

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Seguimiento del ciclo estral en *Choloepus hoffmanni* en
cautiverio en Costa Rica, mediante la medición de metabolitos
fecales de progesterona y estradiol**

Modalidad: Tesis

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

SOFIA HERRA VARGAS

**Tutora: Dra. Marcela Suárez
Co-tutora: Dra. Laura Castro
Lectores: Dr. Mario Baldi
Dra. Laura Bouza**

Campus Pbro. Benjamín Núñez

2015

TRIBUNAL EXAMINADOR

Ma. Antonieta Corrales, MSc.
Decana Facultad de Ciencias de la Salud

Nancy Astorga, Lic.
Directora Escuela de Medicina Veterinaria

Marcela Suárez, MSc.
Tutora

Laura Castro, PhD.
Co-tutora

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mario Baldi', is written over a horizontal line.

Mario Baldi, MSc.
Lector

Laura Bouza, MSc.
Lectora

Fecha: _____

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo los animales silvestres, que tienen el mismo derecho del hombre de habitar este planeta, pero irónicamente dependen de él para asegurar su lugar en el mundo.

AGRADECIMIENTO

Le agradezco al Fondo Institucional de Desarrollo Académico (FIDA) por proveer los fondos para llevar a cabo esta investigación.

Al “Sloth Sanctuary” por confiar en nosotros, abrirnos las puertas para llevar a cabo esta investigación en sus instalaciones, dejarnos trabajar con sus preciados perezosos y finalmente, colaborar con nuestras solicitudes. Además al Dr. Francisco Arroyo por guiarnos en la manipulación de los animales, así como mostrarse siempre muy atento e interesado con nuestro estudio.

Al Laboratorio de Análisis Clínico de la Escuela de Medicina Veterinaria, quienes nos procesaron las muestras siempre lo más pronto posible y con la mejor disposición.

A Adrián Zamora, Osvaldo Campos, Sergio Cuadra y Andrés Villalobos, quienes nos acompañaron varias veces en las giras y nos ayudaron de distintas maneras.

Al Instituto Meteorológico Nacional por facilitarnos los datos solicitados.

A mi Comité Asesor por ayudarme insistentemente con sus consejos y correcciones, porque gracias a ellos me siento completamente orgullosa del producto de mi tesis. Principalmente a Marce porque me enseñó a disfrutar y entender un poco más la ciencia.

A Esteban porque fue una salvada contar con él, como amigo y estadista.

A Mario por impulsarme a luchar por distintas metas durante la carrera, entre ellas arriesgarme a hacer una tesis.

A Miguel por ser mi motor emocional.

Finalmente, le agradezco a mi familia por ser mi motor motivacional e intelectual. Sobre todo a mi mamá, quien es mi fuente de inspiración inagotable.

ÍNDICE

TRIBUNAL EXAMINADOR	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	4
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo General.....	5
1.3.2. Objetivos Específicos	6
1.4. Hipótesis	6
1.4.1. Hipótesis nula.....	6
1.4.2. Hipótesis alterna.....	6
2. METODOLOGÍA.....	7
2.1. Selección del sitio de muestreo	7
2.2. Selección de los individuos.....	8
2.3. Toma de muestras fecales.....	8
2.5. Análisis hematológico y de química clínica.....	10
2.6. Procesamiento de las muestras sanguíneas en el equipo AIA 360.....	11
2.7. Extracción hormonal a partir de las heces.....	11

2.8. Procesamiento de las extracciones fecales con en el equipo AIA 360®	12
2.9. Confiabilidad del método: eficiencia de la extracción y repetibilidad de las mediciones	13
2.9.1. Porcentaje de recuperación de la hormona.....	13
2.9.2. Coeficiente de variación intra-ensayo	14
2.9.3. Dilución de la solución madre de la extracción fecal (SMF)	14
2.10. Comportamiento del ciclo estral.....	14
2.11. Análisis estadístico de los resultados.....	15
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Hematología y química clínica	17
3.2. Mediciones hormonales en heces.....	18
3.2.1. Confiabilidad del método: eficiencia de la extracción y repetibilidad de las mediciones	18
3.2.2. Determinación de la concentración hormonal en heces	19
3.2.3. Comportamiento del ciclo estral	21
3.2.4. Correlación entre la concentración hormonal de progesterona en sangre y en heces	25
4. DISCUSIÓN	26
4.1. Hematología y química clínica.....	26
4.2. Mediciones hormonales en heces.....	27
4.2.1 Confiabilidad del método: eficiencia de la extracción y repetibilidad de las mediciones	27
4.2.2. Determinación de la concentración hormonal en heces	29
4.2.3. Comportamiento del ciclo estral	32
4.2.4. Correlación entre la concentración hormonal de progesterona en sangre y en heces	34
5. CONCLUSIONES.....	36
6. RECOMENDACIONES.....	37
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
8. ANEXOS.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1:** Identificación y peso de cada una de las hembras *C. hoffmanni* incluidas en el estudio de esteroides en heces, durante las visitas al Sloth Sanctuary de noviembre a diciembre del 2013..... 8
- Cuadro 2:** Promedio (\bar{X}) y su IC95% de los valores de hematología de 19 hembras *C. hoffmanni* durante las visitas de noviembre y diciembre del 2013 en Sloth Sanctuary..... 17
- Cuadro 3:** Promedio (\bar{X}) y su IC95% de los valores de química sanguínea de 19 hembras *C. hoffmanni* durante las visitas de noviembre a diciembre del 2013 en Sloth Sanctuary..... 18
- Cuadro 4:** Promedio (\bar{X}) y su IC 95% para los valores de progesterona y estradiol plasmáticos de los 5 individuos *C. hoffmanni* durante noviembre y diciembre del 2013 en Sloth Sanctuary..... 18
- Cuadro 5:** Promedios (\bar{X}), valores mínimos y máximos (rango) de la concentración de progesterona y estradiol de los 5 individuos *C. Hoffmanni* durante noviembre, diciembre y enero de 2013-2014en Sloth Sanctuary. 19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Descripción gráfica de los promedios e IC95% de P ₄ GH entre los 5 individuos <i>C. hoffmanni</i> durante noviembre, diciembre y enero de 2013-2014 en Sloth Sanctuary.....	20
Figura 2: Descripción gráfica de los promedios e IC 95% de la E ₂ GH (pg/g) entre los 5 individuos <i>C. hoffmanni</i> durante noviembre, diciembre y enero de 2013-2014 en Sloth Sanctuary.....	20
Figura 3: Concentración de P ₄ GH (ng/g) y E ₂ GH (pg/g) de Dora durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.....	21
Figura 4: Concentración de P ₄ GH (ng/g) y E ₂ GH (pg/g) de Lil Angel durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.....	22
Figura 5: Concentración de P ₄ GH (ng/g) y E ₂ GH (pg/g) de Maddie durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.....	22
Figura 6: Concentración de P ₄ GH (ng/g) y E ₂ GH (pg/g) de Madison durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.....	23
Figura 7: Concentración de P ₄ GH (ng/g) y E ₂ GH (pg/g) de Melaza durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.....	23
Figura 8: Estimación del ciclo estral en Dora y Lil Angel durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014 en Sloth Sanctuary. Las estrellas negras indican los momentos en los que ocurren picos de P ₄ GH.	25

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

E₂GH: concentración de estradiol por gramo de heces

EMV: Escuela de Medicina Veterinaria

ETOH: etanol

IC95%: intervalo de confianza al 95%

MAC: Multi Analyte Control (suero de concentración conocida)

ng/g: nanogramos por gramo

P₄GH: concentración de progesterona por gramo de heces

pg/g: picogramos por gramo

SMF: solución madre de la extracción fecal

\bar{X} : Promedio

RESUMEN

El análisis de esteroides fecales es un método no invasivo que permite conocer el estado fisiológico del individuo. Actualmente, existe poca información disponible acerca del comportamiento reproductivo del perezoso de dos dedos, *Choloepus hoffmani*. Este estudio se realizó en individuos en cautiverio con el fin de (i) conocer si la extracción de progesterona y estradiol a partir de heces y su medición por medio del equipo AIA-360[®] funcionan como una técnica confiable y (ii) determinar si existe correlación entre las mediciones hormonales en plasma y las extracciones de muestras fecales.

El muestreo se realizó de noviembre de 2013 a enero de 2014, en el centro de rescate “Sloth Sanctuary” en Cahuita, Limón, Costa Rica. Se analizaron 269 muestras de heces y 18 de sangre, provenientes de cinco hembras sexualmente maduras.

Tras la extracción hormonal fecal, se obtuvo un promedio de 217,46 ng/g (IC95%: 132,31 – 302,61 ng/g) de progesterona y 1704,04 pg/g (IC95%: 1597,29-1810,79 pg/g) de estradiol.

No se observó un efecto del individuo sobre las concentraciones fecales de estradiol ni progesterona. No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la progesterona plasmática y la fecal; sin embargo, los datos sugieren que la concentración hormonal plasmática se ve reflejada en heces hasta los dos días posteriores al evento sanguíneo. La duración promedio del ciclo estral se estimó en 24,80 días (IC95%: 12,34 ± 37,26 días).

Se pudo demostrar que la técnica propuesta permite la detección exitosa y el seguimiento de variaciones hormonales, aunque no reemplaza las mediciones plasmáticas para determinar valores absolutos.

ABSTRACT

The use of fecal steroids measurement is a non-invasive approach that has increased the comprehension of the physiology of several species. Currently, very little is known about the reproductive performance of the two-toed sloth, *Choloepus hoffmani*. This study was conducted in captive specimens in order to determine (i) the reliability of the fecal progesterone and oestrogen extraction and its quantification with an AIA-360[®] analyzer, and (ii) if there is a correlation between fecal and plasmatic steroids.

The study was performed from November 2013 to January 2014 at the “Sloth Sanctuary” (Cahuita, Limón, Costa Rica). A total of 269 fecal samples and 18 blood samples were collected from five sexually mature females.

The average concentration of progesterone was 217.46 ng/g (IC95%: 132.31 – 302.61 ng/g) and of oestradiol was 1704.04 pg/g (IC95%: 1597.29-1810.79 pg/g). No specific individual effect was observed.

There was no strong statistical correlation between the fecal and plasmatic progesterone, however the data suggest that the plasmatic events are revealed in the fecal samples obtained two days afterwards. The ovarian cycle was 24.80 days in average (IC95%: 12.34 ± 37.26 days).

The results demonstrate that the proposed technique allows the successful detection and follow up of hormonal variations, although it does not replace the plasmatic measurement as a technique to determine absolute values.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El conocer las características reproductivas de una especie silvestre mantenida bajo condiciones de cautiverio, resulta fundamental para comprender su etología, ecología y conservación (Paris et al., 2002; Graham, 2004; Dias et al., 2007), parámetros que a su vez son fundamentales para implementar programas de manejo y reproducción asistida. Para ello, es imprescindible entender la información reproductiva básica como las características del ciclo estral, la edad del inicio de la pubertad, y el tiempo de gestación, entre otros (Graham, 2004; Palme, 2005; Pereira et al., 2005; Touma y Palme, 2005; Dumonceaux et al., 2006; Dias et al., 2007, Schwarzenberger, 2007).

El estudio y la descripción de los patrones endocrinos son fundamentales para establecer la biología reproductiva de cualquier especie (Graham, 2004). Tradicionalmente, esto se ha logrado a partir de la medición de hormonas circulantes en sangre (Palme, 2005; Goymann, 2012). Sin embargo, por las implicaciones que representan la manipulación física y química en los animales silvestres, ha resultado ventajosa la posibilidad de determinar el estado fisiológico, sin la necesidad de capturarlos y restringirlos físicamente (Goymann, 2012).

Por esta razón, se comenzaron a desarrollar en las dos últimas décadas, varias técnicas destinadas al análisis de esteroides fecales (Graham et al., 2001; Keay et al., 2006; Schwarzenberger, 2007; Goymann, 2012). Dentro de las ventajas de este método, sobresale el hecho de ser una técnica no invasiva, que facilita la recolección de múltiples muestras seriadas del individuo y que permite realizar estudios paralelos del comportamiento

reproductivo, sin los sesgos asociados al estrés por la manipulación del animal. Además, descarta el inconveniente de no obtener un volumen adecuado de sangre (Chelini et al., 2005; Goymann, 2005; Dumonceaux et al., 2006; Schwarzenberger, 2007).

Algunas aplicaciones reportadas sobre la extracción de esteroides fecales son: el monitoreo de la ciclicidad ovárica, el diagnóstico de problemas de fertilidad, la detección de preñez y la predicción del parto, entre otros (Graham et al., 2001; Schwarzenberger, 2007). También se menciona su uso en la cuantificación de glucocorticoides fecales como indicadores biológicos de la respuesta neuroendocrina al estrés (Keay et al., 2006; Schwarzenberger, 2007).

El método de análisis de esteroides fecales se basa en la detección de compuestos hormonales que sufren un proceso de metabolización a través del cuerpo, pero conservan su estructura esteroidea y por ello pueden ser detectados en las heces (Touma y Palme, 2005). Lo que se encuentra en la excreta es una acumulación de hormona metabolizada que representa la actividad gonadal durante varias horas previas (Graham, 2004; Keay et al., 2006). El tiempo que se requiere para detectar un aumento de metabolitos hormonales en heces desde que ocurre el pico en sangre, depende del tiempo de tránsito intestinal. Éste varía ampliamente entre especies e inclusive entre individuos de la misma especie según su dieta, sexo, metabolismo, entre otros. (Lanyon et al., 2005; Goyman, 2012). De igual manera, el tipo de metabolito excretado, así como la vía de excreción de cada uno de ellos, se suman a los factores que pueden variar la capacidad de detección (Graham, 2004).

Existe escasa información que describa la endocrinología reproductiva de animales silvestres del neotrópico, lo cual es sorprendente cuando se considera el hecho de que existen muchas especies en condiciones de cautiverio (Kusuda et al., 2011; Quesada, 2012).

Uno de los animales que presenta mayor número de individuos en cautiverio en Costa Rica es el perezoso. Esto se atribuye, en primer lugar, al hecho de que los perezosos pueden llegar a representar hasta un 67% del total de la biomasa de vertebrados en algunos bosques neotropicales (Vaughan et al., 2007), siendo el perezoso de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*) uno de los mamíferos más abundantes en las zonas boscosas de Costa Rica (Wainwright, 2007). En segundo lugar, son animales propensos a sufrir accidentes (electrocución, atropellos, ataques por otros animales, entre otros), por lo que incluso a nivel nacional se han conformado centros de rescate dedicados específicamente a su conservación, rehabilitación y reintroducción al medio ambiente.

La lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2014), cataloga a *C. hoffmanni* como una especie de “preocupación menor”. Si bien es cierto que posee una gran capacidad de tolerar la modificación en su ecosistema (por la deforestación y la fragmentación del hábitat), se dice que su estado podría cambiar rápidamente a la categoría “vulnerable”, si no se toman medidas o se hacen esfuerzos por promover su conservación (Wainwright, 2007; Hayssen, 2011; IUCN, 2014;). Adicionalmente, la existencia de un gran número de perezosos en cautiverio hace de esta población un grupo de mamíferos ideal para poder llevar a cabo investigaciones de nuevas técnicas no invasivas, que se podrán usar en el estudio de otras especies de vertebrados tanto en cautiverio como en sus hábitats naturales.

Existen pocos estudios disponibles que se refieran a los aspectos reproductivos y endocrinos de los perezosos (Gilmore et al., 2000; Mühlbauer et al., 2006; Snoek et al., 2011; Quesada, 2012; Troll et al., 2013). Según Snoek y colaboradores (2011), esto podría deberse al comportamiento críptico de la especie, lo cual dificulta su estudio en vida libre.

Además, la literatura reporta que las hembras de *C. hoffmanni* carecen de características sexuales secundarias o una clara evidencia del celo: la edematización de la vulva es sutil y las secreciones vaginales no son copiosas (Gilmore et al., 2000).

A pesar de ello, los hallazgos reportados por distintos autores (Taube et al., 2001; Wainwright, 2007) coinciden en que las hembras alcanzan su madurez sexual a la edad de dos años, mientras que los machos hasta los cuatro años. Por otro lado, la duración de la gestación ronda los 11 meses, el periodo de lactancia un mes y las crías suelen mantenerse al lado de la madre hasta los cinco meses de edad. Finalmente, Taube y colaboradores (2001) sugieren que la reproducción de *C. hoffmanni* en vida libre sigue un patrón de estacionalidad, siendo más comunes los embarazos durante la época lluviosa y los partos durante los meses más secos.

1.2. Justificación

En Costa Rica, los animales silvestres viven bajo constante amenaza por el incremento en las actividades antropogénicas como fragmentación del hábitat, cambio en las técnicas de agricultura, urbanización, entre otros (Vaughan et al., 2007; Wainwright, 2007). Dichos factores se asocian directamente con un descenso de algunas poblaciones de vertebrados en vida libre.

Estas condiciones implican que en un futuro cercano, una de las medidas para tratar de reducir la pérdida de especies a un ritmo acelerado, sea la reproducción de manera asistida bajo condiciones de cautiverio. Para ello, resultan trascendentales investigaciones que ayuden a conocer los parámetros reproductivos de *C. hoffmanni* y otras especies de animales silvestres.

Distintos autores aseguran que los métodos tradicionales para conocer el estado hormonal, como la citología vaginal, la colecta de orina y la toma de muestra sanguínea, se dificultan en *C. hoffmanni* por su conducta agresiva (Snoeck et al., 2011; Troll et al., 2013). Por esto, la colecta de heces y el análisis hormonal a partir de ellas, es la prueba más adecuada para realizar un monitoreo prolongado del comportamiento hormonal.

En Costa Rica se cuenta con un estudio preliminar sobre la endocrinología reproductiva de las dos especies de perezosos presentes en el país (Quesada, 2012); dicha investigación se basó en hallazgos de ultrasonografía, citología vaginal y medición hormonal en plasma, para intentar determinar la etapa del ciclo reproductivo en la que se encontraban las ocho hembras de vida libre estudiadas.

En vista de que en algunos casos solamente contaban con una muestra por individuo, no fue posible establecer una correlación entre las concentraciones hormonales y las citologías vaginales. Debido a esto, Quesada (2012) recomendó realizar un monitoreo más prolongado y con una revisión de los animales al menos cada quince días, para obtener resultados más específicos en estudios posteriores; también sugirió el uso del análisis hormonal por medio de las heces para disminuir el estrés de los individuos.

Por los aspectos mencionados, se consideró valioso usar una población de *C. hoffmanni* como modelo para conocer la biología reproductiva de esta especie y estandarizar nuevos métodos de muestreo hormonal no invasivos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Realizar un seguimiento del ciclo estral de *C. hoffmanni* en cautiverio por medio de la cuantificación de metabolitos de hormonas sexuales en heces.

1.3.2. Objetivos Específicos

- 1.3.2.1.* Estandarizar el protocolo y las condiciones del método de extracción y medición de metabolitos de hormonas sexuales en heces para que su análisis mediante el equipo AIA-360[®] sea efectivo.
- 1.3.2.2.* Elaborar curvas de la concentración de metabolitos de progesterona y estradiol en heces de *C. hoffmanni* en cautiverio, que contribuyan al conocimiento de los aspectos reproductivos de esta especie y sirvan como referencia para estudios posteriores.
- 1.3.2.3.* Comparar los resultados de medición hormonal en heces y plasma, con el fin de detectar la técnica más confiable para el seguimiento reproductivo.

1.4. Hipótesis

1.4.1. Hipótesis nula

La extracción de hormonas en heces no sustituye los métodos tradicionales invasivos de seguimiento reproductivo en *C. hoffmanni* bajo condiciones de cautiverio.

1.4.2. Hipótesis alterna

La extracción y medición de hormonas en heces es una técnica confiable y eficiente que puede sustituir los métodos tradicionales de seguimiento reproductivo en *C. hoffmanni* bajo condiciones de cautiverio.

2. METODOLOGÍA

2.1. Selección del sitio de muestreo

El muestreo se llevó a cabo en “Sloth Sanctuary” (Aviarios del Caribe, Latitud N 9.799565 Longitud O 82.915112) en Cahuita, Limón, Costa Rica, durante los meses de noviembre del 2013 a enero del 2014. Este establecimiento es el único centro en el país que alberga exclusivamente perezosos, cuenta con una población cercana a 150 animales, 20 de ellos *Bradypus variegatus* y el resto, *C. hoffmanni*. Puesto que posee registros veterinarios detallados sobre la salud de cada animal y las hembras están albergadas en jaulas individuales que facilitan la identificación de las heces, fue posible la selección de aquellas hembras que cumplieran una serie de criterios de selección. Dicha institución estuvo anuente a participar activamente de la investigación (Anexo 1).

La dieta establecida en Sloth Sanctuary para todos los individuos *C. hoffmanni* consiste en vainicas (*Phaseollus vulgaris*), chayote (*Sechium edule*), zanahoria (*Daucus carota*) y berros chinos (*Nasturtium officinale*). Los recintos miden dos metros de ancho, tres metros de fondo y dos metros de alto. Se encuentran distribuidos uno junto al otro en un espacio de acceso limitado del refugio. Son de cemento y poseen paredes de malla, de manera que los animales están en constante contacto visual y olfatorio entre sí; dentro de los recintos hay una estructura metálica, así como una tarima y ramas para que se desplacen.

2.2. Selección de los individuos

De manera preliminar se seleccionaron 19 hembras *C. hoffmanni* sexualmente maduras (entre los cuatro y los 12 años de edad) y sin historia de padecimientos recientes. Los individuos elegidos tuvieron que cumplir con los siguientes criterios de selección: i) estar bajo el mismo manejo en condiciones de cautiverio durante el estudio, ii) mantener el mismo régimen nutricional durante el periodo mencionado y iii) encontrarse albergados en jaulas individuales.

Los 19 individuos elegidos preliminarmente fueron incluidos en el estudio de hematología y química sanguínea. A partir de este grupo, se seleccionaron cinco hembras para el análisis de esteroides fecales (Cuadro 1), porque que de estas ellas se contó con mayor cantidad de muestras de heces.

Cuadro 1: Identificación y peso de cada una de las hembras *C. hoffmanni* incluidas en el estudio de esteroides en heces, durante las visitas al Sloth Sanctuary de noviembre a diciembre del 2013.

Nombre	Nº. de caso	Edad estimada	Pesos por visita (Kg)		
			14.11.13	28.11.13	12.12.13
Dora	26909	5 años	5,6	5,7	5,9
Lil Angel	6404	11 años	7,2	7,3	7,7
Maddie	C7304	11 años	7,9	7,4	7,5
Madison	29610	4 años	5,2	5,5	5,3
Melaza	3802	12 años	5,1	5,0	4,9

2.3. Toma de muestras fecales

Las heces de los individuos de interés fueron recolectadas por el personal del centro de rescate cada vez que defecaron. A estos funcionarios, se les indicó que las muestras

debían ser guardadas en bolsas estériles, identificadas de forma apropiada y congeladas inmediatamente a -20°C . Las heces fueron recolectadas cada 15 días, cuando se visitó el establecimiento para tomar las muestras sanguíneas. Las muestras fueron transportadas a 4°C hasta el Laboratorio de Endocrinología y Biotecnología Reproductiva de la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV), Universidad Nacional de Costa Rica, en Heredia, donde se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

2.4. Toma de muestras sanguíneas

Se tomaron muestras sanguíneas cada 15 días durante un período de tres meses (noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014). Todas las intervenciones se llevaron a cabo por un veterinario que forma parte del equipo de la investigación, bajo la supervisión del médico regente del Santuario de Perezosos y siguiendo las regulaciones de la Comisión de Bienestar Animal y Bioética de la EMV (Anexo 2).

El protocolo a seguir con cada animal, fue el siguiente:

- a. *Sedación del animal.* Los animales muestreados se sedaron previamente con clorhidrato de medetomidina (1,0 mg/ml; Domitor[®]; dosis: 0,02 mg/kg) en combinación con clorhidrato de ketamina (100mg/mL; Bremer Pharma GmbH[®]; dosis: 2,5 mg/kg), vía intramuscular (Hanley, 2008).
- b. *Pesaje y evaluación física del animal.* Para pesar al animal, este se colocó sobre una cesta adaptada a una balanza. Seguidamente, el animal se trasladó a una mesa de exploración y se le realizó el examen objetivo general, mediante el cual se valoró condición física en escala del uno al cinco (siendo uno el valor más bajo y cinco en más alto), frecuencias cardíaca y respiratoria, y se examinó el cuerpo en búsqueda de heridas

o anomalías evidentes. Finalmente, se anotaron las características físicas que sugirieran que la hembra estuviera en celo.

- c. *Muestra sanguínea.* Las muestras fueron tomadas de la vena subclavia o alternativamente de la vena cefálica y se colectaron en un tubo estéril marca Vacuette® con heparina de litio como anticoagulante. De la muestra, se separaron 500 µL de sangre completa en un tubo de 1,5 mL y se colocaron a 4°C para su posterior análisis hematológico. El remanente se centrifugó a 3150 rpm en una centrífuga E8 Portafuge (LW Scientific®) durante 10 minutos para separar el plasma heparinizado, el cual se distribuyó en dos tubos de 1,5 mL en partes iguales, que se colocaron a 4°C para su posterior uso en medición hormonal y química sanguínea. Las muestras colectadas fueron transportadas en una hielera a 4°C hacia la EMV.
- d. *Reversión del efecto anestésico.* Con el fin de inducir una rápida recuperación de la sedación, se empleó atipamezol (Antisedan®; dosis: 0,1 mg/kg), vía intramuscular, para revertir el efecto de la medetomidina (Hanley, 2008).

2.5. Análisis hematológico y de química clínica

Las muestras de sangre completa y/o plasma fueron procesadas durante las 24 a 48 horas posteriores a su toma. A partir de la sangre completa se realizó hemograma completo, y del plasma se evaluó la concentración de proteínas totales, albúmina, nitrógeno ureico, creatinina, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). El

procesamiento se llevó a cabo según el procedimiento estándar del Laboratorio de Análisis Clínicos de la EMV.

2.6. Procesamiento de las muestras sanguíneas en el equipo AIA 360

Los plasmas heparinizados fueron procesados durante las 24 a 48 horas posteriores a su toma. Las mediciones hormonales se llevaron a cabo en el equipo de inmunoensayo automatizado AIA-360[®], según las indicaciones del fabricante. Tanto las concentraciones plasmáticas de progesterona y estradiol, como las de extracciones fecales, fueron medidas mediante el uso de copas comerciales ST AIA PACK PROG[®] y ST AIA PACK E2[®], marca Tosoh Bioscience.

El analizador AIA-360[®] permite realizar un ensayo competitivo fluorescente por inmunoabsorción ligado a enzimas. Las copas empleadas contienen perlas magnéticas impregnadas con anticuerpos, así como la hormona marcada con una enzima. De esta manera, la hormona o los metabolitos hormonales presentes en la muestra compiten contra la hormona marcada por los sitios de unión de los anticuerpos presentes en las perlas magnéticas. El equipo realiza un lavado, durante el cual las perlas son limpiadas y de esta forma se remueve la hormona marcada no unida. Seguidamente se agrega el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato y se incuba. La cantidad de enzima que se une a las perlas es inversamente proporcional a la concentración de hormona en la muestra.

2.7. Extracción hormonal a partir de las heces

El protocolo de extracción hormonal a partir de las heces se basó en el recomendado por Brown y colaboradores (2009), a partir de muestras húmedas. La muestra de heces completa fue homogenizada y de ella se tomaron 0,5 g que fueron pesados en una balanza

analítica marca Adam PGW 153e[®] y colocados en un tubo cónico de 50 mL. Posteriormente se añadieron cinco mililitros de etanol (ETOH) al 90% y se colocó en un Thermomixer (Eppendorf[®]) a 96°C durante 20 minutos; seguidamente se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos, se recuperó el sobrenadante (sobrenadante n° 1).

Al precipitado remanente se le añadieron otros cinco mL de ETOH 90% y se sometió de nuevo a centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló con el “sobrenadante n° 1”; esta mezcla se colocó a 56°C, durante 60 minutos, bajo un flujo de aire, con el fin de evaporar la totalidad del ETOH.

Al material remanente se le agregó un mililitro de solución salina estéril y se colocó 15 minutos en un sonicador Branson[®] para su dilución completa. Esta solución se consideró la solución madre de extracción fecal (SMF) y a partir de ella se realizaron diluciones 1:3. El Anexo 3 muestra los pasos de la extracción hormonal detalladamente.

2.8. Procesamiento de las extracciones fecales con en el equipo AIA 360[®]

Se tomó un mililitro de las diluciones de SMF y se procesó de acuerdo con el procedimiento descrito previamente en el punto 2, inciso 7.

Finalmente, tanto las SMF como las diluciones, se congelaron para conformar un banco de extracciones fecales que puedan ser usadas posteriormente para el análisis de otros metabolitos hormonales.

2.9. **Confiability del método: eficiencia de la extracción y repetibilidad de las mediciones**

Durante la etapa de estandarización del protocolo se evaluó la eficiencia del método de extracción y de la medición de hormonas en heces. Se analizó el porcentaje de recuperación de la hormona, la repetitividad de los resultados y finalmente, la congruencia entre los resultados de heces y plasma.

2.9.1. *Porcentaje de recuperación de la hormona*

Para determinar el porcentaje de recuperación, se compararon los resultados hormonales de tres muestras distintas: un control comercial de concentración conocida MAC (por sus siglas en inglés: Multi Analyte Control), una muestra fecal a la cual se le añadió una cantidad determinada del MAC (denominada muestra bautizada) y la misma muestra de heces por sí sola.

El MAC funciona en primera instancia como un control de calidad del analizador AIA-360[®], pues al conocer la concentración hormonal del mismo, permite garantizar que el equipo está detectando la cantidad adecuada de hormona. Tanto la muestra de heces “bautizada” como la intacta, se sometieron a la extracción hormonal tal y como se explicó en el punto 2, inciso 7.

Una vez obtenidos los resultados de las mediciones hormonales, al total hormonal de la muestra bautizada se le restó el valor de la muestra de heces sola. Ese valor se dividió entre el resultado hormonal del MAC y seguidamente se multiplicó por 100. Un porcentaje de recuperación menor a 80% se consideró no apto (Brown et al., 2009).

$$\text{Porcentaje Recuperación} = \frac{([Muestra\ Bautizada] - [Muestra\ Heces])}{[MAC]} \times 100$$

2.9.2. *Coefficiente de variación intra-ensayo*

Éste permite detectar la precisión del análisis, o bien la repetitividad de los resultados. Se evaluó repitiendo una misma extracción cuatro veces en el analizador AIA-360[®], se calculó la desviación estándar y posteriormente se dividió ese resultado entre 100. Según Brown y colaboradores (2009), el coeficiente de variación intra-ensayo es subjetivo y debe ser determinado para cada estudio en particular, dependiendo de qué tan crítica deba ser la interpretación de los datos. Se sugiere que se use un coeficiente cercano al 10%.

2.9.3. *Dilución de la solución madre de la extracción fecal (SMF)*

La SMF se sometió a diluciones seriadas 1:3 (1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:729, 1:2187), con el fin de determinar cuál ofrecía una mejor detección de la hormona en el equipo AIA-360[®]. Se realizó este procedimiento en forma pareada con el MAC con el fin de analizar el paralelismo entre ambas diluciones. Se utilizó solución salina fisiológica como diluyente y las diluciones contaron con un volumen final de 600 μ L.

2.10. **Comportamiento del ciclo estral**

Para estimar la duración del ciclo estral, se repitió la metodología empleada por Troll y colaboradores (2013) a partir de la concentración de progesterona fecal. Se clasificaron como “altos” aquellos valores que fueron mayores a 1,5 veces la desviación estándar del promedio para cada individuo y como “medios” a los que fueron inferiores a ese mismo dato. Se consideró que cada valor “alto” representó un pico de progesterona en plasma y por tanto, el tiempo transcurrido entre picos de progesterona sugirió la duración de un ciclo estral.

Con el fin de analizar variaciones climáticas que puedan favorecer un comportamiento estacional en los perezosos de dos dedos (Taube et al., 2001), se solicitó la información histórica de temperatura, precipitación total media y promedio de días con lluvia registrados por el Instituto Meteorológico Nacional, entre enero de 1970 hasta diciembre del 2013 en la estación de Limón.

2.11. **Análisis estadístico de los resultados**

Los resultados de las muestras sanguíneas y fecales fueron ordenados y analizados con métodos estadísticos descriptivos: uso de gráficos y cuadros, cálculo de promedios, medianas, desviación estándar, intervalos de confianza (95%), valores mínimos y máximos de cada variable.

El efecto del individuo sobre la cantidad de hormona presente en heces, se calculó por las diferencias entre los promedios de la concentración hormonal entre cada individuo. Para ello se computó la diferencia promedio para cada par de individuos con su intervalo de confianza al 95% (IC95%); si dicha diferencia no incluyó al cero, se consideró posible que los promedios no fueran diferentes. Todas las interpretaciones se hicieron con base en criterios veterinarios, tomando en cuenta la posición y amplitud de los intervalos de confianza.

Para determinar el grado de correlación entre las muestras de sangre y las de heces se realizó la prueba de correlaciones de Spearman como método no paramétrico entre estas dos variables, ya que no siguen una distribución normal. Se decidió tomar en consideración las muestras fecales del mismo día de la toma sanguínea, así como los cuatro días siguientes. Se calculó el valor de correlación entre las muestras tomadas de sangre y las

muestras provenientes de heces, así como el IC95%. Se interpretó la amplitud y posición de estos intervalos de confianza al 95% de confianza.

Para todos los análisis mencionados se utilizó el programa estadístico R 3.1.2 (R Core Team, 2014). Para la realización de gráficos se utilizó el paquete “qqplot2” (Wickham, 2009).

3. RESULTADOS

3.1. Hematología y química clínica

La realización de exámenes de sangre permitió efectuar un control continuo de la salud de los individuos, a pesar de que se emplearon solamente hembras sin registro de signos de enfermedad, lesiones o falta de apetito durante los seis meses previos al estudio. Asimismo, estos datos aportaron información valiosa que permitió avanzar en el conocimiento biológico de la especie. Se analizaron un total de 57 muestras sanguíneas, cuyos resultados de hematología se muestran en el Cuadro 2, y los resultados correspondientes al análisis de química sanguínea se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 2: Promedio (\bar{X}) y su IC95% de los valores de hematología de 19 hembras *C. hoffmanni* durante las visitas de noviembre y diciembre del 2013 en Sloth Sanctuary.

Variable	$\bar{X} \pm \text{IC95\%}$
Hematocrito (%)	35 \pm 1
Hemoglobina (g/dl)	10,95 \pm 0,24
Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dl)	31 \pm 1
Conteo de leucocitos (μl)	12502 \pm 1242
Neutrófilos en banda (μl)	0 \pm 0
Neutrófilos segmentados (μl)	3123 \pm 649
Eosinófilos (μl)	491 \pm 429
Basófilos (μl)	115 \pm 52
Linfocitos (μl)	8764 \pm 1065
Monocitos (μl)	0 \pm 0
Conteo de plaquetas (μl)	173130 \pm 100677

Cuadro 3: Promedio (\bar{X}) y su IC95% de los valores de química sanguínea de 19 hembras *C. hoffmanni* durante las visitas de noviembre a diciembre del 2013 en Sloth Sanctuary.

Variable	$\bar{X} \pm \text{IC95\%}$
Proteínas totales (g/dl)	8,3 \pm 3,3
Albúmina (g/dl)	3,8 \pm 0,2
Nitrógeno uréico (mg/dl)	18,6 \pm 1,5
Creatinina (mg/dl)	0,8 \pm 0,1
Aspartato aminotransferasa (U/L)	94 \pm 9
Alanina aminotransferasa (U/L)	8 \pm 2

Los promedios del resultado de la medición de estradiol y progesterona en plasma heparinizado se muestran en el Cuadro 4, junto con su error estándar con un IC95%.

Cuadro 4: Promedio (\bar{X}) y su IC 95% para los valores de progesterona y estradiol plasmáticos de los cinco individuos *C. hoffmanni* durante noviembre y diciembre del 2013 en Sloth Sanctuary.

Variable	$\bar{X} \pm \text{IC95\%}$
Estradiol (pg/ml)	<25
Progesterona (ng/ml)	3,11 \pm 0,92

En el caso del estradiol, los valores se encontraron debajo del límite inferior de detección del equipo AIA-360[®] (25 U/L), por lo cual fue imposible establecer un promedio y su IC95%.

3.2. Mediciones hormonales en heces

3.2.1. Confiabilidad del método: eficiencia de la extracción y repetibilidad de las mediciones

Las diluciones 1:81 a partir de la SMF y del MAC fueron las que mostraron mayor paralelismo entre sí, por lo que esta dilución fue la empleada para la determinación de la eficiencia de la extracción y para el procesamiento posterior de las muestras de heces. Por

su lado, el análisis del coeficiente de variación intraensayo de las mediciones, reveló una variación del 13% en promedio. Finalmente, el porcentaje de recuperación de la hormona varió desde valores aceptables (mayores al 80%), hasta otros muy inaceptables (menores al 80%) e incluso algunos que superaron el 100%.

3.2.2. Determinación de la concentración hormonal en heces

Mediante la técnica de extracción de esteroides fecales, se logró llevar a cabo un seguimiento del comportamiento hormonal de las hembras *C. hoffmanni* estudiadas. Los individuos realizaron de una a cinco deposiciones semanalmente, con un promedio general de 3,55 (IC95%: 3,36 – 3,74) veces por semana. El Cuadro 5 muestra los promedios y los valores mínimos y máximos (rango) para la concentración de progesterona por gramo de heces (P₄GH), y estradiol por gramo de heces (E₂GH) en cada una de las perezosas.

Cuadro 5: Promedios (\bar{X}), valores mínimos y máximos (rango) de la concentración de progesterona y estradiol de los 5 individuos *C. Hoffmanni* durante noviembre, diciembre y enero de 2013-2014 en Sloth Sanctuary.

Individuo	\bar{X} P₄GH (ng/g) ± IC95%	Rango de P₄GH (ng/g)	\bar{X} E₂GH (pg/g) ± IC95%	Rango de E₂GH (pg/g)
Dora	188,19 ± 58,44	50,74 - 838,85	1767,22 ± 52,31	2339,96
Lil Angel	216,09 ± 62,86	42,72 - 999,83	1772,65 ± 50,85	2211,3
Maddie	264,62 ± 85,60	52,26 - 1048,28	1719,30 ± 72,20	2197,68
Madison	297,49 ± 99,24	62,56 - 1525,87	1560,44 ± 71,72	1902,54
Melaza	120,90 ± 53,49	42,34 - 874,33	1700,61 ± 46,09	2144,71

P₄GH (ng/g): nanogramos de progesterona por gramo de heces; E₂GH (pg/g): picogramos de estradiol por gramo de heces

Con el fin de ilustrar gráficamente los datos indicados en el Cuadro 5 y con ello facilitar su análisis y comparación, se realizaron las Figuras 1 y 2.

En la Figura 1 se observan los promedios e IC95% de los resultados de P₄GH obtenidos a partir de cada uno de los cinco individuos; en la Figura 2 se encuentran los datos correspondientes para E₂GH.

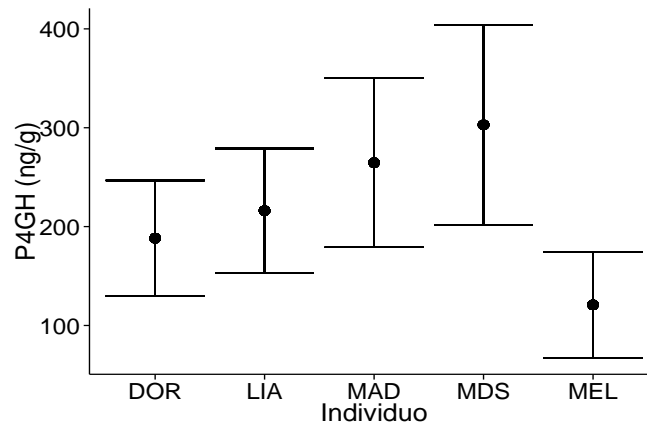


Figura 1: Descripción gráfica de los promedios e IC95% de P₄GH entre los cinco individuos *C. hoffmanni* durante noviembre, diciembre y enero de 2013-2014 en Sloth Sanctuary.

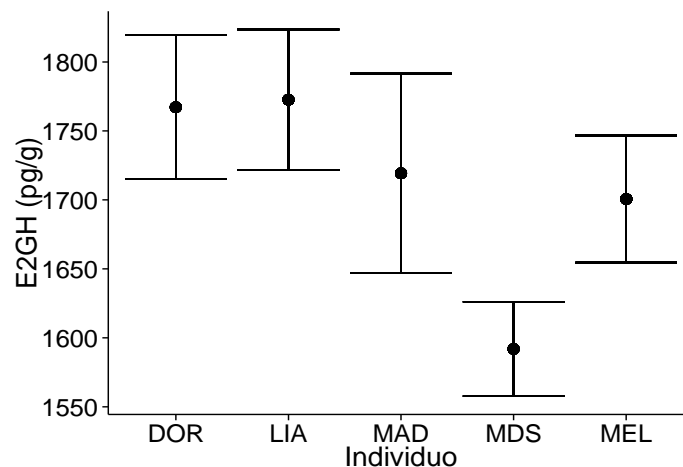


Figura 2: Descripción gráfica de los promedios e IC 95% de la E₂GH (pg/g) entre los cinco individuos *C. hoffmanni* durante noviembre, diciembre y enero de 2013-2014 en Sloth Sanctuary.

3.2.3. Comportamiento del ciclo estral

El comportamiento hormonal de progesterona y estradiol durante los meses de estudio se muestra de la Figura 3 a la Figura 7, para cada una de las hembras incluidas. En estos resultados se observó un aglomerado de picos de P₄GH a inicios del mes de noviembre y a partir de ese momento la actividad progestacional disminuyó, con la aparición de leves picos en algunos de los individuos.

Asimismo, se detectó la presencia de fluctuaciones de E₂GH durante todo el periodo de análisis.

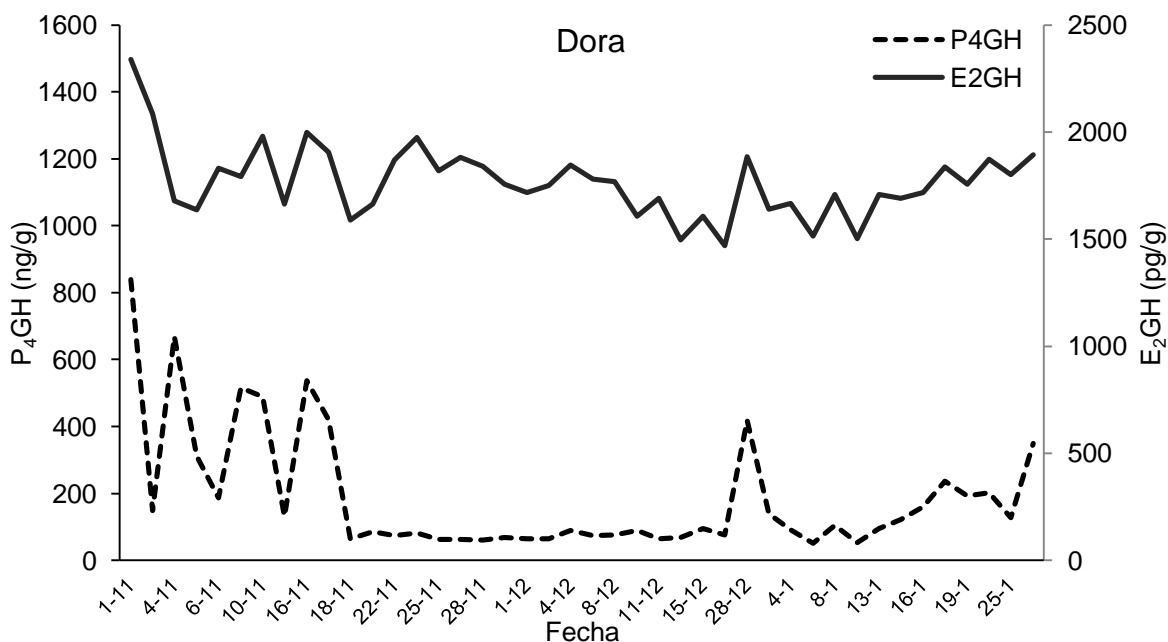


Figura 3: Concentración de P₄GH (ng/g) y E₂GH (pg/g) de Dora durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.

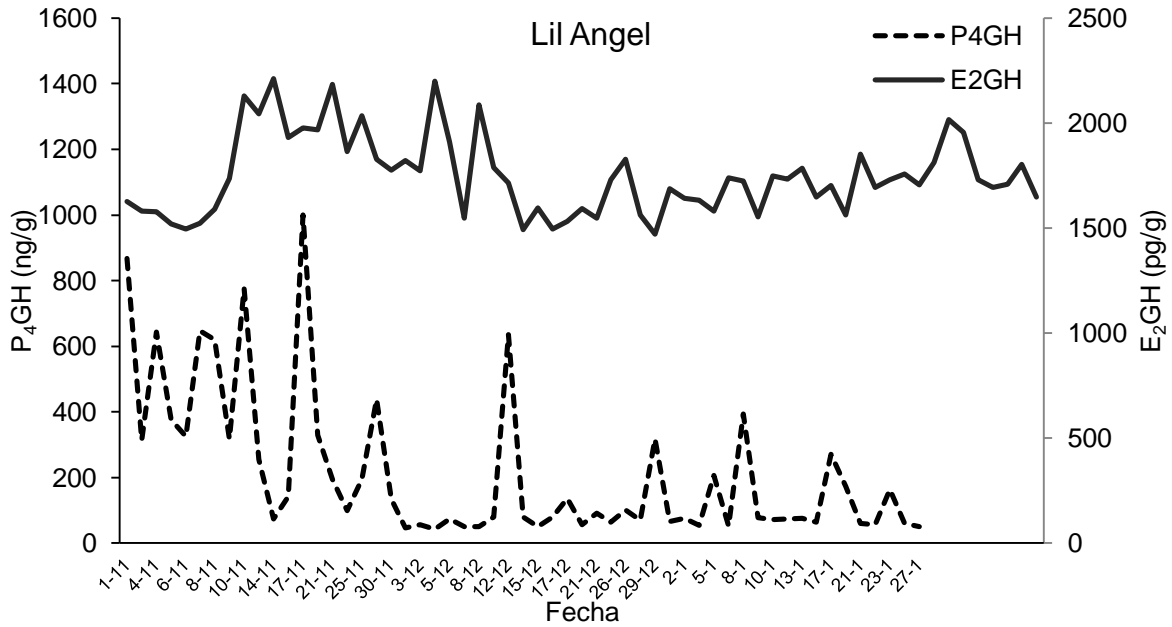


Figura 4: Concentración de P₄GH (ng/g) y E₂GH (pg/g) de Lil Angel durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.

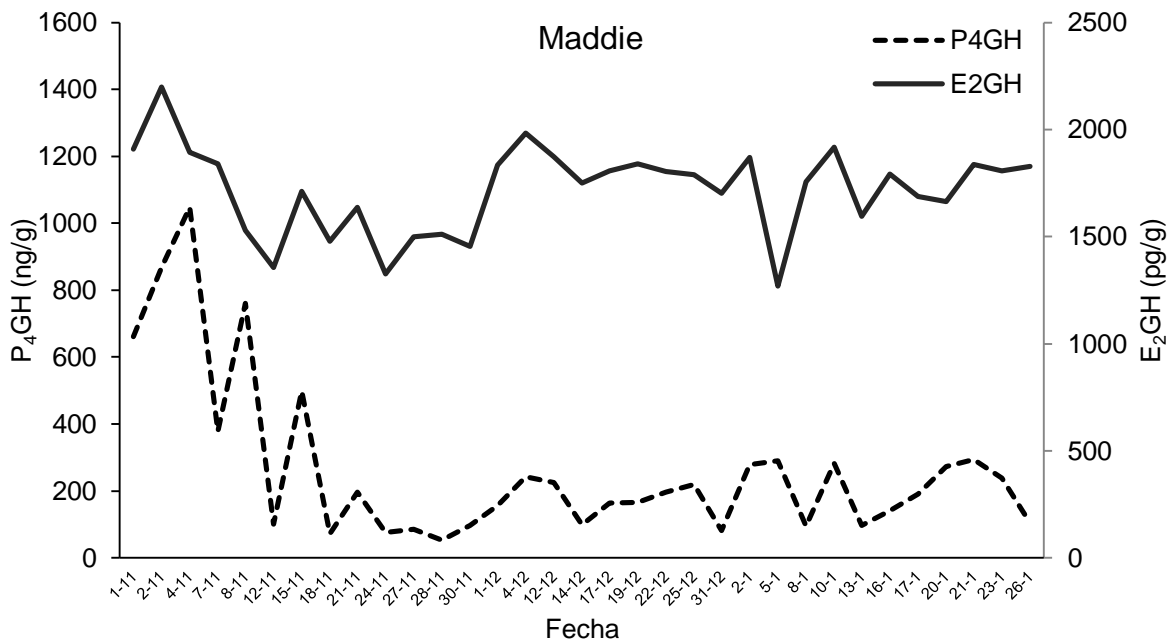


Figura 5: Concentración de P₄GH (ng/g) y E₂GH (pg/g) de Maddie durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.

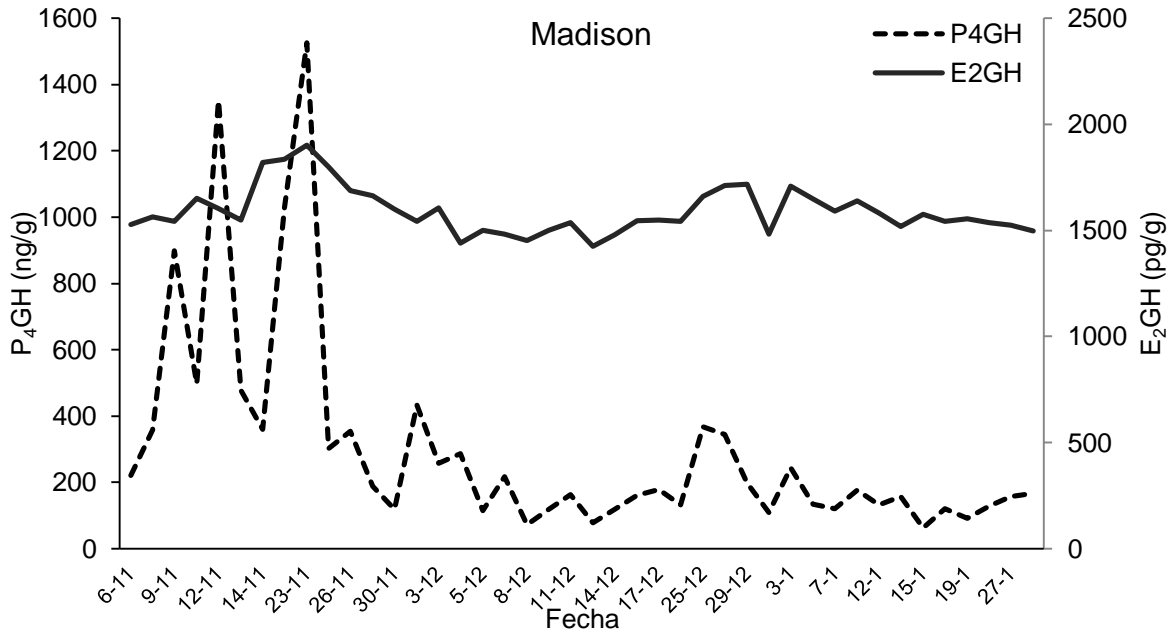


Figura 6: Concentración de P₄GH (ng/g) y E₂GH (pg/g) de Madison durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.

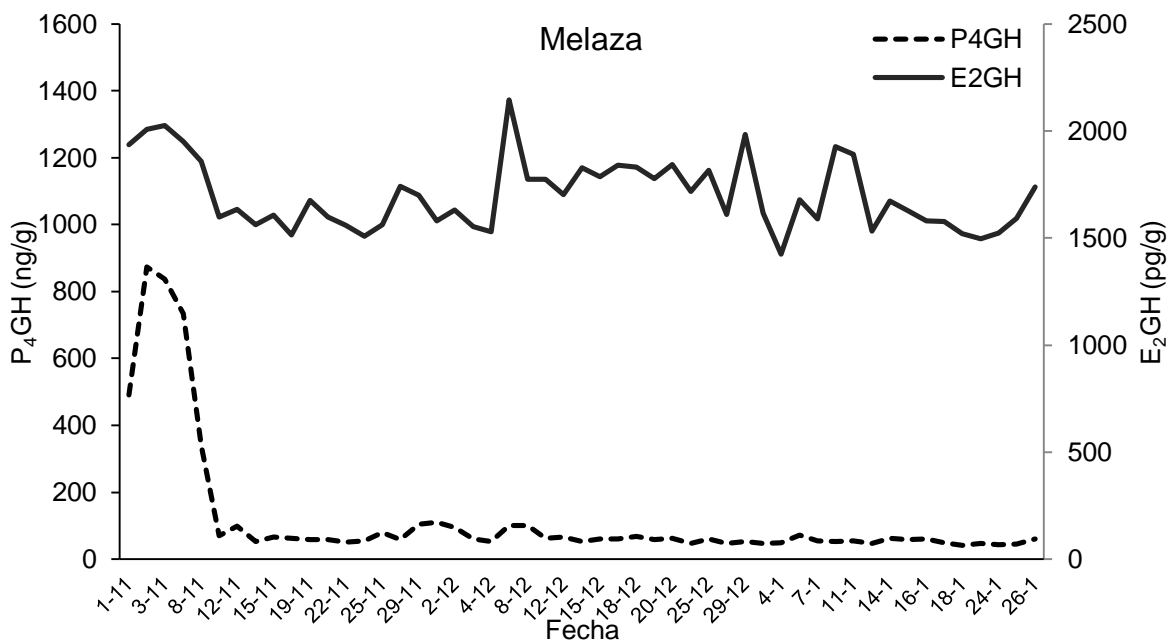


Figura 7: Concentración de P₄GH (ng/g) y E₂GH (pg/g) de Melaza durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014.

Debido al descenso de la actividad progestacional observada a partir de noviembre, se analizaron los datos meteorológicos históricos registrados entre enero de 1970 hasta diciembre del 2013 por el Instituto Meteorológico Nacional para la zona (Cuadro 6). Esta información indicó que los meses durante los que se realizó el estudio son los más lluviosos.

Cuadro 6: Datos climáticos históricos de la Estación 3 (Limón) del Instituto Meteorológico Nacional, recopilados entre enero de 1970 hasta diciembre del 2013.

Mes	Temperatura media (°C)		Precipitación total media (mm)	\bar{X} de días con lluvia
	Mínima	Máxima		
Enero	20,7	28,9	316,9	19
Febrero	20,7	29,1	235,9	16
Marzo	21,3	29,7	209,8	17
Abril	22,0	30,1	262,6	16
Mayo	22,8	30,4	332,1	19
Junio	22,9	30,3	288,0	19
Julio	22,6	29,6	420,0	22
Agosto	22,5	30,1	296,3	19
Setiembre	22,5	30,6	141,4	14
Octubre	30,4	30,4	204,5	17
Noviembre	29,4	29,4	399,4	18
Diciembre	28,9	28,9	442,0	21

Fuente: Instituto Meteorológico Nacional.

La duración de ciclo estral fue calculada solamente en Dora y Lil Angel, quienes mantuvieron una ciclicidad leve durante el periodo de muestreo (Figuras 3, 4 y 5). Puesto que la actividad progestacional que se observó a inicios de noviembre se asoció a una fase luteal en curso, se tomaron en consideración sólo los datos posteriores a este evento. Se observó una duración del ciclo estral promedio de 24,80 días (IC95%: 12,34 \pm 37,26) (Figura 8).

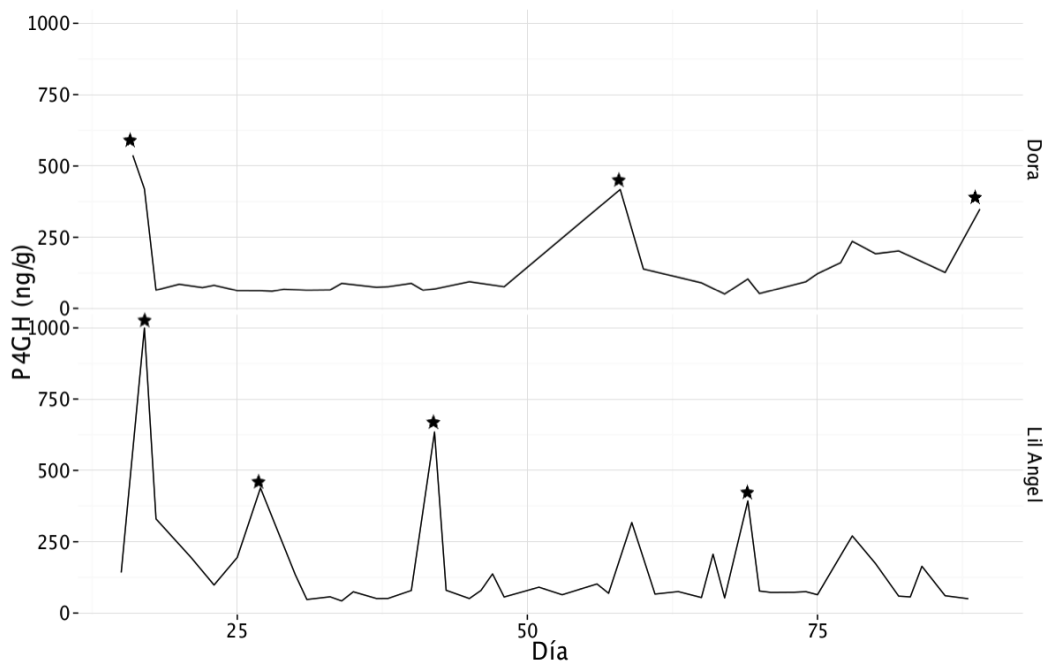


Figura 8: Estimación del ciclo estral en Dora y Lil Angel durante noviembre y diciembre de 2013 y enero de 2014 en Sloth Sanctuary. Las estrellas negras indican los momentos en los que ocurren picos de P₄GH.

3.2.4. Correlación entre la concentración hormonal de progesterona en sangre y en heces

El Cuadro 7 detalla la correlación de IC95% detectada entre las muestras de sangre y las heces del mismo día de la toma sanguínea y los cuatro días posteriores. No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la progesterona plasmática y la P₄GH en ninguno de los días evaluados.

Cuadro 7: Correlación (r) y su IC 95% entre las muestras de sangre y las heces del mismo día de la toma sanguínea (día 0) y los cuatro días posteriores (días 1 a 4).

Día	n	r	IC 95%
0	10	-0,29	-0,78 – 0,42
1	6	-0,024	-0,82 – 0,80
2	8	0,81	0,24 – 0,96
3	10	0,21	-0,48 – 0,74
4	5	0,34	-0,77 – 0,94

4. DISCUSIÓN

4.1. Hematología y química clínica

Los valores de hematocrito, hemoglobina, concentración de hemoglobina corpuscular media, así como los conteos absolutos de leucocitos, neutrófilos en banda, eosinófilos, basófilos, monocitos y plaquetas (Cuadro 2) coinciden con los descritos por otros autores para *C. hoffmanni* (Durán, 2005; Hayssen, 2011; Hagnauer, 2013; Kinney et al., 2013); igualmente, concuerdan con los resultados publicados anteriormente para *C. didactylus* (Vogel et al., 1999) y *Bradypus variegatus* (Araújo, 2006).

Sin embargo, en el caso del conteo total de neutrófilos segmentados, el valor promedio obtenido en este estudio coincide con los resultados expuestos por Araújo (2006) y Hayssen (2011). En contraste, tanto Vogel y colaboradores (1999) como Hagnauer (2013), obtuvieron un promedio más alto (12900/ μ l y 4751/ μ l, respectivamente). En cuanto al conteo de linfocitos, el promedio reportado por Hagnauer (2013) fue notoriamente más bajo en comparación al obtenido en el presente estudio.

Hagnauer (2013) asocia el alto conteo de neutrófilos segmentados al comportamiento agresivo y la alta susceptibilidad a sufrir más estrés durante la captura de *C. hoffmanni* de vida libre. De hecho, ambos hallazgos en esa investigación podrían asociarse a un leucograma de estrés (neutrofilia, linfopenia y eosinopenia) por la captura. En el presente estudio, el hecho de que sean individuos en cautiverio que están más adaptados a la manipulación y el acercamiento humano, puede haber influido en que no presentaran un leucograma de estrés tan marcado, como ocurriría en un individuo de vida libre.

Es importante tomar en consideración que el tiempo que transcurre entre la toma de la muestra sanguínea y su procesamiento, así como el manejo de la misma en ese periodo de tiempo, puede llegar a afectar el conteo total de leucocitos, resultando en valores más bajos.

En las condiciones de este estudio, las muestras fueron procesadas estrictamente durante las 24-48 horas posteriores a su toma, por lo que se considera que los resultados obtenidos son confiables y robustos.

Los valores de química sanguínea obtenidos en esta investigación (Cuadro 3) coinciden con la literatura reportada anteriormente para *C. hoffmanni* (Durán, 2005; Hayssen, 2011; Hagnauer, 2013; Kinney et al., 2013).

Finalmente, en relación con los valores de estradiol y progesterona sanguínea (Cuadro 4), cabe mencionar que en la literatura estudiada a la fecha no figuran valores hormonales para esta especie, por lo tanto, estos datos corresponden al primer reporte según el conocimiento de los autores.

4.2. Mediciones hormonales en heces

4.2.1. *Confiabilidad del método: eficiencia de la extracción y repetibilidad de las mediciones*

Los resultados obtenidos a partir de la validación demuestran que la técnica de extracción de hormonas en heces es viable, principalmente porque el coeficiente de variación intraensayo obtenido señala que sí existe una repetitividad aceptable de los resultados. Sin embargo, hubo dificultad en uniformar el porcentaje de recuperación hormonal.

Entre los factores que podrían haber influido en la recuperación hormonal, se encuentran: (i) la homogenización de la muestra y (ii) las variaciones en el volumen de las muestras.

La homogenización de las heces fue un punto de dificultad en el proceso, ya que estas siempre fueron muy secas, duras y en forma de bolas pequeñas, debido a su naturaleza y a la dieta de los animales muestreados. Esto es importante debido a que en la excreta se encuentra un cúmulo de hormona metabolizada que no presenta una distribución uniforme.

El volumen varió con cada deposición, y resultó más difícil homogenizar aquellas muestras de mayor volumen. Por estas características, es factible que al tomar varias muestras de una misma deposición, se utilicen segmentos con distinta cantidad de hormona, y que las muestras de mayor volumen representen una mayor dilución de la hormona

Por otro lado, los metabolitos hormonales pueden aparecer en las heces en mayor porcentaje que la hormona original o incluso ser la única forma remanente de la hormona (Goyman, 2005; Palme, 2005; Keay et al., 2006; Goyman, 2012). A pesar de ello, es posible emplear en forma exitosa y eficiente, diferentes kits comerciales diseñados para la medición de hormonas plasmáticas, pues (i) generalmente poseen una alta reacción cruzada contra varios grupos de metabolitos hormonales y (ii) no es crítico conocer exactamente cuáles son esos metabolitos (Schwarzenberger, 2007). Por estas razones, el uso de kits comerciales es válido para el análisis de hormonas en heces.

Esto ha sido confirmado por múltiples estudios a nivel mundial, que han concordado en sus hallazgos fisiológicos, a pesar de no que no coincidan los valores hormonales totales

reportados, inclusive en investigaciones sobre una misma especie (Dumonceaux et al., 2006).

Un aspecto que sí resulta ineludible y de suma importancia, es utilizar un único kit o método para el análisis de todas las muestras de un mismo estudio, de manera que las variaciones en la concentración hormonal que se detecten, sean producto de variaciones de los individuos y su ciclicidad, pero no de la técnica. Por tanto, la técnica y el equipo empleados en este estudio se pueden considerar eficientes para estudiar el comportamiento de esas hormonas a través de un periodo de tiempo determinado.

4.2.2. *Determinación de la concentración hormonal en heces*

Se obtuvo un promedio general de 217,46 ng/g (IC95%: 132,31 – 302,61 ng/g) para P₄GH. Al realizar un análisis de las diferencias entre los promedios de la concentración de P₄GH de cada individuo (Anexo 4), los datos arrojan que en cuatro de las cinco hembras muestreadas no hubo efecto del individuo sobre la P₄GH. La única que parece tener una concentración promedio menor al resto es Melaza; no obstante, pese a la diferencia encontrada entre ella y tres de los individuos, no existe suficiente evidencia para concluir que su promedio de P₄GH es diferente al de Dora (Figura 1). La P₄GH se comportó muy similar en cuatro de los cinco individuos, insinuando que no existe un efecto del individuo sobre el valor hormonal, sin embargo no de una manera estadísticamente significativa.

A pesar de que los datos obtenidos sugieren lo anterior, es importante considerar que, tanto en cautiverio como en vida libre, siempre existe un efecto del individuo sobre la concentración hormonal en sus heces. Factores como la edad, el metabolismo del animal, la

cantidad de heces por deposición, el número de deposiciones semanales y otros, constantemente influyen en la cantidad de hormona metabolizada excretada en las heces (Goymann, 2012).

Por ejemplo, si se analizan los animales del estudio que presentaron los promedios más alto y más bajo de P₄GH, se aprecia que Madison no sólo mostró el promedio más alto ($297,49 \pm 99,24$ ng/g), sino que es la hembra más joven; mientras que Melaza exhibió los valores más bajos ($120,90 \pm 53,49$ ng/g) y casualmente es la de mayor edad.

Se conoce que, en los animales domésticos, los parámetros reproductivos empiezan a declinar a partir de cierta edad, la cual depende de la especie (Reece, 2009), de manera que este hallazgo denota la importancia de realizar estudios endocrinológicos a futuro que contemplen el efecto de la edad en los valores hormonales en *C. hoffmanni*.

Adicionalmente, Melaza fue la hembra que mantuvo el peso más bajo durante todas las visitas (Cuadro 1), de modo que también sería importante estudiar la influencia que podría tener el factor de la condición corporal sobre los parámetros reproductivos. Es ampliamente conocido que este factor se relaciona con eficiencia reproductiva en animales domésticos (Reece, 2009).

En el caso del E₂GH, se obtuvo un promedio general de 1704,04 pg/g (IC95%: 1597,29-1810,79 pg/g). Al realizar un análisis de las diferencias entre los promedios de E₂GH (Anexo 5), se apreció que el promedio de Madison varió con un 95% de confianza respecto al de todas las demás hembras (Figura 2). Puesto que el E₂GH se comportó similar entre las otras cuatro hembras, se sugiere que no existe un efecto del individuo sobre el valor hormonal, a pesar de que no se trate de un hallazgo estadísticamente significativo.

El promedio general de P₄GH obtenido en este estudio (217,46 ng/g, IC95%: 132,31-302,61 ng/g) es apenas levemente mayor al reportado por Troll y colaboradores

(2013), quienes en su estudio de análisis de esteroides fecales en *C. didactylus* reportaron promedios de $98,0 \pm 17,0$ ng/g y $105,9 \pm 30,0$ ng/g para dos individuos en cautiverio. Vale la pena acotar que, si bien los valores de ambos estudios se traslapan, hubo diferencias entre los valores máximos, pues en esa investigación se reportan picos no mayores de 450 ng/g.

Contrario a lo sucedido con la P₄GH, el promedio de la E₂GH obtenida en las condiciones de este estudio (1704,04 pg/g, IC95%: 1597,29-1810,79 pg/g) es mucho más bajo en comparación al obtenido en la investigación mencionada, en la cual se reportan promedios de 6700 ± 900 pg/g y 7500 ± 1600 pg/g.

Las variaciones entre las concentraciones hormonales en ambos estudios podrían deberse, no sólo a las diferencias especie-específicas, sino también al número de deposiciones semanales.

En el estudio de Troll y colaboradores (2013), las perezosas defecaron 1,4 y 2,7 veces por semana en promedio, mientras que en nuestras condiciones se obtuvo un promedio de 3,5 defecaciones. A mayor duración del tránsito intestinal, se espera mayor cantidad de hormona acumulada en las heces, lo cual podría explicar la mayor E₂GH reportada en dicha publicación.

Por otro lado, al haber empleado distintos tipos de ensayo en los respectivos estudios, no es necesariamente concluyente comparar los valores absolutos de la concentración hormonal fecal, sino que resulta más valioso realizar una comparación del comportamiento hormonal (Dumonceaux et al., 2006; Schwarzenberger, 2007), tal como se realizó posteriormente en esta investigación.

4.2.3. *Comportamiento del ciclo estral*

Como se muestra en las Figuras 3 a 7, en las cinco hembras analizadas se observó un aglomerado de picos de P₄GH a inicios del mes de noviembre y, a partir de ese momento la actividad progestacional disminuyó, con la aparición de leves picos en algunos de los individuos. Esto sugiere que las hembras estaban ciclando en octubre y que a inicios de noviembre su actividad ovárica descendió, semejando un comportamiento reproductivo estacional que podría estar ligado a las variaciones en la precipitación, características de esos meses del año, en la región atlántica de Costa Rica (Cuadro 6).

Datos históricos del Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (Cuadro 6) sobre la precipitación total media de la zona geográfica del estudio, indican que los meses de agosto, setiembre y octubre se encuentran entre los más secos del año, mientras que noviembre, diciembre y julio son los más lluviosos.

La estacionalidad es un método natural de estrategia reproductiva que algunas especies han adoptado evolutivamente para asegurar la supervivencia de su descendencia (Reece, 2009). Consiste en la adaptación del ciclo reproductivo a las condiciones ambientales de una zona, con el fin de que las crías nazcan durante el periodo de mayor abundancia de alimento y el mejor clima posible para su desarrollo.

En el trópico, las variaciones anuales en el fotoperiodo y la temperatura ambiental son menores que en las zonas templadas, no obstante esta región presenta variaciones importantes en la precipitación.

Como resultado es factible que se presente cierta estacionalidad en la disponibilidad de algunos tipos de alimentos y por ende, el acogimiento de una estrategia reproductiva oportunista por parte de algunas especies de animales (Porrás et al., 2004).

La teoría de que el ciclo reproductivo de *C. hoffmanni* ocurre con cierta estacionalidad, ya ha sido propuesta por Taube y colaboradores (2001), quienes en su estudio afirman que las gestaciones de esta especie suelen suceder durante la época lluviosa y los nacimientos durante el inicio de la época seca.

El descenso de P₄GH durante la segunda mitad de noviembre en todas las hembras, sugiere la presencia de actividad reproductiva probablemente durante la época seca y que una vez que empieza la temporada lluviosa, ésta disminuye.

Por otro lado, la presencia de fluctuaciones de E₂GH en los individuos podría deberse a ondas foliculares anovulatorias, como sucede comúnmente con las yeguas (Reece, 2009) y en vacas en anestro posparto (Porrás et al., 2004). Asimismo, los valores fluctuantes de E₂GH que se observan en todas las hembras (Figuras 3 a 7) evidencian el desarrollo de folículos dominantes que no llegan a ovular, por lo que no se genera la actividad luteal característica de un ciclo estral.

Los hallazgos de esta investigación sugieren que la precipitación podría tener un efecto importante en la ciclicidad en las hembras *C. hoffmanni*. Sin embargo, con el fin de confirmar si presentan algún tipo de estacionalidad es necesario realizar un seguimiento de esteroides fecales durante un periodo más prolongado, que contemple al menos los meses de agosto, setiembre, octubre, noviembre y diciembre.

Si bien es cierto que en todas las hembras se reduce la actividad a partir de la segunda mitad de noviembre, parece ser que Dora y Lil Angel mantuvieron cierta ciclicidad por el resto del periodo de muestreo (Figuras 3 y 4). Por esta razón, se decidió estimar en ellas la duración del ciclo estral, siguiendo la metodología propuesta en el apartado “Comportamiento del ciclo estral” (punto 2, inciso 10).

Bajo estas condiciones se obtuvo una duración del ciclo estral promedio de 24,80 días (IC95%: $12,34 \pm 37,26$) (Figura 8). Dicho resultado coincide con el publicado por Troll y colaboradores (2013), quienes estimaron un periodo de $32,5 \pm 7,5$ días para *C. didactylus*.

4.2.4. Correlación entre la concentración hormonal de progesterona en sangre y en heces

A pesar de que no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre la progesterona plasmática y la P₄GH en ninguno de los días evaluados, los datos del día dos sugieren que la concentración de hormona fecal reflejó el comportamiento de hormona plasmática ocurrido en los dos días previos con respecto a la deposición.

Esto es de gran importancia para estudios posteriores, pues permite tener una idea de cuánto tiempo transcurre desde que ocurre un pico hormonal en sangre, hasta que éste pueda ser detectado en heces. No obstante, se necesitan más estudios para confirmar el intervalo de tiempo preciso.

Es sumamente importante recordar que esta estimación debería considerarse estrictamente para *C. hoffmanni* y bajo las condiciones nutricionales y de manejo que se tuvieron en este estudio.

Gilmore y colaboradores (2001) indican que en vida libre, se ha observado que el tránsito gastrointestinal llega a extenderse hasta por 150 horas y por ello, las deposiciones llegan a presentarse solamente una vez por semana, en comparación con las 3,5 veces semanales obtenidas en la presente investigación.

Es importante recalcar que entre las principales ventajas de la medición de esteroides fecales se encuentran (i) la fácil toma de muestra, (ii) el bajo impacto sobre el animal y (iii) la posibilidad de realizar curvas de comportamiento de la hormona, siempre y

cuando, los animales a muestrear se mantengan bajo condiciones nutricionales y de salud controladas. Por esto, es una técnica factible para animales en condiciones de cautiverio, pero impráctica para animales de vida libre, en cuanto a seguimiento reproductivo.

Por otro lado, las desventajas de la medición de esteroides fecales incluyen: (i) el tiempo requerido para el procesamiento de la muestra, (ii) la difícil homogenización de las muestras con su respectiva variación intra-ensayo y, (iii) dependiendo del kit empleado, la imposibilidad de definir exactamente los metabolitos hormonales medidos o evadidos, por ende la incapacidad de obtener un valor hormonal absoluto preciso. Puesto que la medición de hormonas sexuales en plasma continúa siendo la técnica más certera para detectar valores absolutos, se acepta la hipótesis nula de esta investigación.

5. CONCLUSIONES

- 5.1. Los resultados de este estudio indican que sí es posible realizar un seguimiento del ciclo estral mediante la técnica de extracción hormonal fecal propuesta, sin embargo es importante tener presente que esta técnica no es recomendada para la determinación de valores absolutos tal y como sucede con las determinaciones en muestras sanguíneas.
- 5.2. Se estandarizó el protocolo de extracción y las condiciones bajo las cuales, el equipo AIA-360[®] es eficiente para llevar a cabo la medición de metabolitos fecales de progesterona y estradiol.
- 5.3. La elaboración de curvas de concentración de los metabolitos de progesterona y estradiol en heces permitió estudiar el comportamiento del ciclo estral y consecuentemente, la observación de que la precipitación parece influenciar la ciclicidad de *C. hoffmanni*, siendo este un hallazgo sobre la biología reproductiva sumamente importante y que da paso a estudios posteriores que ahonden en el tema.
- 5.4. Se puede estimar que en la población de *C. hoffmanni* en cautiverio muestreada y sus condiciones de manejo, la concentración hormonal sanguínea se ve reflejada en el comportamiento de la hormona a nivel fecal, a partir de los dos días posteriores al evento, sin embargo se requieren más estudios que comprueben lo anterior.
- 5.5. La medición de hormonas sexuales en plasma continúa siendo la técnica más certera para detectar valores absolutos, sin embargo la detección en heces ofrece una técnica poco invasiva y confiable para estudiar la ciclicidad ovárica y el comportamiento del ciclo estral.

6. RECOMENDACIONES

- 6.1. Realizar estudios con mayor duración y/o que valoren la ciclicidad de las hembras *C. hoffmanni* en otros meses del año, considerando las variaciones en la estacionalidad lluviosa de la zona. Por ejemplo realizar seguimientos de agosto a octubre o de ser posible, a lo largo de un año completo.
- 6.2. Profundizar en el efecto de la edad sobre la ciclicidad y los valores hormonales de las hembras, con el fin de estimar el rango de edad reproductiva de *C. hoffmanni*.
- 6.3. Realizar un estudio sobre el seguimiento del ciclo estral en animales domésticos, por ejemplo equinos, empleando la misma técnica propuesta en esta investigación, con el fin de tomar una mayor cantidad de muestras sanguíneas para efectos del análisis de la correlación entre heces y sangre.
- 6.4. Realizar estudios de duración del tránsito gastrointestinal en los individuos que se vayan a monitorizar, independientemente de la especie.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Araújo, G. 2006. Aspectos clínicos e de manejo de preguiça-de-garganta-marrom *Bradypus variegatus* (Schinz, 1825) de vida livre na Mesorregião Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. Tese ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco, Brasil.
- Brown, J., S. Walker & K. Steinman. 2009. Endocrine manual for reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Smithsonian's National Zoological Park. Washington, United States of America.
- Chelini, M., N. Souza, A. Rocha, E. Felipe & C. Oliveira. 2005. Quantification of fecal estradiol and progesterone metabolites in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Braz. J. Med. Biol. Res. 38: 1711-1717.
- Dias, B., L. dos Santos, P. Lara, C. Righetto; L. Pinder & A. Chiarello. 2007. First observation on mating and reproductive seasonality in maned sloths *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). J. Ethol. 27: 97–103.
- Dumonceaux, G., J. Bauman & G. Carillo. 2006. Evaluation of progesterone levels in feces of captive reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). J. Zoo Wildlife Med. 37: 255-261.
- Durán, A. 2005. Valores de hematología y de bioquímica sanguínea del perezoso de tres dedos (*Bradypus variegatus*) y el perezoso de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*) en cautiverio en Limón, Costa Rica. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional, Heredia, C. R.

- Gilmore, D., D. Da-Costa & D. Duarte. 2000. An update on the physiology of two- and three-toed sloths. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 129-146.
- Graham, L. 2004. Non-invasive monitoring of reproduction in zoo and wildlife species. *Ann. Rev. Biomed. Sci.* 6: 91-98.
- Graham, L., F. Schwarzenberger, E. Möstl, W. Galama & A. Savage. 2001. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. *Zoo Biol.* 20: 227–236.
- Goymann, W. 2005. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 35–53.
- Goymann, W. 2012. REVIEW: On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods Ecol. Evol.* 3: 757–765.
- Hanley, C. 2008. Immobilization of free-ranging Hoffmann's two-toed (*Choloepus hoffmani*) and brown-throated three-toed (*Bradypus variegatus*) sloths using ketamine and medetomidine: a comparison of physiologic parameters. *J. Wildlife Dis.* 44: 938–945.
- Hagnauer, I. 2013. Determinación de valores referenciales de hematología y química plasmática en una población de perezosos de las especies *Choloepus hoffmani* y *Bradypus variegatus* de vida libre en la zona de San José de Upala, Alajuela. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional, Heredia, C. R.
- Hayssen, V. 2011. *Choloepus hoffmani* (Pilosa: Megalonychidae). *Mammalian species.* 43: 37–55.

- Instituto Meteorológico Nacional. 2013. Datos históricos climáticos de la Estación 3, Limón [en línea]. Instituto Meteorológico Nacional, Costa Rica. http://www.imn.ac.cr/IMN/MainAdmin.aspx?_EVENTTARGET=ClimaCiudad&CIUDAD=14 (Consulta: 25 julio, 2015).
- IUCN (International Union for the Conservation of Nature). 2014. Red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org/details/full/4778/0> [en línea]. (Consulta: 23 feb, 2014).
- Keay, J., J. Singh, M. Gaunt & T. Kaur. 2006. Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literature review. *J. Zoo Wildlife Med.* 37: 234-244.
- Kinney, M., G. Cole, C. Vaughan & K. Sladky. 2013. Physiologic and serum biochemistry values in free-ranging hoffmann's two-toed (*Choloepus hoffmanni*) and brown-throated three-toed (*Bradypus variegatus*) sloths immobilized using dexmedetomidine and ketamine. *J. Zoo Wildlife Med.* 44: 570-580.
- Kusuda, S., T. Endoh, T. H. Tanaka, I. Adachi, D. Osamu & J. Kimura. 2011. Relationship between gonadal steroid hormones and vulvar bleeding in southern tamandua (*Tamandua tetradactyla*). *Zoo Biol.* 30: 212–217.
- Lanyon, M., K. Smith & F. Carrick. 2005. Reproductive steroids are detectable in the faeces of dugong. *Aust. Zool.* 33: 247-250.
- Mühlbauer, M., D. Duarte, D.P. Gilmore & C. da Costa. 2006. Fecal estradiol and progesterone metabolite levels in the three-toed sloth (*Bradypus variegatus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 289-295
- Palme, R. 2005. Measuring fecal steroids: guidelines for practical applications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 75–80.

- Paris, M., A. Whiteb, A. Reissb, M. Westa & F. Schwarzenberger. 2002. Faecal progesterone metabolites and behavioural observations for the non-invasive assessment of oestrous cycles in the common wombat (*Vombatus ursinus*) and the southern hairy-nosed wombat (*Lasiorhinus latifrons*). *Anim. Reprod. Sci.* 72: 245–257.
- Pereira, R., J. Barbanti & J. Negrão. 2005. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Theriogenology*. 63: 2113–2125.
- Porras, A., L. Zarco & J. Valencia. 2004. Estacionalidad reproductiva en ovejas. *Ciencia Veterinaria*. 9: 1-33.
- Quesada, A. 2012. Determinación de la etapa del ciclo reproductivo en perezosos de vida libre *Bradipus variegatus* y *Choloepus hoffmani*, mediante las técnicas de citología vaginal, mediación hormonal (estradiol y progesterona) y ultrasonografía: estudio preliminar. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional, Heredia, C. R.
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/> (Consulta: 25 marzo, 2015).
- Reece, W. O. 2009. *Dukes fisiología de los animales domésticos*. 1.ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Schwarzenberger, F. 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *Int. Zoo Yh.* 41: 52-74.
- Snoeck P.P.N., Cruz A.C.B., Catenacci L.S. & Cassano C.R. 2011. Citología vaginal de preguiça-de-coleira (*Bradypus torquatus*). *Pesquisa Vet. Brasil*. 31: 271-275.

- Taube, E., J. Keravec, J. Vié & J. Duplantier. 2001. Reproductive biology and postnatal development in sloths, *Bradypus* and *Choloepus*: review with original data from the field (French Guiana) and from captivity. *Mammal Rev.* 31: 173-188.
- Touma, C. & R. Palme. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 54–74.
- Troll, S., J. Gottschalk, J. Seeburger, E. Ziemssen, M. Häfner, J. Thielebein & A. Einspanier. 2013. Characterization of the ovarian cycle in the two-toed sloths (*Choloepus didactylus*): an innovative, reliable, and noninvasive method using fecal hormone analyses. *Theriogenology.* 80: 275–283.
- Vaughan, C., O. Ramírez, G. Herrera & R. Guries. 2007. Spatial ecology and conservation of two sloth species in a cacao landscape in limón, Costa Rica. *Biodiversity Conserv.* 16: 2293-2310.
- Vogel, I., J. Vie, B. Thoisy & B. Moreau. 1999. Hematological and serum chemistry profiles of free-ranging southern two-toed sloths in French Guiana. *J. Wildlife Dis.* 35: 531–535.
- Wainwright, M. 2007. *The mammals of Costa Rica: a natural history and field guide.* 1.ed. Comstock Publishing Associates. New York, USA.
- Wickham, H. 2009. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis.* Springer. New York, USA.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Fórmula de consentimiento informado.



UNIVERSIDAD NACIONAL
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
Laboratorio de Endocrinología y Biotecnología Reproductiva

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Seguimiento del ciclo estral en *Choloepus hoffmanni* en cautiverio de Costa Rica, mediante la medición de metabolitos fecales de progesterona y estradiol”

Nombre del Investigador Principal: Dra. Marcela Suárez Esquivel

A. PROPÓSITO DEL PROYECTO:

Este estudio es realizado por la Dra. Marcela Suárez Esquivel, en conjunto con la estudiante de grado Sofía Herra Vargas. Los resultados de la investigación serán de utilidad para contribuir al conocimiento de los aspectos reproductivos del perezoso de dos dedos y por ende, de utilidad en los esfuerzos por conservar la especie.

B. COMPROMISO POR PARTE DEL PERSONAL DEL SANTUARIO:

Si el Santuario de Perezosos de Costa Rica (Aviarios de Costa Rica), en adelante llamado “El Santuario” acepta participar voluntariamente en este estudio, el personal de dicho establecimiento quedará comprometido a llevar a cabo las siguientes actividades:

1. Autorizar a los investigadores a tomar muestras sanguíneas y citologías vaginales de los perezosos de interés cada 15 días durante un período de 5 meses, tomando en cuenta que todas las intervenciones serán llevadas por un veterinario y bajo la supervisión del médico regente de “El Santuario”.
2. No cambiar las condiciones de manejo ni el régimen nutricional de los animales elegidos para efectos del estudio, así como mantenerlos enjaulados individualmente.
3. Recolectar las heces de los individuos de interés cada vez que defecuen. Cada muestra deberá ser recogida en una bolsa plástica estéril y guardada inmediatamente en el congelador. Las heces serán recolectadas cada 15 días, cuando se visite el establecimiento para tomar las muestras sanguíneas y las citologías vaginales de los animales. Los materiales para la recolección de las heces serán provistos por el proyecto.

C. RIESGOS:

Puesto que los animales deberán ser sedados para llevar a cabo la toma de muestra sanguínea y la citología vaginal, el procedimiento en sí conlleva un riesgo. Sin embargo, se pretende reducir al máximo este peligro al escoger animales sanos (con buena condición general, sin historia de falta de apetito, lesiones, padecimientos ni signos de enfermedad a la hora de la toma de muestra) y llevando a cabo todas las operaciones en presencia de al menos dos veterinarios.

Es importante mencionar que los investigadores del proyecto optan por llevar a cabo una sedación para realizar los trabajos mencionados, con el fin de evitar el estrés, el miedo y la ansiedad que implicaría hacerlos sin la anestesia. Por otro lado, la sedación permite mejorar la eficacia de las técnicas y por ende, la confiabilidad de los resultados.

D. BENEFICIOS:

“El Santuario” se verá beneficiado por la investigación de distintas maneras:

1. La sedación del animal podrá ser aprovechada por el médico veterinario oficial del santuario para realizar un examen físico exhaustivo del individuo o tomar otras muestras de interés.
2. De cada muestra sanguínea se extraerá información hormonal, hematológica y de química plasmática. Estos datos serán otorgados en la siguiente visita al centro y quedarán en la base de “El Santuario” y el expediente de cada animal participante.
3. Dado a que el conocimiento científico sobre los aspectos endocrinos y reproductivos del perezoso de dos dedos es escaso, los centros de rescate requieren investigaciones de este tipo para comenzar a entender mejor la especie y por ende, llevar a cabo un mejor control reproductivo de los animales.
4. La información recopilada solo la manejarán los investigadores del proyecto, sin embargo los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica. Lo anterior le dará mucho renombre a “El Santuario”.

E. Antes de dar su autorización para este estudio, los representantes de “El Santuario” deben haber hablado con alguno de los investigadores y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas las consultas.

F. “El Santuario” recibirá una copia de esta fórmula firmada para registro por parte de sus representantes.

G. La participación de “El Santuario” es voluntaria. Sus representantes tienen el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad en el procesamiento de las muestras recibidas previamente y la retroalimentación con los resultados de su análisis.

- H. La participación del "El Santuario" en este estudio es confidencial
- I. "El Santuario" no perderá ningún derecho legal como consecuencia de que sus representantes firmen este documento.

CONSENTIMIENTO

He leído toda la información descrita en esta fórmula previo a firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo como representante de "El Santuario", a que nuestros animales participen como sujetos de investigación en este estudio y a colaborar en la toma de muestras como se describió previamente.

Judith Ann Roberts Nott B-081-294 Judith Ann Roberts Nott
 (Nombre) (Cédula) (Firma)
 Sra. Judith Ann Roberts Nott
 Propietaria

Francisco Arroyo M. 1-623-479 Francisco Arroyo M.
 (Nombre) (Cédula) (Firma)
 Dr. Francisco Arroyo
 Regente veterinario

Marcela Suárez Esquivel 1-227-0108 Marcela Suárez Esquivel
 (Nombre) (Cédula) (Firma)
 Dra. Marcela Suárez
 Investigadora que solicita el consentimiento

ANEXO 2

Carta de aprobación del Comité de Bioética



18 de noviembre de 2014
FCSA-EMV-CBAB-007-2014



Dra. Nancy Astorga Miranda
Directora
Escuela de Medicina Veterinaria

Estimada señora:

Para su información y efectos consiguientes, me permito transcribir el acuerdo tomado por la Comisión de Bienestar Animal y Bioética, en la Sesión Ordinaria N°04-2014, celebrada el 17 de noviembre de 2014, que dice:

Considerando

1. Que una vez revisado y analizado el proyecto titulado: **"Extracción de Metabolitos fecales de progesterona y estrodiol en hembras *Choloepus hoffmanni* en cautiverio de Costa Rica, como método no invasivo para el seguimiento del ciclo estral y su correlación con los valores hormonales plasmáticos y los hallazgos en citologías vaginales"**.
2. Que el mismo estará a cargo de la Dra. Marcela Suárez Esquivel.
3. Que el proyecto arriba enumerado todos los participantes se comprometen a guardar el bienestar animal de todos los animales objeto del estudio.
4. Asimismo, el Proyecto cumple los requisitos que se emanan de la Ley 7451 "Bienestar de los Animales".

POR LO TANTO, SE ACUERDA:

1. **AVALAR EL PROYECTO TITULADO: "EXTRACCIÓN DE METABOLITOS FECALES DE PROGESTERONA Y ESTRODIOL EN HEMBRAS *CHOLOEPUS HOFFMANNI* EN CAUTIVERIO DE COSTA RICA, COMO MÉTODO NO INVASIVO PARA EL SEGUIMIENTO DEL CICLO ESTRAL Y SU CORRELACIÓN CON LOS VALORES HORMONALES PLASMÁTICOS Y LOS HALLAZGOS EN CITOLOGÍAS VAGINALES", PRESENTADO POR LA DRA. MARCELA SUÁREZ ESQUIVEL.**

ACUERDO FIRME

Atentamente,

Dra. Sandra Estrada König
Coordinadora
Comité Bienestar Animal Y Bioética
Escuela de Medicina Veterinaria



C: Dr. Leana Zumbado Gutiérrez
Dr. Mario Baldí Salas
Dr. Julio Cesar Rojas
Dr. Mauricio Jiménez Soto

ANEXO 3

Protocolo de extracción hormonal a partir de heces

El protocolo de extracción hormonal a partir de las heces húmedas, basado Brown y colaboradores (2009), es el siguiente:

1. Colocar la bolsa que contiene la muestra de heces completa cuatro minutos a alta velocidad en el Stomacher[®]80 Biomaster para homogenizarla adecuadamente.
2. Pesar 0,5 gramos de la muestra homogenizada en una balanza electrónica y colocar la muestra en un tubo de 50 mL, debidamente identificado como “Tubo 1. Nombre del Individuo. Fecha de recolección”.
3. Añadir 5 mL de ETOH 90% y agitar vigorosamente durante 10 segundos en un agitador vórtex. Hacer una marca con un marcador permanente que indique dónde llega el volumen final.
4. Colocar el “Tubo 1” en el Thermomixer (Eppendorf[®]) a 96°C durante 20 minutos. Al finalizar, llevar la muestra al volumen original, agregando ETOH 100% y agitar vigorosamente por 10 segundos más.
5. Centrifugar la muestra durante 20 minutos a 2500 rpm en una centrífuga Hettich[®], Universal 320R.
6. Separar el sobrenadante en otro tubo de 50 mL, identificado como “Tubo 2. Nombre del Individuo. Fecha de recolección”. Éste será empleado nuevamente más adelante.
7. Añadir al pellet remante en el “Tubo 1”, 5 mL ETOH 90% y agitar vigorosamente durante 30 segundos.

8. Centrifugar el “Tubo 1” durante 20 min a 2000 rpm en una centrífuga Hettich[®], Universal 320R.
9. Verter el nuevo sobrenadante en el “Tubo 2” y agitar vigorosamente durante 30 segundos. Descartar el “Tubo 1”.
10. Colocar el “Tubo 2” en el Thermomixer (Eppendorf[®]) durante aproximadamente 60 minutos a 56°C bajo un flujo de aire, hasta que se evapore la totalidad del ETOH.
11. Al secarse, añadir nuevamente 3 mL de ETOH 100% y continuar su secado en el Thermomixer (Eppendorf[®]), de acuerdo con el paso 11.
12. Una vez evaporado el ETO del “Tubo 2”, agregar 1 mL de solución salina estéril.
13. Colocar el tubo en un sonicador Bransonic[®] durante 15 minutos y finalmente se agitar vigorosamente durante 10 segundos.
14. Considerar la extracción obtenida como la solución madre. Realizar a partir de ella diluciones seriadas 1:3 para determinar cuál es la dilución más adecuada para cada hormona.

ANEXO 4

Diferencias entre los promedios de la P₄GH entre los 5 individuos *C. hoffmanni* durante noviembre, diciembre y enero del 2013-2014 en “Sloth Sanctuary”.

Diferencias entre la cantidad promedio de P ₄ GH										
	Dora		Lil Angel		Maddie		Madison		Melaza	
	Promedio	IC %95	Promedio	IC %95	Promedio	IC %95	Promedio	IC %95	Promedio	IC %95
Dora	--	--	27,90	-56,81 – 112,61	76,40	-25,66 – 178,52	114,66	-0,80 – 230,12	-67,29	-145,44 – 10,87
Lil Angel	-27,90	-112,61 – 56,81	--	--	48,53	-56,16 – 153,23	86,76	-31,02 – 204,54	-95,19	-176,78 – 13,59
Maddie	-76,40	-178,52 – 25,66	-48,53	-153,23 – 56,16	--	--	38,23	-92,04 – 168,50	-143,72	-243,34 – 44,09
Madison	-114,66	-230,12 – 0,80	-86,76	-204,54 – 31,02	-38,23	-168,50 – 92,04	--	--	-181,95	-295,25 – 68,64
Melaza	67,29	-10,87 – 145,44	95,19	13,59 – 176,78	143,72	44,09 – 243,34	181,95	68,64 – 295,25	--	--

ANEXO 5

Diferencias entre los promedios de la E₂GH entre los 5 individuos *C. hoffmanni* durante noviembre, diciembre y enero del 2013-2014 en “Sloth Sanctuary”.

Diferencias entre la cantidad promedio de E ₂ GH										
	Dora		Lil Angel		Maddie		Madison		Melaza	
	Promedio	IC %95	Promedio	IC %95	Promedio	IC %95	Promedio	IC %95	Promedio	IC %95
Dora	--	--	5,43	-66,55 – 77,42	-47,91	-135,68 – 39,85	-175,32	-237,03 – 113,61	-66,61	-135,38 – 2,17
Lil Angel	-5,43	-77,42 – 66,55	--	--	-53,35	-140,44 – 33,74	-180,75	-241,35 – 120,16	-72,04	-139,87 – 4,22
Maddie	47,00	-39,85 – 135,68	53,35	-33,74 – 140,44	--	--	-127,41	-206,46 – 48,35	-18,69	-103,22 – 65,82
Madison	175,32	113,61 – 237,03	180,75	120,16 – 241,35	127,41	48,35 – 206,46	--	--	108,71	52,03 – 165,39
Melaza	66,61	-2,17 - 135	72,04	4,22 – 139,86	18,69	-65,83 – 103,22	-108,71	-165,39 – 54,03	--	--