



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



INDICE

1. Resumen/abstract.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 El rinoceronte blanco.....	2
2.1.1 Situación del rinoceronte blanco en la naturaleza.....	3
2.1.2 Conservación en cautividad del rinoceronte blanco.....	4
2.1.3 Biología.....	4
2.2 Enriquecimiento ambiental.....	5
2.2.1 Conceptos y clasificación.....	5
2.2.2 Medición/valoración de la eficacia del enriquecimiento.....	9
2.3 Hormonas esteroides.....	10
2.3.1 Síntesis, regulación y metabolismo de las hormonas esteroides.....	10
2.3.2 Fisiología de los glucocorticoides.....	12
2.3.3 Fisiología de las hormonas sexuales.....	13
2.3.4 Métodos no invasivos para la medición de hormonas esteroides.....	14
3. Justificación y objetivos.....	15
4. Metodología.....	16
4.1 Rómulo.....	16
4.1.1 Alojamiento 1.....	17
4.1.2 Alojamiento 2.....	17
4.2 Recogida de muestras.....	18
4.3 Procesamiento de muestras fecales.....	18
4.4 Análisis hormonal.....	20
4.5 Análisis estadístico.....	21
5. Resultados y discusión.....	22
5.1 Cortisol.....	22
5.2 Testosterona.....	24
5.3 Progesterona.....	25
5.4 Sulfato estrona.....	26
6. Conclusiones/Conclusions.....	27
7. Valoración personal.....	29
8. Agradecimientos.....	29
9. Bibliografía.....	30

1. RESUMEN

El nivel de enriquecimiento ambiental influye en el comportamiento y en la secreción hormonal de los animales, así, durante las últimas décadas se ha visto incrementado el empleo de diferentes técnicas de enriquecimiento ambiental en cautividad para tratar de mejorar el bienestar psicológico y fisiológico de los animales. De acuerdo a esto, el objetivo del presente estudio fue comparar los niveles fecales de cortisol (C), testosterona (T), progesterona (P4) y sulfato estrona (E1) de un rinoceronte blanco alojado en dos instalaciones diferentes: alojamiento 1, en el cual el animal mostraba una marcada estereotipia de marcha en círculos; y alojamiento 2, más grande y con agrupación social, donde la estereotipia desapareció. Para ello se determinó la relación entre la endocrinología gonadal, la adrenal y la desaparición de un comportamiento estereotipado. Los niveles de C, T, P4, y E1 fueron evaluados mediante enzimoinmunoanálisis en muestras de heces que se recogieron en cada alojamiento y se congelaron hasta su análisis. Los niveles de C fecal fueron significativamente más bajos en el alojamiento 2 ($p<0.05$), mientras que los niveles de T fueron significativamente más altos ($p<0.05$). No existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de P4 y E1 fecales. En base a estos resultados, podemos concluir que el enriquecimiento ambiental proporcionado (agrupación social e instalación de mayores dimensiones y mayor cantidad de mobiliario) permitió la desaparición del comportamiento estereotipado y, por consiguiente, el descenso de la secreción de C. El incremento de los niveles de T podría deberse a la restauración de la función gonadal después de perder la supresión del eje hipotálamo-hipófisis por el aumento de los niveles de C obtenidos en el alojamiento 1. Por tanto, hemos podido constatar que las mejoras en las condiciones de manejo de este espécimen fueron cruciales para reducir su estrés y, como consecuencia, mejorar su bienestar.

PALABRAS CLAVE: *Enriquecimiento Ambiental, Estereotipia, Ceratotherium simum, Fisiología del Estrés, Hormonas Esteroides, Cortisol Fecal.*

Abstract

Influence of the housing conditions in the behavior and hormonal secretion of a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*).

The level of environmental enrichment influences the behavior modifying the hormonal secretion in animals. Different techniques of enrichment have been widely used in captivity to improve the psychological and physiological wellbeing of the animals, such as

keeping animals in group structures that mimic their wild groups in order to improve socialisation, and providing larger enclosures to allow for more locomotion. Considering this, the aim of this study was to compare the fecal levels of cortisol (C), testosterone (T), progesterone (P4) and oestrone sulphate (E1) of a white rhinoceros housed in two different enclosures (enclosure 1, in which he had a marked stereotype; and enclosure 2, larger and with social grouping, where the stereotype disappeared) to determine the relationship between the gonadal and adrenal endocrinology and the disappearance of the stereotyped behavior (circling). C, T, P4, and E1 were determined by enzyme-immunoassays in feces, previously validated for this species. Fecal samples were collected early in the morning and were frozen until analysis. The levels of C were significantly lower in enclosure 2 than in enclosure 1 ($p<0.05$), while the levels of T were significantly higher in enclosure 2 ($p<0.05$). There weren't statistical differences in P4 and E1 levels. In light of these results, the environmental enrichment (social grouping and larger enclosure) provided to this animal led to a disappearance of the stereotyped behavior and subsequently a decrease in the C secretion. The increase of fecal T levels observed could be the consequence of a restoration of the normal gonadal function after loss of hypothalamus-hipofisis suppression by increased levels of C shown in enclosure 1. Therefore, we can conclude that the improvements in the management conditions of this specimen were crucial to decrease the stress of this animal and, for that reason, to increase his welfare.

KEYWORDS: Environmental Enrichment, Stereotype, *Ceratotherium simum*, Stress physiology, Steroid Hormones, Fecal Cortisol.

2. INTRODUCCION

2.1 El rinoceronte blanco

El rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) es un mamífero perisodáctilo de la familia *Rhinocerotidae*. Es una de las dos especies de rinocerontes que viven en la sabana africana, junto con el rinoceronte negro (*Diceros bicornis*). Se reconocen las siguientes subespecies:

- Rinoceronte blanco del norte (*Ceratotherium simum cottoni*)
- Rinoceronte blanco del sur (*Ceratotherium simum simum*), del cual trata este estudio.

Ceratotherium proviene del griego *cerato*, que significa “cuerno”, y *therium*, que significa “bestia salvaje”. *Simum* también proviene del griego *simus*, y significa “nariz chata” (Metrione y Eyres, 2014).

2.1.1. Situación del rinoceronte blanco en la naturaleza

La UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) es la organización medioambiental internacional más antigua y más grande del mundo. Trabaja en el campo de la conservación de la naturaleza y el uso sostenible de los recursos naturales y ha evaluado el estado de conservación de especies, subespecies, variedades e incluso subpoblaciones seleccionadas a escala mundial durante los últimos 50 años para destacar taxones en peligro de extinción, y de ese modo promover su conservación.

La Lista Roja de Especies Amenazadas ™ de la IUCN es el inventario más completo del estado de conservación de plantas y hongos a nivel mundial. Brinda información conservación y distribución de plantas, hongos y micromoluscos mundialmente utilizando las Categorías y Criterios de la IUCN (<http://www.iucnredlist.org>).

El rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) se encuentra clasificado en la Lista roja de la UICN como Casi amenazado (NT, del inglés *Near Threatened*). La razón para catalogar a esta especie como Casi amenazada y no como Preocupación menor se debe a la continua y creciente amenaza de la caza furtiva y de la demanda ilegal de su cuerno, y a una mayor participación de grupos criminales internacionales organizados en la caza furtiva de rinocerontes. Las medidas de protección actuales y su éxito han dependido del esfuerzo por mantener a la especie en este rango, y si éstas disminuyen (especialmente en Sudáfrica) la caza furtiva desenfrenada podría amenazar seriamente a la población del rinoceronte (disminuyendo más del 30% en tres generaciones). Además, la disminución de los presupuestos estatales para la conservación, la disminución de la posibilidad de actuación en algunas áreas y el aumento de los asiáticos en su área de distribución son motivo de preocupación.

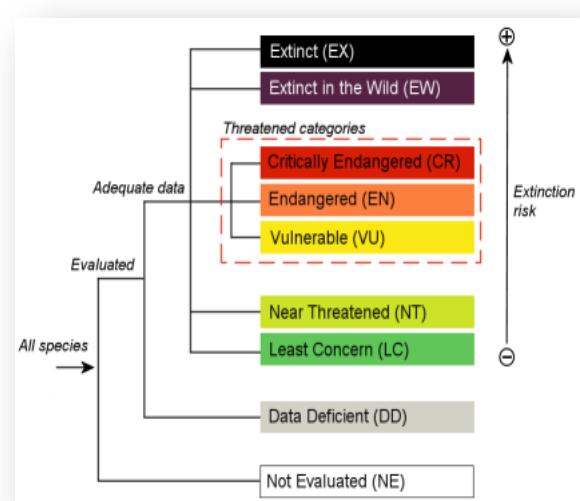


Figura 1. Esquema de la clasificación por categorías de la Lista Roja de la UICN. (Fuente: <http://www.iucnredlist.org>)

	2010	2015
Sudáfrica	18.796	18.413
Namibia	469	822
Kenia	361	441
Zimbabue	290	330
Botsuana	135	239
Suazilandia	88	76
Zambia	7	10
Uganda	9	15
Mozambique	6	29
TOTAL	20.161	20.375

En los últimos años, los niveles de caza furtiva han aumentado en los principales estados dentro del área de distribución Sudáfrica, Zimbabwe y Kenia (el 98,8% de la población del rinoceronte blanco está en Sudáfrica, Zimbabwe, Kenia y Namibia). En ausencia de medidas de conservación, la especie alcanzaría rápidamente en cinco años el umbral de Vulnerable (Emslie, 2012).

2.1.2 Conservación en cautividad del rinoceronte blanco

Según la Lista Roja de la UICN, en diciembre de 2008 había una población mundial estimada de 750 ejemplares en cautividad. El rinoceronte blanco está dentro del programa de conservación EEP (Programa Europeo de Especies en Peligro, con sus siglas en inglés) de la EAZA (European Association of Zoos and Aquaria) (Fuente: <http://www.iucnredlist.org>).

La EAZA es la organización de miembros de los principales zoológicos y acuarios de Europa y Medio Oriente, y su misión es facilitar la cooperación dentro de la comunidad europea de zoos y acuarios con el objetivo de mejorar su calidad profesional en el cuidado de los animales y en la educación del público, y contribuir a la investigación científica y la conservación de la biodiversidad mundial. Esta organización actualmente tiene dos niveles diferentes de programas de cría, el European Endangered species Programme (EEP) y el European Studbook (ESB) (Fuente: www.eaza.net).

- **EEP** → El EEP es el tipo más intensivo de manejo de una población de una especie mantenida en los zoológicos de EAZA. Cada EEP tiene un coordinador, el cual realiza la recopilación de información sobre el estado de todos los animales de la especie, la realización de análisis demográficos y genéticos, etc. Junto con el Comité de especies, cada año se dan recomendaciones sobre qué animales deberían reproducirse o no, qué individuos deberían ir de un zoológico a otro, y así sucesivamente.
- **ESB** → El ESB o Libro Genealógico Europeo, es menos intensivo que el programa EEP. El encargado del libro genealógico puede juzgar si le está yendo bien a la especie en los zoológicos y puede proponer que la especie se administre como un programa EEP.

2.1.3. Biología

Comportamiento social y niveles hormonales

El comportamiento animal está influenciado por la actividad hormonal. Los andrógenos son los que tienen el papel más conocido en la conducta de los animales, pues de estos dependen una gran variedad de conductas, como las conductas agresivas, el rango social, o el comportamiento sexual (Rubinow y Schmidt, 1996).

Así, se ha visto que los andrógenos pueden influir en el comportamiento mediante efectos organizadores y/o activadores sobre la agresividad de tipo ofensivo, en la cual se incluyen la agresividad territorial, la agresividad por dominancia o la intraespecífica (Mickzek y Oliver, 1998; Vasadze *et al.*, 2007).

Organización social

En los rinocerontes, los machos dominantes suelen tener concentraciones más elevadas de andrógenos que los machos subordinados (Christensen *et al.*, 2009), sin embargo, no suelen presentar diferencias significativas en cuanto al tamaño corporal (Rachlow *et al.*, 1998). Si el rango social está relacionado con los niveles de andrógenos, esto podría tener alguna consecuencia negativa, ya que, por ejemplo, las concentraciones elevadas de andrógenos pueden comprometer el sistema inmunitario (Wingfield *et al.*, 2001).

Requisitos de recinto en cautiverio

El diseño de las instalaciones para rinocerontes en los zoos requiere el conocimiento de su biología, comportamiento y organización social (Metrione y Eyres, 2014).

Todos los rinocerontes deben tener acceso a charcas o revolcaderos. El acceso y la profundidad de estas charcas debe ser suficiente para alentar su uso y sumergirse por completo. Los elementos que haya en el recinto, como los postes de rascado o rocas, promueven los comportamientos naturales específicos de especie, deben estar diseñados de tal manera que impida que la cabeza o una extremidad pueda quedar atrapada, o que impida el roce o avulsión de los cuernos (Miller y Buss, 2014).

2.2 Enriquecimiento ambiental

2.2.1 Conceptos y clasificación

Los animales en libertad invierten la mayor parte de su tiempo en buscar comida, defender su territorio, rivalizar con otros grupos, construir nidos y refugios, cazar, huir de depredadores, etc. gastando toda su energía en estas actividades. Sin embargo, en los parques zoológicos los cuidados y entorno de los animales resuelven de inmediato la mayoría de estas tareas, provocando que los animales tengan demasiado tiempo libre y un exceso de energía que no saben gestionar. Debido a esto, los animales pueden acabar desarrollando conductas aberrantes que no se darían nunca en libertad, provocándoles estrés, agresión o miedo, disminuyendo su estado de salud tanto físico como psicológico. De aquí surge la necesidad del enriquecimiento ambiental. En la actualidad el enriquecimiento ambiental se considera una práctica indispensable en los zoológicos (Menargues *et al.*, 2006; Schwarzenberger, 2007).

El enriquecimiento ambiental puede definirse como una técnica que pretende mejorar el bienestar físico y psíquico de los animales en cautividad proporcionándoles diferentes estímulos ambientales, los cuales persiguen asemejar las condiciones de sus instalaciones en cautividad a las que tendrían en su hábitat natural, facilitándoles además la expresión de los comportamientos normales en la especie (Manteca, 2015).

El aporte de cualquier estímulo que genere un interés en los animales de manera positiva puede considerarse enriquecimiento, incluyendo objetos naturales y artificiales, nuevos aromas, alimentos distintos o preparados de diferente forma. Aunque existen diferentes clasificaciones, el enriquecimiento ambiental se puede dividir en cuatro categorías, aplicables a muchas de las especies animales que se encuentran en los zoológicos: alimentario, sensorial, estructural y social (Manteca, 2015).

- ***Alimentario***

El objetivo de este tipo de enriquecimiento es el de proporcionar la comida de tal manera que estimule en el animal la conducta de búsqueda del alimento que es propia de la especie, o sea, que le incite a investigar, a manipular y a trabajar para obtenerla, además de para aumentar los niveles de actividad. En la naturaleza, la búsqueda de alimento suele ocupar mucho tiempo, por lo que este tipo de enriquecimiento resultaría de gran importancia. El enriquecimiento de tipo alimentario incluye tanto técnicas de relativa sencillez (como podría ser el esconder en varios puntos de la instalación pequeñas cantidades de alimento) como métodos más sofisticados (como utilizar dispensadores de alimento programables). En un estudio en úrsidos en el que se emplearon dispensadores de comida regulados, se vio que el enriquecimiento alimentario aumentaba el tiempo de búsqueda de alimento para los osos, promovía una gama más amplia de comportamientos y reducía los comportamientos repetitivos en un 50% (Andrews, 2014).

- ***Sensorial***

El enriquecimiento sensorial consiste en estimular los sentidos de los animales mediante el uso de distintos tipos de estímulos olfativos, auditivos y visuales.

- **Olfativo:** Un desafío que enfrentan aquellos que pretenden usar estímulos olfatorios es entender la importancia de los olores para las diferentes especies. Las especies que son similares a los seres humanos dependen más de su vista que del sentido del olfato. Como resultado, el enriquecimiento olfativo no es tan eficaz en los grandes simios, como los chimpancés y los gorilas, como en los animales que utilizan el olor para localizar sus presas, sus parejas o sus alimentos (Wells, 2009). Usar el

enriquecimiento ambiental olfativo en las especies equivocadas sería una pérdida de tiempo y recursos. Por el contrario, usarlo en las especies adecuadas puede tener resultados positivos. Por ejemplo, cuando el perro salvaje africano es expuesto a los olores de la sangre del león, del ganado o de gacela, desarrollan cambios hormonales y de comportamiento por la sangre de la gacela, pero no por la del león o del ganado (Rafacz y Santymire, 2014).

- Auditivo: consiste en el uso de música y en la reproducción de diferentes tipos de sonidos, como pueden ser los sonidos naturales que se escuchan en la naturaleza, o la reproducción del sonido que emite un cierto animal. En un estudio, se grabó y reprodujo el rugido de un león para alentarle a vocalizar más (Kelling *et al.*, 2012). Un efecto secundario por utilizar enriquecimiento ambiental auditivo es el posible efecto negativo sobre los animales que se encuentran dentro del alcance de las grabaciones. Este es el motivo por el que hay que estudiar a parte del efecto de este estímulo sobre el animal en cuestión, sobre los animales más próximos y sobre las personas visitantes. En el estudio antes mencionado, los investigadores también investigaron el efecto en los visitantes y en los ungulados. El incremento en la vocalización del león y el sonido de las grabaciones atrajeron a los visitantes a las instalaciones de los leones haciéndoles pasar períodos de tiempo más largos. Los ungulados dentro del radio de efecto no exhibieron comportamientos negativos durante las reproducciones (Kelling *et al.*, 2012).
- Visual: el uso del enriquecimiento visual en los animales puede ir desde recintos circundantes con follaje, elegir colores que mejoren el estado de ánimo de un animal o utilizar accesorios físicos tales como fotos y espejos (Newberry, 1995; Wells, 2009). Colocar a un animal en un recinto con las paredes de un color erróneo o alimentarlo con la comida de color equivocado puede tener efectos negativos. Muchos animales tienden a tener reacciones negativas al color rojo y reacciones positivas a colores suaves como el azul o el verde. Si los animales pueden ver otros recintos, rodear sus cercados con vegetación no sólo actuará como una barrera a las visiones externas no deseadas, sino que también proporcionará una fuente de enriquecimiento visual en sí mismo y proporcionará una sensación de privacidad. La creación de distracciones y barreras visuales también son efectivas cuando un animal percibe a otro animal como su depredador (Cockrem y Silverin, 2002).

- **Estructural**

Consiste en mejorar el hábitat donde se encuentran los animales proporcionándoles más espacio y/o añadiendo objetos o “mobilario” para aumentar la complejidad del ambiente y tratar de que se parezca más a su hábitat natural. Las posibles formas de enriquecimiento estructural son tan diversas y numerosas como se pueda imaginar. Estos son algunos ejemplos:

- Objetos como pueden ser cuerdas, troncos de árboles o plataformas elevadas permiten a los animales que trepen o que vean más lejos.
- La presencia de ramas, hojas, troncos con huecos... permite que los animales construyan un nido o que encuentren refugio.
- Las barreras visuales hechas con vegetación facilitan a los animales esconderse del público o de un congénere agresivo.
- Diferentes tipos de juguetes estimulan la exploración y el juego.

Para permitir que un animal experimente una locomoción natural, el recinto debe ser lo suficientemente grande horizontal y verticalmente. El espacio vertical es necesario para los animales que usan el desplazamiento a través de los árboles. Esto incluye la mayoría de los simios y especies de monos, además de las aves voladoras, que también necesitan un cierto grado de altura (Reading *et al.*, 2013). En 2010 un estudio con coyotes en tres instalaciones de diferentes tamaños demostró que cuanto mayor es su recinto, más similarmente se comportaron a coyotes silvestres. Además, la respuesta de la frecuencia cardíaca a las actividades también fue afectada por el tipo de recinto: los valores de la frecuencia cardíaca de los coyotes que vivían en espacios más grandes fueron más ajustados a los valores normales que aquellos que vivían en unidades más pequeñas (Brummer *et al.*, 2010).

- **Social**

El bienestar de los animales pertenecientes a especies sociales mejora muy notablemente cuando se alojan en grupo. Las conductas afiliativas incrementan la liberación de oxitocina y reducen la respuesta de estrés. Si el alojamiento en grupo no fuera posible, el contacto visual, olfativo o auditivo con otros individuos de la misma especie puede tener un impacto positivo en algunos animales. Los animales se benefician mucho de estructuras de grupo adecuadas, además, muchos animales jóvenes requieren la dirección y el entrenamiento de figuras parentales más maduras (Reading *et al.*, 2013). La relevancia de la estructuración grupal aumenta en especies que tardan más en

desarrollarse y que son más inteligentes (Reading *et al.*, 2013). Varios trabajos han demostrado los efectos positivos de la interacción con los cuidadores en primates y pequeños felinos, por lo que también se podría considerar como una forma de enriquecimientos ambiental. Mantener una estructura social saludable es más difícil que proporcionar alimentos y enriquecimiento sensorial, además el control de poblaciones es complicado ya puede requerir reubicación de los animales a grandes distancias, lo cual es costoso e implica mayor estrés debido a los procedimientos de sedación (Weingrill *et al.*, 2011).

2.2.2 Medición/valoración de la eficacia del enriquecimiento

Cabe decir que los efectos del enriquecimiento ambiental son variables y que dependen de la técnica utilizada así como de la especie e individuo. Sin embargo, en general el enriquecimiento ambiental tiene resultados positivos sobre el bienestar de los animales. No obstante, la mayoría de estudios acerca de los efectos del enriquecimiento ambiental han considerado las consecuencias a corto plazo, siendo esto una limitación importante puesto que uno de los problemas del enriquecimiento es la habituación de los animales. En cualquier caso, múltiples estudios han descrito los siguientes efectos positivos de los programas de enriquecimiento:

- Reducción de las estereotipias
- Aumento de la actividad general y la conducta exploratoria
- Disminución de la frecuencia e intensidad de las interacciones agresivas
- Disminución de la presencia de algunas enfermedades
- Disminución de la respuesta de estrés crónico asociada a la cautividad
- Aumento del éxito reproductivo

Con el fin de establecer el éxito de estos proyectos de enriquecimiento, los investigadores pueden estudiar el comportamiento del animal y su condición física. Los estudios conductuales observan y registran las acciones llevadas a cabo por los sujetos. Se mide el tiempo que usan en realizar ciertas acciones y se comparan con el de sus homólogos sanos en la naturaleza. Las acciones repetitivas y los comportamientos estereotipados, como los *pacing* (paseos de ida y vuelta), están vistos como algo negativo y son típicos en sujetos que están mentalmente insanos (Brummer *et al.*, 2010; Reading *et al.*, 2013). Como los estudios de comportamiento son en gran medida observacionales, no son financieramente restrictivos. Las condiciones físicas que se estudian se pueden centrar en los indicadores de buena salud/aptitud física, como la frecuencia cardíaca (Brummer, 2010) o los niveles de estrés

medidos por cambios hormonales. Los glucocorticoides se utilizan frecuentemente como medida del estrés. Pueden medirse utilizando inmunoensayos enzimáticos de metabolitos de cortisol fecal (Weingrill *et al.*, 2011).

2.3 Hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas están implicadas en una gran cantidad y variedad de funciones reguladoras de procesos biológicos, entre las que se incluyen la reproducción, la diferenciación, el desarrollo, la proliferación celular, la apoptosis, la inflamación, el metabolismo, la homeostasis, y la función cerebral (Tsai y O'Malley, 1994; Edwards, 2005).

Las hormonas esteroideas son las derivadas de hidrocarburos cílicos y sintetizadas, en todos los casos, a partir del precursor esteroideo colesterol. Este proviene principalmente de la síntesis endógena del hígado y en menor medida de la dieta (Randall *et al.*, 1998), y a través de pasos sucesivos en el citoplasma, en el retículo endoplasmático liso y en la mitocondria, va sufriendo modificaciones estructurales (Tresguerres, 1989). Puesto que las hormonas esteroideas son lipófilas y pueden atravesar fácilmente las membranas biológicas, no son almacenadas, sino que su síntesis depende de la demanda. Sólo se almacenan en pequeñas cantidades en sus sitios respectivos de producción, por lo tanto, ante la demanda, tienen que ser sintetizadas a partir de la reserva de colesterol (Silbernagl y Despopoulos, 2008).

2.3.1 Síntesis, regulación y metabolismo de las hormonas esteroideas

La síntesis de las hormonas esteroideas comienza con la conversión del colesterol, sustancia madre de las hormonas esteroideas, en pregnenolona. A partir de ésta se forma la progesterona, que no sólo es una hormona activa en sí misma (es una hormona sexual femenina), si no que a partir de ella se pueden sintetizar el resto de las hormonas esteroideas (Silbernagl y Despopoulos, 2008):

- las hormonas de la corteza adrenal: como la corticosterona, aldosterona, cortisol o cortisona,
- las hormonas sexuales masculinas (andrógenos): en el testículo, en el ovario y en la corteza suprarrenal, como la androstenediona o la testosterona,
- y otras hormonas sexuales femeninas (estrógenos): en el ovario, como la estrona o el estradiol.

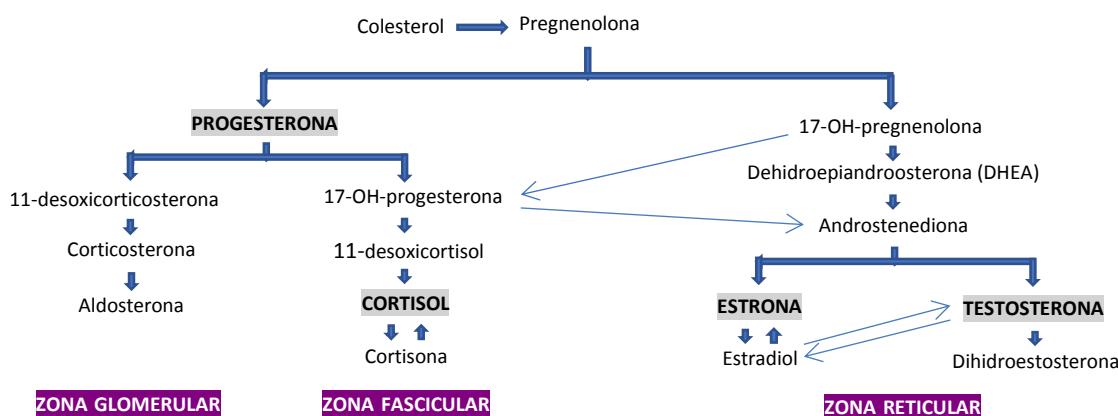


Figura 2: Síntesis de las distintas hormonas esteroideas a partir del colesterol.

Para la formación de las hormonas esteroideas existen dos rutas diferentes: la de los esteroides adrenales (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal), y la de los esteroides gonadales (eje hipotálamo-hipófisis-gónada) (Norris, 2007; Salvador, 2012). De forma general, la síntesis de esteroides está regulada por señales compuestas por la hormona corticotropa (CRH) y hormona adrenocorticotropa (ACTH) para los glucocorticoïdes, y por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) para las hormonas sexuales (Guzman *et al.*, 2010).

Localizadas cranealmente a cada riñón, cada mamífero posee dos glándulas adrenales. Cada una de las glándulas está dividida en corteza y médula. Ambas zonas se componen de tejidos endocrinos de distinta estructura, tejido embrionario y acción, pero con una función en común, que es la de intervenir en la adaptación del individuo al medio ambiente que le rodea (Moreno *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011). La corteza, que es la que se encarga de la producción de las hormonas esteroideas, se divide en tres capas (Figura 2): la zona glomerular produce los mineralocorticoides aldosterona y corticosterona; la zona fasciculada sintetiza principalmente el glucocorticoide cortisol y en menor medida cortisona; y la zona reticular es el sitio principal de origen de los andrógenos de la corteza suprarrenal y algo de cortisol (Silbernagl y Despopoulos, 2008).

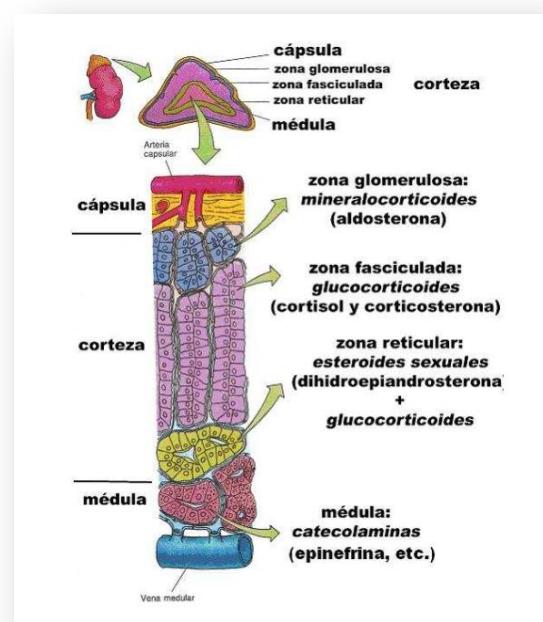


Figura 3. Esquema de la glándula adrenal (Moreno *et al.*, 2011)

- **Hormonas mineralocorticoides:** predomina la aldosterona, cuya función principal es la regulación del metabolismo del Na⁺ y K⁺.

- **Hormonas glucocorticoides:** los más importantes son el cortisol y la corticosterona. Tienen funciones generalizadas entre las que se incluyen la movilización de aminoácidos y glucosa, y acciones antiinflamatorias.
- **Hormonas sexuales:** estrógenos como el estradiol, andrógenos como la testosterona o la dehidroepiandrosterona (DHEA). Se encargan de las características sexuales, el comportamiento sexual y la reproducción.

2.3.2 Fisiología de los glucocorticoides

Diversas hormonas adrenocorticales tienen función glucocorticoide, incluyendo el cortisol, la cortisona y la corticosterona, siendo el cortisol la más importante. El nivel basal de secreción de glucocorticoides está regulado vía retroalimentación negativa por las propias hormonas actuando en el hipotálamo sobre las hormonas secretoras de CRH, y en la adenohipófisis sobre la secreción de ACTH. El nivel basal de glucocorticoides también está sometido a un ritmo diario como resultado de la variación cíclica de CRH, que parece estar controlada por un reloj biológico interno (ritmo circadiano). Además de esta regulación endógena de la secreción, la corteza adrenal es estimulada para secretar glucocorticoides en respuesta a distintos tipos de estrés. El estrés, actuando a través del sistema nervioso, provoca una elevación en la ACTH estimulándose, por lo tanto, la corteza adrenal (Randall *et al.*, 1998).

Los glucocorticoides tienen efectos muy variados y complejos, ya que pueden llevar a cabo acciones anabólicas y catabólicas, reguladoras, inhibidoras y estimulantes, o facilitantes según el tejido implicado. Los glucocorticoides producen acciones sobre el metabolismo (son hormonas hiperglucemiantes), sobre el sistema inmune (la respuesta inmunitaria es inhibida por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal al aumentar los glucocorticoides; aunque a nivel fisiológico los glucocorticoides mejoran ciertos aspectos de la inmunidad celular, una elevación crónica puede ser supresora), sobre la reproducción, y, entre muchas otras acciones, sobre la respuesta de adaptación (la liberación de glucocorticoides forman parte de ésta respuesta fisiológica, la cual es necesaria para que el organismo se enfrente a los estímulos estresantes que recibe) (Norris, 2007; Moreno *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011).

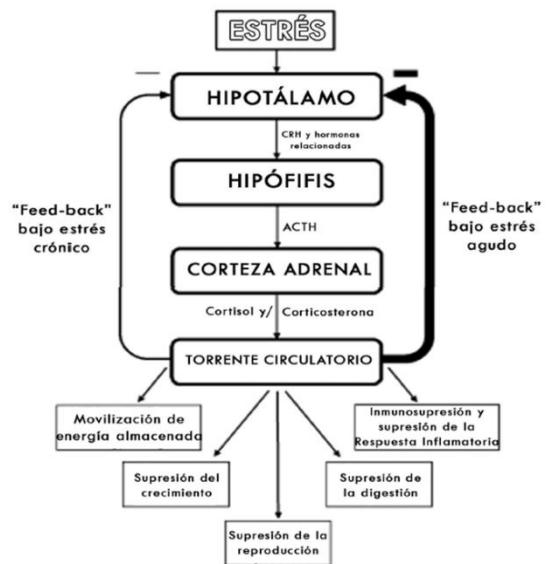


Figura 4. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Efecto de la influencia del “feed-back” negativo producido bajo estrés agudo, comparado con el producido bajo estrés crónico. (Martínez, 2013).

Para la valoración del bienestar animal, o más concretamente de algunos problemas de comportamiento o de la capacidad de adaptación de los animales, resulta de gran ayuda la medición de cortisol (Chacón, 2004; Sheriff *et al.*, 2011).

La concentración de glucocorticoides (o sus metabolitos) se puede medir en varios fluidos corporales o en excrementos. Las muestras fecales tienen la ventaja de que pueden ser fácilmente recogidas y de que su toma no supone un estrés para el animal, además de que reflejan el estado del eje corticotropo en un período de tiempo más largo sin estar influenciado por pequeñas fluctuaciones en el tiempo (Palme y Möstl, 1999; Möstl *et al.*, 1999). Esto ha favorecido la posibilidad de evaluar animales salvajes (Schwarzenberger *et al.*, 1998; Sheriff *et al.*, 2011).

2.3.3 Fisiología de las hormonas sexuales

Las hormonas esteroideas que actúan en la reproducción (estrógenos, andrógenos y progesterona) se sintetizan en las gónadas y en la corteza adrenal a partir del colesterol. Éste se convierte primero en progesterona, la cual se transforma posteriormente en andrógenos (androstenediona y testosterona), y éstos en estrógenos, de los cuales el 17-β estradiol es el más potente. Al igual que hacen otras hormonas esteroideas, las hormonas sexuales se unen a receptores intracelulares y modifican la expresión de genes específicos (Randall *et al.*, 1998).

Las hormonas sexuales esteroideas se regulan ejerciendo una retroalimentación negativa actuando sobre las neuronas secretoras de GnRH del hipotálamo y sobre las células endocrinas de la adenohipófisis (Randall *et al.*, 1998).

Las hormonas sexuales evaluadas en este trabajo han sido:

- **Andrógenos** → La testosterona es el andrógeno más común en la mayoría de vertebrados y la principal hormona sexual en los machos. La fuente principal de andrógenos circulantes en el macho son los testículos, donde la hormona luteinizante (LH) de la hipófisis estimula la producción de testosterona y la libera al torrente sanguíneo. La testosterona lleva a cabo varias funciones, como la espermatogénesis en los tubos seminíferos, la estimulación del crecimiento de los tejidos somáticos, el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos, o producir cambios en el comportamiento actuando sobre el cerebro (Randall *et al.*, 1998).
- **Estrógenos** → Pese a ser conocida como una “hormona femenina”, la estrona también está presente en los machos (Hess *et al.*, 1997). Los estrógenos se encargan

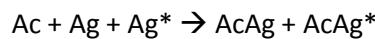
de la regulación y síntesis de las hormonas hipofisarias implicadas en la reproducción, como LH, la FSH y la prolactina; en los machos, además de estimular el comportamiento sexual, también induce la formación del hipotálamo (Norris, 2007).

- **Progestágenos** → Aunque se traten de hormonas que se encuentran principalmente en la hembra, los progestágenos son sintetizados por todos los tejidos esteroidogénicos como intermediarios en la producción de la mayoría de las hormonas esteroides, sintetizándose principalmente en la corteza adrenal, en los testículos, y en los ovarios y tejido adiposo en las hembras (De Geyter *et al.*, 2002; Norris, 2007). Por esto no difieren significativamente las concentraciones entre machos y hembras. (Morden *et al.*, 2011).

2.3.4 Métodos no invasivos para la medición de hormonas esteroides

Los métodos que más se utilizan y los que más han avanzado en las últimas décadas son los métodos de análisis hormonal mediante técnicas inmunológicas. Existen muchos métodos que siguen la misma base, pero que tienen diferentes marcadores de reacción, como enzimáticos, fluorescentes, quimioluminiscentes, etc. (Chacón, 2004; Lequin, 2005).

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



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

Las técnicas inmunológicas pueden clasificarse atendiendo a la naturaleza de los marcadores que se usen. Existen diversas técnicas, como las técnicas de radioinmunoanálisis o RIA (*Radioimmunoassay*), las técnicas de fluoroinmunoanálisis o FIA (*Fluorescence immunoassay*), las técnicas de quimioluminiscencia o CIA (*Chemiluminescence immunoassay*), o las técnicas de enzimoinmunoanálisis o EIA (*Enzyme immunoassay*), que es la que se ha usado en este estudio.

3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

La idea de llevar a cabo este trabajo surgió a raíz de realizar prácticas formativas en Julio de 2016 en La Reserva del Castillo de las Guardas, Sevilla, y del interés de la veterinaria que allí trabajaba en realizar diferentes estudios e investigaciones.

Al disponer de un animal interesante de estudio (*Ceratotherium simum*) por su historia y su importancia desde el punto de vista de la conservación y bienestar animal, la falta de estudios publicados anteriormente, y la posibilidad de realizar analíticas en un buen laboratorio, nos llevó a plantear este estudio.

Además, el caso de este rinoceronte despertaba un gran interés social, pues Rómulo era muy conocido tanto por los visitantes de los zoos, como por la prensa:

- ❖ “Sobre las cárceles que nos construimos: ...Rómulo, el rinoceronte de Bioparc Valencia que se pasa el día avanzando en círculos como consecuencia de su nacimiento y crecimiento en cautividad”. Publicado en www.meditacionesdeldia.com en Mayo de 2013.
- ❖ “Una jubilación feliz para Rómulo: ... Su problema fue que acabó andando en círculos tras las penosas condiciones que vivió en el pasado: el escenario de un circo ambulante y la angosta jaula del antiguo zoo de Valencia... ”. Publicado en Diario Sur en Octubre de 2016.
- ❖ “Rómulo, el rinoceronte que cambió Valencia por Sevilla: ...se decidió trasladar a Rómulo a un nuevo destino, asegurándose previamente que fuese adecuado para que siguiese el proceso de mejora de su estereotipia.”. Publicado en ABC de Sevilla en Junio de 2013.
- ❖ Estos enlaces llevan a unos vídeos de YouTube en los que se ve a Rómulo en el Bioparc de Valencia y en La Reserva del Castillo de las Guardas:
<https://www.youtube.com/watch?v=9yPYBmIZ0Pw>,
<https://www.youtube.com/watch?v=zwPrjHGStFY>.

Teniendo en cuenta, además, que el bienestar animal está cobrando cada vez más importancia por el público en general y que se está concienciado acerca de esta problemática cuando se trata de animales en cautividad, todo esto suponía otra motivación para llevar a cabo el trabajo.

En base a estas consideraciones, el objetivo de esta investigación fue comparar los perfiles hormonales en heces de un rinoceronte blanco alojado en dos ambientes diferentes para determinar la relación entre los niveles de hormonas gonadales, hormonas adrenales, y la desaparición de un comportamiento estereotipado.

4. METODOLOGIA

Para la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado contamos con Rómulo, el rinoceronte blanco objeto de estudio, del que ya se disponían muestras procedentes del Bioparc de Valencia, y del que se tomaron las muestras necesarias en La Reserva del Castillo de las Guardas en Julio de 2016, las cuales se congelaron hasta su análisis en la Facultad de Veterinaria de Madrid en Enero de 2017.

Se analizaron las muestras de ambas procedencias y se compararon los resultados. Para procesar las muestras fecales se utilizó el protocolo que tenían estandarizado en la Facultad de Veterinaria de Madrid, y para la posterior medición hormonal se realizó el enzimoinmunoanálisis ELISA.

Al mismo tiempo y durante toda la redacción del trabajo, se consultó bibliografía en libros y buscadores como Pubmed, de los últimos 25 años, acerca de estudios y métodos de medición de hormonas en animales salvajes y en cautiverio, acerca de métodos de enriquecimiento ambiental y sus pros y contras, y acerca de la fisiología del estrés en los animales, para obtener así una visión más amplia y tratar de relacionar toda la información y elementos de que disponíamos y, de esta manera, poder interpretar mejor los resultados.

4.1 Rómulo

Rómulo es un macho adulto de rinoceronte blanco de unos 40 años que presentaba un claro ejemplo de estereotipia. Su comportamiento repetitivo consistía en caminar en círculos constantemente, el cual comenzó en un circo. En 1984 llegó al zoo de Valencia, donde tenía una instalación pequeña y de cemento. El zoo cerró en 2007, y se produjo su traslado al Bioparc, donde el recinto era más amplio y moderno. Aquí las condiciones se consideraban de “semi-cautividad”, pero su comportamiento estereotipado se mantuvo. Finalmente en 2013 se trasladó a La Reserva del Castillo de las Guardas, donde disponía de una instalación mucho más grande y donde desapareció la estereotipia.



Figura 5. Rómulo, el rinoceronte objeto de estudio.

4.1.1 Alojamiento 1

Alojamiento en el Bioparc de Valencia. Condiciones de “semi-cautividad”, intentando asemejarse a un espacio natural recreando lo más fielmente posible las condiciones del hábitat natural del animal, pero con dimensiones que se pueden considerar demasiado pequeñas para un rinoceronte. Como elementos de enriquecimiento se pueden nombrar una charca, alguna roca, y escasa vegetación. Único individuo de su especie en la instalación debido a su agresividad, mantenía contacto visual y olfativo con otros miembros de su especie. No compartía espacio con ningún otro tipo de animal.



Figura 6. Rómulo en su instalación en el Bioparc de Valencia. Se puede observar claramente la marca en el suelo como resultado de la marcha en círculos (imagen gentileza de Joaquín Muñoz Traver).

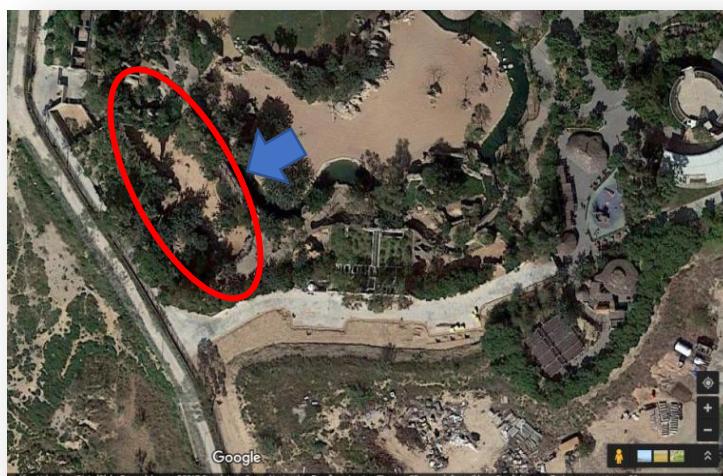


Figura 7. Vista de la instalación de Rómulo en el Bioparc de Valencia. Según la escala, tiene un área aproximada de unos 1.000 m^2 (Fuente: Google Earth).

4.1.2. Alojamiento 2

Alojamiento en La Reserva del Castillo de las Guardas, Sevilla. Condiciones de “semi-libertad”: unos 20.000 m^2 de extensión, divididos en varias parcelas comunicadas entre sí. Como elementos de enriquecimiento ambiental: vegetación natural muy abundante, gran cantidad de árboles y troncos entre los que destacan eucaliptos y pinos de gran altura, además de monte bajo, una charca, y agrupación social con varios animales de otras especies (antílopes, gamos, guanacos...) que tenían acceso libre a la instalación (en la figura 7 se ve a Rómulo compartiendo la instalación con unos guanacos). Único individuo de su especie, pero con contacto olfativo con otro rinoceronte blanco más joven.



Figura 8. Rómulo en su instalación en La Reserva del Castillo de las Guardas. Se le puede ver junto con unos guanacos.



Figura 9. Charcha natural que tiene Rómulo en su instalación en La Reserva del Castillo de las Guardas.

Cabe decir que para este estudio, se han considerado condiciones de “semi-cautividad” aquellas en las que se intenta reproducir, en mayor o menor medida, las condiciones del entorno natural del animal, pese a seguir bajo el cuidado humano y ser un recinto cerrado.

4.2 Recogida de muestras

Se analizaron un total de 12 muestras fecales, 6 procedentes del alojamiento 1 (Bioparc de Valencia), y otras 6 procedentes del alojamiento 2 (La Reserva del Castillo de las Guardas). Estas muestras, correspondientes a la primera deposición diaria, fueron recogidas dos veces por semana durante las 3 primeras semanas consecutivas en el mes de Julio de 2009 en el alojamiento 1, y en Julio de 2016 en el alojamiento 2. Una vez recogidas, se congelaron inmediatamente con su identificación correspondiente hasta su posterior análisis. Las muestras correspondientes al alojamiento 1 se encontraban en depósito en el Laboratorio de Endocrinología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y fueron recuperadas para su inclusión en este estudio, previa autorización de los responsables de la institución del alojamiento 1.

4.3 Procesamiento de muestras fecales

Como protocolo de extracción de heces congeladas se usó el que tenían estandarizado y validado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de Madrid y que sigue los siguientes pasos:

- 1) Secar las muestras en la estufa a 90°C durante 48h (envueltas en papel de filtro con la identificación asignada).



Figuras 10 y 11. Paso 1, donde se puede apreciar las muestras secándose en la estufa, envueltas en papel de filtro y señalizadas.

- 2) Quitar todas las suciedades adheridas (fibras, pelos, huesos...) y meterlas lo más limpias posible en las bolsas zip-lock (perfectamente identificadas).
- 3) Golpearlas con un mazo para pulverizarlas.
- 4) Pesar 0,2 g de muestra y meterlos en tubos de extracción (tubos de cristal de 10 ml) con su identificación correspondiente. Hay que anotar exactamente el peso de la muestra y si existen fibras, huesos u otros desechos.
- 5) Si no van a ser extraídas inmediatamente hay que congelar las muestras pesadas. Las bolsas zip-lock con la muestra restante deben también congelarse tan pronto como sea posible.
- 6) Añadir a cada muestra 0,5 ml de agua destilada y 4,5 ml de etanol absoluto (EtOH). Homogeneizar en vórtex durante 10 segundos (o lo que sea necesario hasta mezclar completamente).
- 7) Agitar los tubos durante 30 minutos en el agitador de placas a velocidad lenta.
- 8) Centrifugar los tubos en la centrifugadora 20 minutos a 2.200 rpm.
- 9) Separar el sobrenadante a un segundo set de tubos de extracción y evaporarlo en un baño de agua a 100ºC.
- 10) Añadir de nuevo a los tubos del primer set 0,5 ml de agua destilada y 4,5 ml de etanol absoluto (EtOH), vortear durante 30 segundos y centrifugar durante 20 minutos a 2.200 rpm.
- 11) Poner el sobrenadante otra vez en el segundo set de tubos (una vez evaporado el anterior completamente) y volver a meter en el baño de agua hasta su completa evaporación.
- 12) Añadir 3 ml de etanol absoluto (EtOH) para limpiar bien los tubos, vortear 30 segundos, sonicar durante 15 minutos y meter de nuevo al baño hasta su completa evaporación.
- 13) Reconstituir en un ml de Metanol (HPLC), vortear 30 segundos, sonicar durante 15 minutos y ya tenemos el extracto final que se volverá a vortear antes de meterlo en un eppendorf con su identificación correspondiente.



Figura 12. Tubos de extracción identificados con los 0,2 g de muestra, 0,5 ml de agua destilada y 4,5 ml de etanol absoluto (EtOH).



Figura 13. Muestras evaporándose en el baño de agua a 100ºC (pasos 9, 11 y 12).



Figura 14. Sonicador, en el que se separan las partículas de la pared de los tubos (pasos 12 y 13).

4.4 Análisis hormonal

Para la determinación de las concentraciones hormonales, se analizaron las muestras mediante ELISA de competición, previamente validado para la especie de este estudio.

Los niveles hormonales se expresaron en ng/g de heces secas.

El ELISA comprendió los siguientes pasos:

- 1) Adsorción de los anticuerpos a la fase sólida: se tapizaron las microplacas de poliestireno con una dilución determinada del anticuerpo para la hormona a analizar. Las diluciones se realizaron en *coating buffer* (tampón carbonato/bicarbonato 0,05M, pH=9,6). Se añadieron 100 µl de la misma en todos los pocillos de la placa dejando libre el primer pocillo (A1) para utilizarlo como blanco. Por último, las placas se sellaron con una tapa de acetato y se incubaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente, con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo no fijado, se lavaron las placas tres veces con solución de lavado (NaCl 0,15 M/Tween-20 0,05%), utilizando un lavador automático de placas.
- 2) Reacción de competición: tiene lugar la reacción entre la hormona libre (muestra estándar o problema) y la hormona conjugada por la enzima. Primero se prepararon las curvas estándar. Luego se prepararon las muestras problema en la solución de conjugado en la siguiente proporción: 50 µl de muestra se diluyeron en 250 µl de conjugado en un tubo de ensayo de cristal y la mezcla se homogeneizó mediante vórtex. Se utilizaron 60 µl de esta solución junto con 40 µl de tampón EIA para tapizar los pocillos de la placa de poliestireno. Las placas se sellaron, incubándose durante un período de 2 horas a temperatura ambiente (alrededor de 22°C).
- 3) Separación de las fracciones de hormona libre y unida a los anticuerpos de la fase sólida: se lavaron las placas en el lavador automático (cinco veces) y se secaron golpeándolas energicamente sobre papel de filtro. De esta forma, sólo queda en la placa la cantidad de hormona que se haya unido al anticuerpo,
- 4) Adición del sustrato y del cromógeno: se añaden 100 µl de sustrato-cromógeno (H₂O₂-timidilbencidina, *Enhanced K Blue*, Neogen, USA). Se sella y se incuba a temperatura ambiente el tiempo necesario según la hormona: (testosterona y sulfato de estrona 5 minutos, progesterona 10 minutos, cortisol 45 minutos). A medida que pasa el tiempo de incubación, apreciamos la aparición de un color azul en los pocillos.
- 5) Frenado de las placas: tras cumplir el tiempo de incubación, se frenó la reacción enzimática añadiendo 100 µl de una solución de ácido sulfúrico al 10% en todos los pocillos de la placa. La reacción hizo que el color azul pasara a amarillo.

- 6) Lectura y procesado de los resultados: Se basa en cuantificar la densidad óptica del color desarrollado en cada pocillo. Se utilizó un lector automático EIA (*Microplate Reader A4, Eurogenetics, Bélgica*).
- 7) Procesado de los resultados: Se realiza con la ayuda de un software diseñado por el Departamento de Informática de la Universidad de California. Este programa traza las curvas patrón enfrentando en el eje de abscisas las concentraciones estándar de las hormonas y en el eje de ordenadas el porcentaje de unión de las muestras con el anticuerpo. Una vez calculadas las curvas patrón, el programa calcula las concentraciones hormonales de las muestras tomando como referencia estas curvas. Para expresar las concentraciones en unidades correctas (ng/g) se introduce un factor de corrección en función de la dilución realizada.



Figura 15. Muestras preparadas para leer.

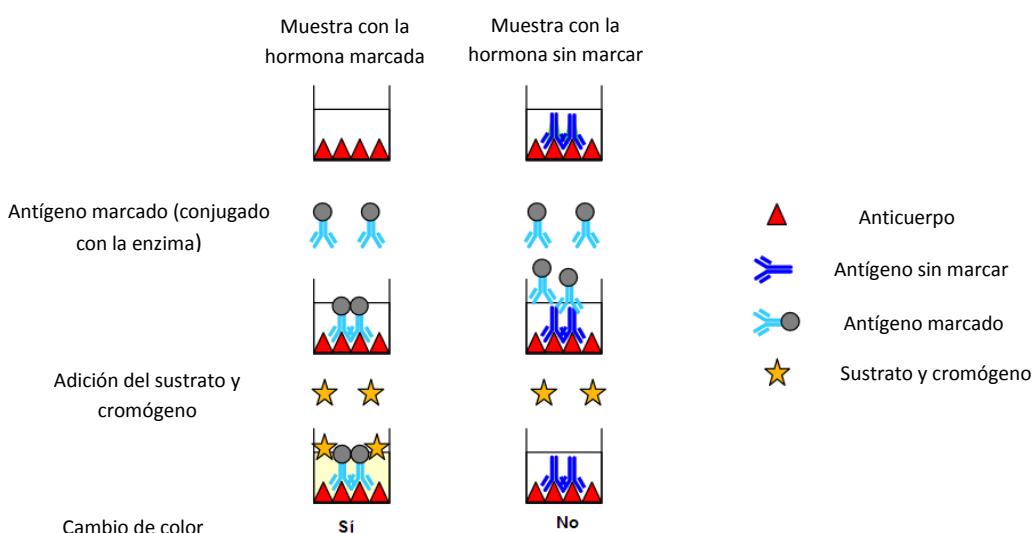


Figura 16. Esquema del ELISA de competición.

4.5 Análisis estadístico

Para realizar el estudio estadístico de la presente investigación se empleó el paquete estadístico SPSS 19.0 (*IBM Statistical Package for the Social Sciences, USA, 2010*). Los valores hormonales de los extractos fecales fueron expresados en ng/g materia seca.

Los resultados fueron expresados en forma de media \pm error estándar. Se empleó el análisis T de Student para muestras pareadas para comparar los valores hormonales. Las diferencias fueron consideradas significativas para valores de $p<0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron un total de 12 muestras fecales, 6 provenientes del alojamiento 1 y otras 6 provenientes del alojamiento 2. Todas ellas fueron analizadas para determinar las distintas concentraciones de hormonas esteroideas y compararlas en función de la variable de estudio (alojamiento).

Los resultados en forma de media ± error estándar de la media (ESM). Las concentraciones de hormonas se calcularon en ng/g.

5.1 Cortisol

El análisis de los resultados de las concentraciones de cortisol entre los dos alojamientos revela diferencias estadísticamente significativas, siendo más bajos en el alojamiento 2 ($p<0.05$) (Gráfico 1).

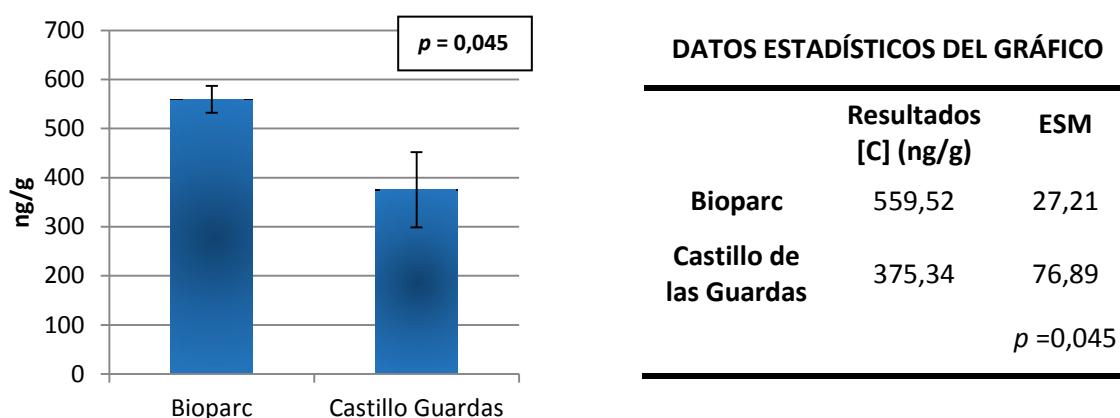


Gráfico 1. Media y error estándar de la concentración de cortisol en el alojamiento 1 y en el alojamiento 2.

Como se ha comentado en la revisión bibliográfica, el nivel de glucocorticoides es considerado un importante evaluador de la relación que existe entre los factores estresantes ambientales y el bienestar del animal (Moberg, 1991). Así pues, la determinación de cortisol tiene mucho interés para valorar la respuesta de un animal al estrés. Si se pretende evaluar el estado de bienestar de un animal mediante la determinación de la concentración de cortisol, a la hora de interpretar los resultados hay que tener en cuenta otros parámetros, como el patrón de comportamiento (conducta agresiva, estereotipias, comportamiento apático), los niveles basales normales de la especie y el método de análisis utilizado, además de que hay diferentes factores fisiológicos o patológicos que pueden afectar al cortisol (Chacón, 2004; Sheriff et al., 2011). Entre los factores fisiológicos están el ritmo circadiano, la estación del año, la especie animal, su estado fisiológico, la alimentación, y el enriquecimiento ambiental.

En nuestro estudio, las muestras procedían del mismo animal en dos ambientes diferentes, sin embargo, los factores fisiológicos de ritmo circadiano, época del año, estado fisiológico y alimentación han sido controlados con un correcto diseño del estudio, habiendo realizado el muestreo a la misma hora del día, en la misma época del año, y bajo las mismas condiciones de alimentación en los ambientes estudiados. Entre los factores externos que pueden afectar a los niveles de cortisol, destacan las interacciones con otros animales o con el medio ambiente; o internos, como el dolor y las enfermedades (Carr, 2002; Wingfield y Kitaysky, 2002; Abbott *et al.*, 2003). Además se ha demostrado en el caso de los rinocerontes que existen diversas situaciones, como el transporte o la traslación de ejemplares, que actúan como factores estresantes para los animales, aumentando los niveles de glucocorticoides (Turner *et al.*, 2002; Linklater *et al.*, 2010). En nuestro estudio se intentaron reducir al máximo las variables externas para poder evaluar precisamente el efecto del alojamiento enriquecedor. En este caso, el muestreo se realizó 3 años tras el traslado del animal a su nueva instalación, y se ha comprobado que la interacción social ejerce más como factor beneficioso que mejora el bienestar al asemejarse más a la situación a lo que se da en libertad, donde distintas especies de animales conviven e interactúan entre sí de forma beneficiosa.

Atendiendo a esto y a los resultados obtenidos en los análisis, podemos decir que el mayor nivel de cortisol presente en las muestras del alojamiento 1, junto con el hecho de que era una instalación pequeña y de que el rinoceronte presentaba un comportamiento estereotipado, demuestra que el animal presentaba mucho más estrés estando en esa instalación, y que ese estrés disminuyó al trasladarlo a la instalación 2, mucho más grande y enriquecedora y que permitía la interacción social, quedando, además, en parte demostrado al desaparecer la estereotipia. Los comportamientos estereotipados son inducidos a menudo por factores estresantes (Carlstead y Brown, 2005). El característico comportamiento estereotipado que presentaba Rómulo, fue desarrollado en el circo en que se encontraba previamente a su introducción en el alojamiento 1. De acuerdo a lo descrito por diversos autores (Carlstead y Brown, 2005; Cinkova, 2006; Menargues *et al.*, 2006), las conductas aberrantes que nunca se darían en libertad, son producto de las condiciones en que se encuentra el animal en cautividad. Por lo tanto, parece que las condiciones estresantes bajo las que se encontraba en el circo, le provocaron dicha estereotipia, que se mantuvieron en el alojamiento 1, y que las condiciones aportadas por el alojamiento 2 son lo más parecido a la libertad. Nuestros resultados indican además que, al igual que en otras especies de mamíferos, en este rinoceronte el enriquecimiento estructural le ha permitido mostrar un comportamiento más semejante al que manifestaría en libertad (Brummer *et al.*, 2010).

Además, las conductas afiliativas establecidos entre Rómulo y ejemplares de otras especies con las que comparte instalación en el alojamiento 2, podrían haber sido la fuente de liberación de oxitocina y de forma consecuente haber reducido el estrés preexistente (Reading *et al.*, 2013).

En este estudio también hemos comprobado la utilidad del empleo de muestras fecales para valorar la respuesta del eje corticotropo a diferentes estímulos estresantes mediante la determinación del cortisol fecal, metodología que había sido previamente apoyada por otros autores (Flaeger *et al.*, 2010), lo que facilita mucho el muestreo en animales salvajes; sin embargo, el empleo de otros fluidos como la saliva, la orina o la leche (Gomez *et al.*, 2004; Bayazit, 2009; Konjevic *et al.*, 2011) utilizados previamente para medir los metabolitos del cortisol, requieren un entrenamiento específico en especies de mamíferos salvajes.

5.2 Testosterona

La media de la concentración de testosterona tanto en el alojamiento 1 como en el alojamiento 2, es significativamente diferente ($p<0.05$). Fueron más altos en el alojamiento 2 (Gráfico 2).

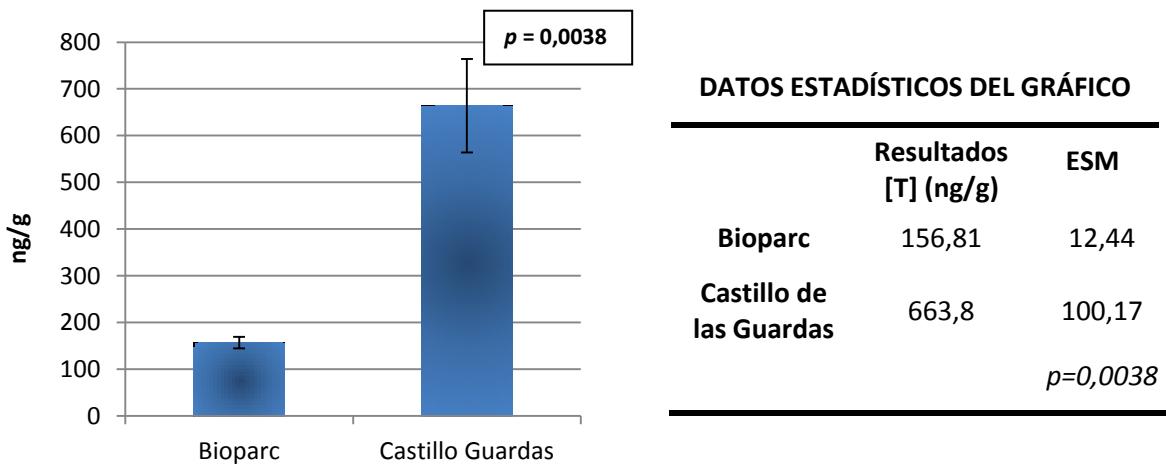


Gráfico 2. Media y error estándar de la concentración de testosterona en el alojamiento 1 y en el alojamiento 2.

La testosterona se ha asociado con la dominancia, la territorialidad y el comportamiento sexual, estableciendo una conexión entre la fisiología y el comportamiento reproductivo en los machos de rinoceronte blanco en libertad (Rachlow *et al.*, 1998). Además, los andrógenos también se han relacionado, tanto en rinocerontes como en otras especies, con el rango social (Owen-Smith, 1973 y 1975; Rachlow *et al.*, 1998; Kretzschmar *et al.*, 2004). En los rinocerontes, más concretamente, se ha visto que los niveles de andrógenos fecales están asociados más con el rango social que con la edad (Kretzschmar *et al.*, 2004). Es

importante remarcar que en el alojamiento 1 Rómulo tenía contacto visual y olfativo con hembras jóvenes ciclando y otro macho joven. Sin embargo, en el alojamiento 2, sólo existe estímulo olfativo con otro macho joven de rinoceronte blanco. Por tanto, el hecho de que los niveles de testosterona observados en el alojamiento 2 sean estadísticamente mayores a los testosterona fecal en el alojamiento 1, podrían deberse a que los comportamientos estereotipados mostrados en cautividad hubiesen anulado la actividad gonadal. Se ha demostrado que bajo estrés crónico o una habituación al estímulo estresante, la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal del animal está disminuida (Ostrander et al., 2006; Cyr y Romero, 2008; Petrowski et al., 2012) y la elevada concentración de glucocorticoides mantenida durante largos períodos de tiempo, puede tener efectos perjudiciales para el animal (Rothschild et al., 2008) ya que se produce una hipertrofia de la glándula adrenal que provoca una pérdida de masa corporal, perdida de actividad reproductora e inmunosupresión (Norris, 2007) (Ver figura 3). Por tanto, el incremento de los niveles de testosterona que se observa en el alojamiento 2, podría deberse a la restauración de la función gonadal después de perder la supresión del eje hipotálamo-hipófisis como consecuencia, de los altos niveles de cortisol detectados en el alojamiento 1.

Si bien se ha afirmado previamente que los machos dominantes muestran mayor cantidad de andrógenos que sus subordinados (Christensen et al., 2009), no podemos valorar aquí si ha existido una influencia de la organización social en los resultados debido al cambio de ejemplares de su misma especie al cambiar de institución por no haber realizado análisis a los otros rinocerontes que han convivido con Rómulo

5.3 Progesterona

No existieron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$), los resultados de la concentración media de progesterona son similares en ambos alojamientos (Gráfico 3).

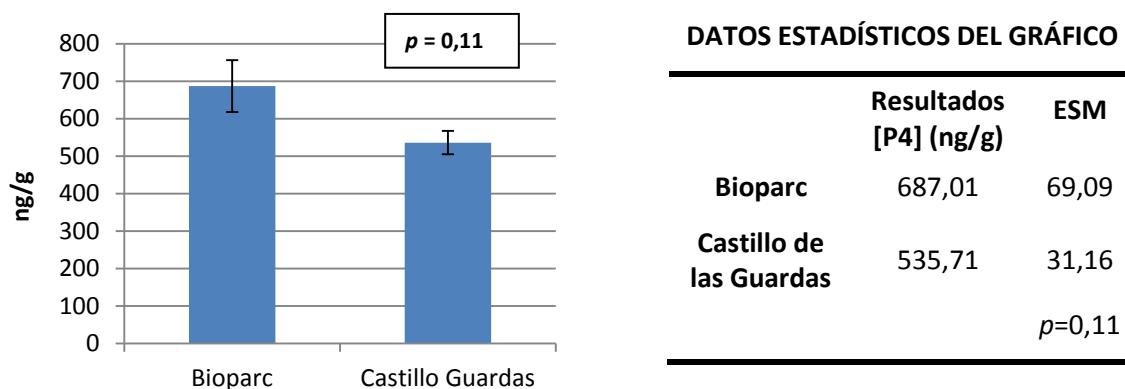


Gráfico 3. Media y error estándar de la concentración de progesterona en el alojamiento 1 y en el alojamiento 2.

Los progestágenos son producidos por todos los tejidos esteroidogénicos como intermediarios en la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroideas, sintetizándose principalmente en la corteza adrenal, en los testículos y en los ovarios (De Geyter *et al.*, 2002; Norris, 2007). Puesto que la progesterona es un precursor del cortisol, el mayor nivel de progesterona observado en el alojamiento 1 se debe a una mayor demanda de otras hormonas esteroideas, en este caso de cortisol, aunque la diferencia no muestra significación estadística. Según esto, cabría esperar que el aumento de testosterona visto en el alojamiento 2, hiciese que la progesterona también fuese más alta en los resultados de este alojamiento, pero cabe recordar que la testosterona tiene otra línea de síntesis independiente de la del cortisol, la de la pregnenolona y la DHEA (dehidroepiandrosterona).

5.4 Sulfato estrona

El análisis de los resultados de las concentraciones de sulfato estrona entre los dos alojamientos, no revela diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$), siendo la media muy parecida entre ambos alojamientos.

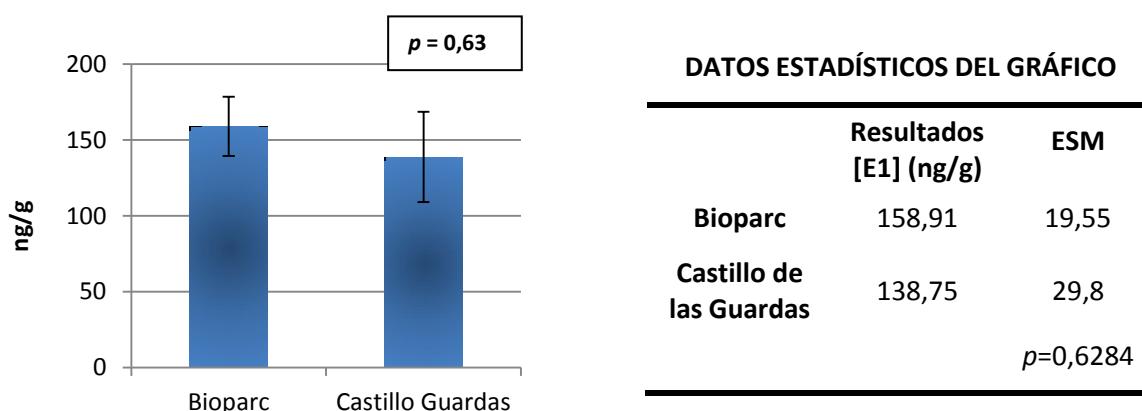


Gráfico 4. Media y error estándar de la concentración de sulfato estrona en el alojamiento 1 y en el alojamiento 2.

Los niveles de estrógenos encontrados en los distintos alojamientos, no muestran diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, los rinocerontes mantenidos en cautividad muestran unos niveles superiores de estrógenos respecto a los rinocerontes en libertad (Martínez, 2013). Algunos autores indican que los niveles de estrógenos en el rinoceronte, pueden aumentar en base a la alimentación, pues los fitoestrógenos suplementados en la dieta pueden elevar dichas concentraciones, además de afectar a la reproducción en dichos animales (Tubbs *et al.*, 2012). Sabemos que la alimentación de este rinoceronte en los dos ambientes se basa principalmente en pienso, heno y alfalfa, aunque desconocemos la proporción de fitoestrógenos que podrían estar ingiriendo de forma habitual

mediante la dieta, no descartamos la posibilidad de la influencia que pudieran haber tenido sobre las concentraciones de estrógenos analizadas en los dos ambientes diferentes.

Finalmente, cabe resaltar que este estudio es de gran importancia desde el punto de vista del bienestar animal. Hemos demostrado que con un método de muestreo no invasivo se puede valorar el bienestar animal y las respuestas fisiológicas a los cambios de ambiente, como ha sido sugerido previamente (Chacón, 2004; Sheriff *et al.*, 2011). Asimismo este estudio es de gran importancia desde el punto de vista de conservación, puesto que al haber recuperado la función gonadal podría considerarse el uso de este animal como reproductor en cautividad, ya que podría haber recuperado la espermatogénesis, pues la testosterona es la responsable directa de la síntesis de espermatozoides en los tubos seminíferos (Randall *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta la gran amenaza que sufre este animal en la actualidad (Emslie *et al.*, 2016) y dados los resultados obtenidos en nuestro estudio, este ejemplar en las condiciones actuales podría ser de gran utilidad para contribuir al éxito del programa de cría en cautividad del rinoceronte blanco (www.eaza.net).

Consideraciones metodológicas

Los resultados obtenidos en este estudio son correlacionales y descriptivos. Para obtener resultados con potencia estadística elevada, el tamaño muestral debería haber sido mucho mayor, se deberían de haber recogido muestras en ambas instalaciones durante un período de tiempo mucho más largo, e incluso haber reducido todavía más los posibles factores de variación. También se podrían haber hecho comparaciones de resultados con un rinoceronte que no presentase una estereotipia, además de con otros estudios sobre hormonas en rinocerontes blancos.

6. CONCLUSIONES

1. Las cuantificaciones de hormonas esteroideas adrenales y gonadales en muestras de heces han demostrado ser útiles en la valoración de la respuesta del rinoceronte blanco al efecto de los diferentes ambientes, apoyando así el empleo de la materia fecal como importante fuente de información para estudios de bienestar en animales salvajes.
2. Existe una asociación entre las diferentes condiciones de cautividad en las que se encuentra el rinoceronte en cada uno de los dos alojamientos y entre los niveles de glucocorticoides: cuanto más restrictivas son las condiciones de cautividad de este rinoceronte blanco, mayor

alteración se produce en la respuesta normal del eje corticotropo, elevando los niveles de glucocorticoides.

3. El enriquecimiento ambiental proporcionado (agrupación social y enriquecimiento estructural) en el alojamiento 2 llevó a la desaparición del comportamiento estereotipado y al descenso de la secreción de cortisol (C).
4. Los resultados de las medias de los niveles de cortisol (C) y testosterona (T) respecto a la variable *alojamiento*, son estadísticamente significativas.
5. Los resultados de las medias obtenidas de los niveles de progesterona (P4) y sulfato estrona (E1), no son estadísticamente significativas respecto a la variable *alojamiento*.

Conclusión final

Las mejoras en las condiciones de manejo de este espécimen fueron cruciales para reducir su estrés y, como consecuencia, mejorar su bienestar.

CONCLUSIONS

1. Quantifications of adrenal and gonadal steroid hormones in fecal samples have proven to be useful in the assessment of the white rhinoceros response to the effect of different environments, thus supporting the use of fecal matter as an important source of information for welfare studies in wild animals.
2. There is an association between the different captivity conditions in which the rhinoceros is found in each of the two enclosures and between glucocorticoids levels: the stricter the captivity conditions of the white rhinoceros, the greater the alteration occurs in the normal response of the corticotrope axis, raising the glucocorticoids levels.
3. The environmental enrichment provided (social grouping and larger enclosure) in enclosure 2 (La Reserva del Castillo de las Guardas) to this animal led to a disappearance of the stereotyped behavior and a decrease in the cortisol (C) secretion.
4. The averages results of the cortisol (C) and testosterone (T) levels, regarding to the enclosure and stereotyped behavior, are statistically significant.
5. The averages results of the progesterone (P4) and oestrone sulphate (E1) levels are not statistically significant with regarding to enclosure and stereotyped behavior.

Final conclusion

The improvements in the management conditions of this specimen were crucial to decrease the stress of this animal and, for that reason, to increase his welfare.

7. VALORACION PERSONAL

El hacer este trabajo me ha aportado unos conocimientos y una experiencia que seguro me serán de utilidad en mi futuro como veterinaria. Considero que ha sido un buen complemento formativo a lo aprendido en clase y una buena forma de aplicar la teoría.

He tenido que aprender a buscar gran cantidad de bibliografía, pero lo más difícil de esto ha sido aprender a analizarla, comprenderla y seleccionarla, ya que uno de los grandes desafíos que me ha supuesto realizar este trabajo, ha sido el de sintetizar toda la información, el de intentar poner todo lo imprescindible, pero de una forma muy concisa. Esto también ha hecho que aprenda a cómo documentarme y a cómo realizar un estudio propio, lo cual es algo imprescindible en la profesión veterinaria.

Hacer este trabajo también me ha ayudado a enriquecer los conocimientos que tenía sobre la endocrinología y a entender mejor su funcionamiento. También me ha hecho adentrarme en el mundo de la investigación y de los laboratorios, lo que ha sido de gran interés.

Para alguien que tiene vocación por trabajar con animales salvajes, haber tenido la oportunidad de hacer este trabajo hace que me sienta afortunada. Además he descubierto una gran cantidad de sitios web y libros relacionados con el tema que resultan de lo más útil e interesante.

Hacer este trabajo me ha supuesto todo un reto, pero es este el motivo que hace que me sienta tan satisfecha y que ha hecho que merezca la pena.

8. AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado con la elaboración de esta pequeña pero importante pieza de mi carrera, a todas y cada una de las personas que han formado parte de este largo camino que ha finalizado con la presentación de este Trabajo Fin de Grado.

Gracias a mis tutoras, Maite Verde Arribas y Jimena de Andrés Gamazo, por haberme ayudado y guiado en todo momento. Jimena, esto no hubiese sido posible sin ti, una parte de esto te pertenece. Gracias por haberme dado esta oportunidad, por haber estado siempre

disponible para ayudarme, gracias por tus consejos, por tu duro trabajo, por tu paciencia, y gracias por haber confiado en mí.

Gracias al Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM, con especial mención al Director, Juan Carlos Illera del Portal, por haberme permitido formar parte de este estudio. A Sara Cáceres, gracias por haberme ayudado en el laboratorio y por tu amabilidad explicándomelo todo.

A los responsables de Bioparc Valencia por haberme permitido emplear sus muestras para la realización de este estudio.

A La Reserva del Castillo de las Guardas, por haberme permitido hacer las prácticas allí; y a sus trabajadores, por haberme ayudado con la recogida de las muestras y por haberme hecho pasar un mes que nunca olvidaré.

A la Escuela Europea de Oratoria, y en especial a Mónica Pérez de las Heras, por su apoyo incondicional y su cariño demostrado hacia Rómulo, y por su colaboración en el mantenimiento y mejora de las instalaciones.

Y por supuesto, a mi familia, sin su ayuda no estaría hoy escribiendo estas líneas; a mi novio, por aguantarme en los días más difíciles y más estresantes; y a mi mejor amiga, simplemente por estar ahí.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abbott DH, Keveme EB, Bercovitch FB, et al. (2003). Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behavior* 43(1):67-82.
- Andrews. NLP, Ha. JC (2014). The effects of automated scatter feeders on captive grizzly bear activity budgets. *Journal of applied animal welfare science* 17(2):148-156.
- Barja I, Silvan G, Martinez-Fernandez L, Illera JC (2011). Physiological stress responses, fecal marking behavior, and reproduction in wild European pine martens (*Martes martes*). *Journal of Chemical Ecology* 37(3):253-259.
- Bayazit V (2009). Evaluation of cortisol and stress in captive animals. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(2):1022-1031.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, et al. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: Lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Genetics* 6(7):544-556.
- Brummer SP, Gese EM, Shivik JA (2010). The Effect Of Enclosure Type On The Behavior And Heart Rate Of Captive Coyotes. *Applied animal behaviour science* 125:171–180.

- Carlstead K, Brown JL (2005). Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive Black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. *Zoo Biology* 24(3):215-232.
- Carr JA (2002). Stress, neuropeptides, and feeding behavior: A comparative perspective. *Integrative and Comparative Biology* 42(3):582-590.
- Chacón G (2004). *Estandarización de técnicas de enzimoinmunoensayo para la valoración del eje corticotropo en las especies bovina y canina* (Tesis Doctoral). Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.
- Christensen BW, Troedsson MHT, Young LJ, et al. (2009). Effects of sociosexual environment on serum testosterone in captive male African rhinoceros. *Theriogenology* 71(7):1105-1111.
- Cinková I (2006). *Sexual, social and playful behavior of white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) in zoological garden* (Tesis Doctoral). Universidad de Palacký Olomouc, República Checa.
- Cockrem JF, Silverin B (2002). Sight of a Predator Can Stimulate a Corticosterone Response in the Great Tit (*Parus major*). *General and comparative endocrinology* 125(2):248–255.
- Cyr NE, Romero LM (2008). Fecal glucocorticoid metabolites of experimentally stressed captive and free-living starlings: Implications for conservation research. *General and Comparative Endocrinology* 158(1):20–28.
- De Geyter C, De Geyter M, Huber PR, et al. (2002). Reproductive endocrinology: Progesterone serum levels during the follicular phase of the menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. *Human Reproduction* 17(4):933.
- Edwards DP (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annual Review of Physiology* 67:335-376.
- Emslie R, Milliken T, Talukdar B, et al. (2016). African and Asian Rhinoceroses – Status, Conservation and Trade. A report from the IUCN Species Survival Commission (IUCN SSC) African and Asian Rhino Specialist Groups and TRAFFIC to the CITES Secretariat pursuant to Resolution Conf. 9.14 (Rev. CoP15).
- Emslie, R. (2012). *Ceratotherium simum*. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Flauger B, Krueger K, Gerhards H, et al. (2010). Simplified method to measure glucocorticoid metabolites in faeces of horses. *Veterinary Research Communications* 34(2):185-195.
- Gomez A, Jewell E, Walker SL, et al. (2004). Use of salivary steroid analyses to assess ovarian cycles in an Indian rhinoceros at the national zoological park. *Zoo Biology* 23(6):501-512.

- Guzman C, Hernandez-Bello R, Morales-Montor J (2010). Regulation of steroidogenesis in reproductive, adrenal and neural tissues by cytokines. *Open Neuroendocrinology Journal* 3:161-169.
- Kelling AS, Allard SM, Kelling NJ, et al. (2012). Lion, ungulate, and visitor reactions to playbacks of lion roars at zoo atlanta. *Journal of applied animal welfare science* 1:313–328.
- Konjevic D, Janicki Z, Slavica A, et al. (2011). Non-invasive monitoring of adrenocortical activity in free-ranging fallow deer (*Dama dama L.*). *European Journal of Wildlife Research* 57(1):77-81.
- Kretzschmar P, Ganslober U, Dehnhard M (2004). Relationship between androgens, environmental factors and reproductive behavior in male white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Hormones and Behavior* 45(1):1-9.
- Lequin RM (2005). Enzyme Immunoassay (EIA) / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* 51(12): 2415-2418.
- Linklater WL, MacDonald EA, Flamand J, et al. (2010). Declining and low fecal corticoids are associated with distress, not acclimation to stress, during the translocation of African rhinoceros. *Animal Conservation* 13(1):104-111.
- Maggio ET (1987). *Enzyme Immunoassay* (pp:1-3). CRC Press: Florida.
- Manteca X (2015). *Bienestar de Animales de Zoológico. Conceptos e indicadores* (pp:67-70). Barcelona, España: Multimédica ediciones veterinarias.
- Martínez L (2013). *Efecto del habitat sobre la endocrinología gonadal y adrenal en el rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*)* (Tesis Doctoral). Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Menargues MA, Urios V, López M, et al. (9-10 Junio, 2006). Determinación del bienestar animal a través del cortisol en saliva en el elefante asiático y el rinoceronte indio. Póster presentado en la Reunión de AIZA. Asociación Ibérica de Zoos y Acuarios, Lisboa.
- Metrione, L. and Eyres, A. (Eds.) (2014). *Rhino Husbandry Manual*. (pp:40) Fort Worth, TX: International Rhino Foundation
- Mickzek KA, Oliver B. Neurochemical bases of aggression (1998). En: Dodman NH, Shuster L (Eds.) *Psychopharmacology of Animal Behaviour Disorders*. Malden, Massachusetts: Blackwell Science; 17-41
- Miller MA, Buss PE (2014). Rhinoceridae (Rhinoceroses). En: Miller RE, Fowler ME (Eds.) *Fowler's Zoo and Wildlife Medicine* (1st ed., pp:538-539). Missouri: Saunders Elsevier.
- Moberg GP (1991). How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science* 74(1):304-311.

- Morden C, Weladji RB, Ropstad E et al. (2011). Fecal hormones as a non-invasive population monitoring method for reindeer. *Journal of Wildlife Management* 75(6):1426-1435.
- Moreno A, Silván G, Illera JC (2011). *Endocrinología de pequeños animales*. Madrid: LID Editorial empresarial SL.
- Möstl E, Messmann S, Bagu E et al. (1999). Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe A* 46(10):621-631.
- Munro CJ, Lasley BL (1988). Technology and application in polypeptide and steroid hormones detection. En: Albertson BD, Haseltine FP (Eds.) *Non radiometric methods for immunoassay of steroid hormones*. New York: Liss Inc.; 289-329.
- Newberry RC (1995). Environmental Enrichment: Increasing the Biological Relevance of Captive Environments. *Applied animal behaviour science* 44:229-243.
- Norris DO (2007). *Vertebrate Endocrinology* (4th ed.) London: Elsevier Academic Press.
- Ostrander MM, Ulrich-Lai Y, Choi DC, et al. (2006). Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology* 147(4):2008-2017.
- Owen-Smith R (1973). The behavioural ecology of the white rhinoceros (Tesis Doctoral). Universidad de Wisconsin, Madison, EEUU.
- Owen-Smith R (1975). The social ethology of the white rhinoceros *Ceratotherium simum* (Burchell 1817). *Zeitschrift Für Tierpsychologie* 38(4):337-384.
- Palme R, Möstl E (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *International Journal of Mammals Biology* 62(2):192-197.
- Petrowski K, Wintermann G, Siepmann M (2012). Cortisol response to repeated psychosocial stress. *Applied Psychophysiology and Biofeedback* 37(2):103-107.
- Rachlow JL, Berkeley EV, Berger J (1998). Correlates of male mating strategies in white rhinos (*Ceratotherium simum*). *Journal of Mammalogy* 79(4):1317-1324.
- Rafacz ML, Santymire RM (2014). Using odor cues to elicit a behavioral and hormonal response in zoo-housed African wild dogs. *Zoo biology* 33(2):144-149.
- Randall D, Burggren W, French K (1998). Eckert. *Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones* (2^a ed.) Madrid, España, McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; 357-360.
- Reading RP, Miller B, Shepherdson D (2013). The Value of Enrichment to Reintroduction Success. *Zoo biology* 32:332-341.
- Rothschild DM, Serfass TL, Seddon WL, et al. (2008). Using fecal glucocorticoids to assess stress levels in captive river otters. *Journal of Wildlife Management* 72(1):138-142.

- Rubinow DR, Schmidt PJ (1996). Androgens, brain, and behavior. *The American Journal of Psychiatry* 153(8):974-984.
- Salvador A (2012). Steroid hormones and some evolutionary-relevant social interactions. *Motivation and Emotion* 36(1):74-83.
- Schwarzenberger F (2007). The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook* 41(1):5274.
- Schwarzenberger F, Walzer C, Tomasova K, et al. (1999). Can the problems associated with the low reproductive rate in captive white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) be solved within the next 5 years? *Verhandlungsbericht über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere* 39:283-289.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, et al. (2011). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166(4):869887.
- Silbernagl S, Despopoulos A (2008). *Fisiología Texto y Atlas* (7^a ed., pp:270, 296-298.) Madrid, España, Editorial Médica Panamericana S.A.
- Silván G (1991). *Correlaciones entre tamaño folicular y niveles de hormonas esteroideas en ganado vacuno* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Thanos PK, Cavigelli SA, Michaelides M, et al. (2009). A non-invasive method for detecting the metabolic stress response in rodents: Characterization and disruption of the circadian corticosterone rhythm. *Physiological Research* 58(2):219-228.
- Tresguerres JAF (1989). *Fisiología endocrina* (pp:204-217). Madrid, España, Eudema S.A.
- Tsai MJ, O'Malley B (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Revision Biochemistry* 63:451-486.
- Tubbs C, Hartig P, Cardon M, et al. (2012). Activation of southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) estrogen receptors by phytoestrogens: Potential role in the reproductive failure of captive-born females? *Endocrinology* 153(3):1444-1452.
- Turner JW, Tolson P, Hamad N (2002). Remote assessment of stress in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*) by measurement of adrenal steroids in feces. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33(3):214-221.
- Vasadze L, Petriashvili E, Museliani T, et al. (2007). Action of ACTH fragment on the rates aggressive behavior and the distribution of transmitter amino acids in the brain structures. *Georgian Medical News* 152:45-47.
- Weibel L, Maccari S, Van Reeth O (2002). Circadian clock functioning is linked to acute stress reactivity in rats. *Journal of Biological Rhythms* 17(5):438-446.

- Weingrill T, Willems EP, Zimmermann N, et al. (2011). Species-Specific Patterns In Fecal Glucocorticoid And Androgen Levels In Zoo-Living Orangutans (*Pongo spp.*). *General and comparative endocrinology* 172(3):446–457.
- Wells DL (2009). Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: a review. *Applied animal behaviour science* 118:1–11.
- Wingfield JC, Kitaysky AS (2002). Endocrine responses to unpredictable environmental events: Stress or anti-stress hormones? *Integrative and Comparative Biology* 42(3):600-609.
- Wingfield JC, Lynn SE, Soma KK (2001). Avoiding the costs testosterone: Ecological bases of hormone-behavior interactions. *Brain, Behavior and Evolution* 57(5):239-251.

Webgrafía

- www.bioweb.ie. Pros and Cons of Zoo Enrichment Programme. Consultado el 18/09/2017.
- www.eaza.net. TAGs and Breeding programmes, European Association of Zoos and Aquaria. Consultado el 05/11/2017.
- www.iucnredlist.org. The IUCN Red List of Threatened Species. Consultado el 08/11/2017.
- www.diariosur.es. Artículo “Una Jubilación feliz para Rómulo”. Consultado el 21/11/2017
- www.meditacionesdeldia.com. Artículo “Sobre las cárceles que nos construimos”. Consultado el 21/11/2017.
- www.sevilla.abc.es. Artículo “Rómulo, el rinoceronte que cambió Valencia por Sevilla”. Consultado el 21/11/2017.

