NOMBRE PACIENTE:	Salome
CLIENTE:	Jonathan Jara	MUESTRAS:	Orina
DIRECCIÓN DEL CLIENTE:	La Rumiñahu	ESPECIE:	Felina
		RAZA:	Ocelote
		SEXO:	Hembra
		EDAD:	9 años
		TELÉFONO:	2475312
		RESPONSABLE:	P. Cabezas
		CONDICIONES AMBIENTALES DE ENSAYO:	18° C – 25° C
Tratamientos antes de la toma de muestra: NR			

URIANÁLISIS

METODO DE OBTENCIÓN: No informa

ELEMENTAL:

Color	Ámbar
Aspecto	Turbio 2+
pH	7.0
Densidad	>1.050
Proteínas	0.3 g/L
Glucosa	-
Cuerpos cetónicos	-
Bilirrubina	-
Urobilinógeno	-
Sangre	-

MICROSCOPICO:

Leucocitos	0 / campo (400x)
Eritrocitos	0 / campo (400x)
Células renales	0 / campo (400x)
Células transitorias	0-1 / campo (400x)
Células escamosas	0-2 / campo (400x)
Cilindros	0 / campo (400x)
Cristales	Fosfatos amorfos 2+
Bacterias	Tipo Mixta escasas
Lípidos	1+
Otros	-



Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
 Telf: 2411-837 / 095003100 Fax: 2412-494
 e-mail: resultados@livex.com.ec Quito-Ecuador

INFORME DE RESULTADOS

CASO:	C-1918 A	MUESTRAS:	Orina
CLIENTE:	Jhonatan Jara	ESPECIE:	Felino
DIRECCION DEL CLIENTE:	La Rumiñahui	RAZA:	Tigrillo
CLINICA VETERINARIA:	No Informa	SEXO:	H
DIRECCION DE LA CLINICA:	Pichincha- Quito- La Rumiñahui	EDAD:	9 Años
TELEFONO:	02475312		
MEDICO REMITENTE:	No Informa	RESPONSABLE:	C. Montaño
		CONDICIONES AMBIENTALES DE ENSAYO:	18 ° C – 25 ° C

Pruebas Solicitadas: Urocultivo	Tratamientos antes de la toma de muestra: NR
---------------------------------	--

Prueba:	UROCULTIVO	Método:	CULTIVO (LVX / MAL/ 045-00)
---------	------------	---------	-----------------------------

IDENTIFICACIÓN: O-1918-01-A-SALOME

MÉTODO DE OBTENCIÓN: NR

ANAMNESIS: No Informa

RESULTADO

Sin desarrollo bacteriano en 72 horas de incubación

ANTIBIOGRAMA

No justifica

*Este informe no podrá ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación de la Gerencia.

*NOTA: ESTE RESULTADO ES ÚNICAMENTE VALIDO PARA LA MUESTRA EXAMINADA



Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
 Telf: 2411-837 / 095003100 Fax: 2412-494
 e-mail: resultados@livex.com.ec Quito-Ecuador

INFORME DE RESULTADOS

CASO:	C-1918 B	MUESTRAS:	Orina
CLIENTE:	Jhonatan Jara	ESPECIE:	Felino
DIRECCION DEL CLIENTE:	La Rumiñahui	RAZA:	Tigrillo
CLINICA VETERINARIA:	No Informa	SEXO:	H
DIRECCION DE LA CLINICA:	Pichincha- Quito- La Rumiñahui	EDAD:	5 Años
TELEFONO:	02475312		
MEDICO REMITENTE:	No Informa	RESPONSABLE:	C. Montaño
		CONDICIONES AMBIENTALES DE ENSAYO:	18 ° C – 25 ° C

Pruebas Solicitadas: Urocultivo	Tratamientos antes de la toma de muestra: NR
---------------------------------	--

Prueba:	UROCULTIVO	Método:	CULTIVO (LVX / MAL/ 045-00)
---------	------------	---------	-----------------------------

IDENTIFICACIÓN: O-1918-01-B-CLEO

MÉTODO DE OBTENCIÓN: NR

ANAMNESIS: No Informa

RESULTADO

Sin desarrollo bacteriano en 72 horas de incubación

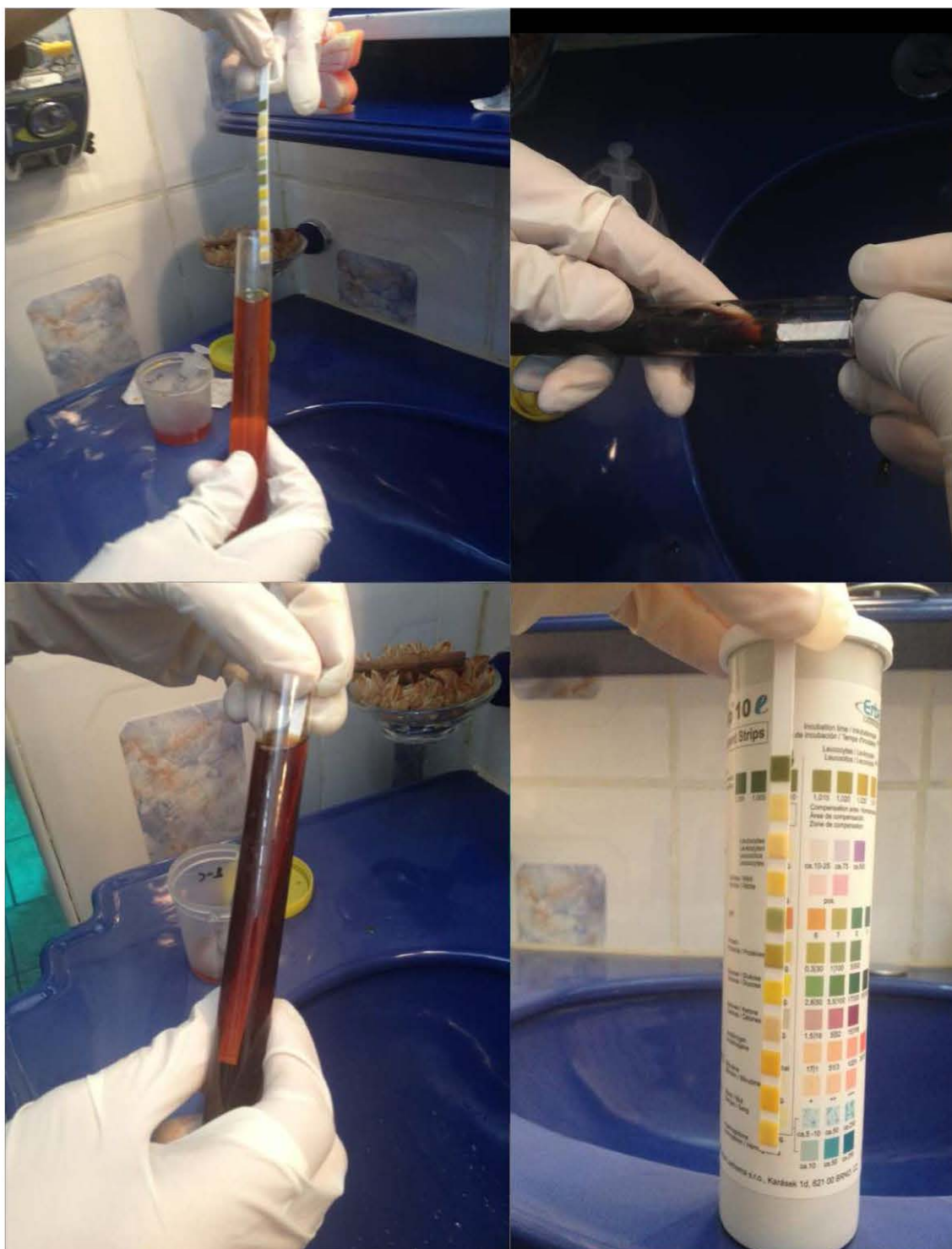
ANTIBIOGRAMA

No justifica

*Este informe no podrá ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación de la Gerencia.

*NOTA: ESTE RESULTADO ES ÚNICAMENTE VALIDO PARA LA MUESTRA EXAMINADA

ANEXOS 22. Medición de urobilinógeno, pH y nitritos mediante la tira reactiva de orina cuando cambia de coloración



ANEXOS 23. Componentes del Kit Estradiol



ANEXOS 24. Trabajo de Laboratorio

