Acta Zoologica Mexicana (n.s.) 20(2): 187-196 (2004)

VALORACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN HECES DE UNA PAREJA DE LOBO MEXICANO (*CANIS LUPUS BAILEYI*) EN CAUTIVERIO

María A. SOTO[1], Arturo SALAME-MÉNDEZ[2], José RAMÍREZ-PULIDO[1]
Lourdes YAÑEZ[3] y Miguel Ángel ARMELLA[1]
Departamentos de [1]Biología, [2]Biología de la Reproducción y [3]Biotecnología.
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa. San Rafael Atlixco 186. CP 09470. Iztapalapa. México, D. F. MÉXICO
E-mail: mariapia12001@yahoo.com.mx

RESUMEN

El lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*) es la subespecie genéticamente más distintiva de los lobos que habitan Norteamérica y que ha sido eliminada de las zonas en que residía originalmente en nuestro país. Actualmente no hay evidencia de poblaciones en vida libre, por lo que todos los individuos existentes están en zoológicos o encierros construidos especialmente para su reproducción. Referente a su comportamiento y estructura social hay algunos estudios pero son menos los relacionados a su fisiología reproductiva. El presente trabajo describe en una pareja (macho-hembra) de lobo mexicano los perfiles de hormonas esteroides sexuales (HES) durante las estaciones de invierno y primavera que son cuando se reproduce. La cuantificación de las HES (progesterona, P4; testosterona, T, y estradiol, E2) se hicieron por inmunoanálisis a partir de heces fecales. Realizándose, además, observaciones de su conducta sexual usando el método focal con registros de puntos. Al ser las muestras de sexo desconocido se hizo su sexado a partir de la concentración diferencial de T. Validado lo anterior, el perfil hormonal de P4 y T en el macho resultó ser de tipo cíclico, mientras que el de E2 no tuvo cambios significativos durante toda la temporada; siendo su concentración inferior a las de P4 y T. En las hembras, la P4 tuvo un patrón cíclico con evidentes incrementos, así como el de T pero siendo sus concentraciones inferiores. El E2 tuvo incrementos considerables, sin embargo, sus concentraciones fueron menores que las otras dos hormonas. Se observaron montas del macho sobre la hembra pero sin constatarse cópulas, las cuales coincidieron con el perfil de HES, que concuerda con lo reportado para el estro en cánidos.
Palabras Clave: lobo gris mexicano, *Canis lupus baileyi*, hormonas esteroides sexuales, inmunoanálisis, heces, México.

ABSTRACT

The Mexican Gray Wolf (*Canis lupus baileyi*) is one of the most distinctive groups of wild canids.It has been erradicated from most of its original range and there is no solid evidence of wild populations. All known individuals of this species are kept in zoos or special enclosures. Recently a great deal of efforts have been done in oder to reintroduce this subespecies to its natural habitat. Studies on this species are focused on the behavior and social structure, but there are few on the reproductive physiology. In this paper we analyze progesterone (P4), testosterone (T) and estradiol (E2) concentrations in feces of a pair of Mexican grey wolves during the Winter and Spring. Steroids were quantified by enzime immunoassay and evaluated using a micro titer plate. We tested the use of hormone levels to determine gender of the animals and found T to be useful. In the male, P4 levels had a cyclic pattern with peaks in January and February that coincided with cyclic variation in T. E2 did not show significant changes. In the female, P4 showed a cyclic pattern with fluctuations from January to April, T followed the same pattern, and E2 peaked in January, February, and April. The peak of February ended with a rise in P4. These results suggest that concentrations of sexual steroid hormones are in general high during the reproductive period.
Key Words: Mexican Gray Wolf, *Canis lupus baileyi*, sexual steroid hormones, enzime immunoassay, Mexico.

INTRODUCCIÓN

El lobo gris Mexicano (*Canis lupus baileyi*) es la subespecie genéticamente más distintiva de los lobos que habitan Norteamérica (García Moreno *et al*. 1996). Debido a los programas de eliminación, a la caza indiscriminada, y a la pérdida de su hábitat natural, esta subespecie se encuentra en peligro de extinción (NORM-059-Semarnat-2001). Hasta la fecha no hay evidencia de la presencia de poblaciones en vida libre, por lo que se considera que todos los individuos vivos están en zoológicos o encierros construidos especialmente para su reproducción. Su población conocida dentro de la República Mexicana consta de menos de 100 individuos (Siminsky 2002).

Su conducta, estructura social y periodo de reproducción han sido descritos por Bernal y Packard (1997) y Servín (1997), quienes reportan que la actividad reproductiva se presenta durante el invierno, ocurriendo la mayor incidencia de apareamientos en los meses de febrero y marzo.

Desde hace mucho tiempo está bien establecido que las hormonas esteroides sexuales (HES) regulan no sólo el patrón copulatorio del macho y del estro (celo) en la hembra (Beach 1948, 1976) sino también otros aspectos de la conducta sexual; por lo que es importante determinar los perfiles de las HES al desarrollar programas de conservación de especies que se encuentren amenazadas o en peligro. En este sentido, Esquivel y cols. (1994) describieron el ciclo estral de cuatro hembras de lobo mexicano utilizando para ello cambios en el contenido de progesterona en el suero.

Uno de los principales problemas que se enfrenta al estudiar procesos endocrinos de la biología reproductiva en mamíferos silvestres, es la obtención de muestras de sangre, orina y/o la realización en las hembras de frotis vaginales de la citología vaginal exfoliativa, que implican serios problemas de manejo de los animales. Además, estos procedimientos pueden intensificar el estrés en los individuos, dando por resultado una alteración en las concentraciones de hormonas esteroides. Por ejemplo, en cérvidos Plotka y cols. (1983) reportan que el estrés producido por la captura induce una hipersecreción de progesterona adrenal.

Por lo antes mencionado, se han desarrollado técnicas no invasivas es decir, metodologías que no provocan estrés en los individuos para la valoración de indicadores (v. gr. hormonas esteroides) de su fisiología (Lasley & Kirkpatrick 1991). Entre estas técnicas se encuentra la cuantificación de HES en las heces fecales, la cual ha permitido describir procesos endocrinos durante la reproducción de machos y hembras del venado pudu (*Pudu puda,* Blanvillain *et al*. 1997), el macaco de cola larga (*Macaca fascicularis,* Shideler *et al*. 1993), el babuino (*Papio cynocephalus cynocephalus,* Wasser *et al.* 1994), la zorra fennec (*Vulpes zerda,* Valdespino *et al*. 2002), el lobo de crin sudamericano (*Chrysocyon brachyurus*, Velloso *et al*. 1998) y el borrego cimarrón (*Ovis canadensis cremnobates*, Ayala-Cano 2000, 2003), entre otros. Además esta metodología, ha sido utilizada como una herramienta en la identificación del sexo en aves (galliformes: Bishop & Hall 1991, Cockrem & Rounce 1994, Berkovitz *et al*. 1978) y mamíferos (cánidos: Velloso *et al*. 1998; bóvidos: Ayala-Cano 2000).

A fin de utilizar la cuantificación de esteroides en heces y proveer información requerida para el desarrollo del programa de recuperación de lobo gris mexicano,

iniciamos el estudio de una pareja en cautiverio. Como antecedente a este trabajo, se describieron los patrones conductuales de la misma -durante dos años consecutivos- y, al no encontrarse las conductas reproductivas esperadas, se consideró pertinente explorar el patrón reproductivo con un enfoque endocrino pero sin modificar -en lo posible- su conducta. Por esta razón no se efectuaron prácticas que alteraran las rutinas de alimentación como hubiera sido aislar a los animales para darles de comer en su dieta pigmentos vegetales u otros marcadores para definir con certidumbre que excreta correspondía a que miembro de la pareja.

Este trabajo tuvo como objetivos: i) determinar las concentraciones de HES (progesterona, testosterona T-, y estradiol) en las heces de una pareja de lobo mexicano durante invierno y primavera; ii) hacer una asignación del sexo a partir de la relación diferencial en la concentración de T, y iii) establecer el perfil de las tres HES en la pareja durante el invierno y la primavera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio. Se realizó en la unidad de manejo, conservación y aprovechamiento sustentable (UMA) de San Cayetano; reserva administrada por la Dirección General de Fauna Silvestre de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). La UMA se localiza a una altura de 2785 m.s.n.m, a 60 km al poniente de la ciudad de Toluca, Estado de México. La vegetación corresponde a bosque de pino-encino con un sotobosque denso. El clima es templado-húmedo y presenta abundantes lluvias durante el verano.

La pareja de lobos se mantuvo en un encierro de 1.2 hectáreas delimitado por malla ciclónica de 3 m de altura y enterrada 1.5 m. Dentro del encierro hay un arroyo en donde los animales obtienen agua *ad libitum*. Los animales eran alimentados seis veces a la semana con una dieta a base de croquetas (Pro-Plan®, Purina, México) y, ocasionalmente, cazaban algún animal silvestre (ardillas, zorrillos, etc.) dentro del encierro.

Recolecta de Heces. Se estudiaron un macho y una hembra de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) de linaje certificado (McBride) con una edad de 6 años cada uno. De diciembre del 2000 hasta mayo del 2001 se recolectaron semanalmente las heces más frescas en el sitio donde los lobos acostumbraban defecar, por una misma persona (Soto M. A.), una vez por semana y a la misma hora (11:00 am). Cada muestra se colocó dentro de un frasco de vidrio conteniendo etanol al 70%, almacenándose en refrigeración (4°C) hasta su procesamiento.

Cuantificación de las Hormonas Esteroides. Para la valoración en las heces de los contenidos de progesterona (P4), testosterona (T), y de estradiol (E2) en cada una de las muestras se realizó previamente una extracción total de esteroides (ETE) con éter dietílico (Salame-Méndez *et al*. 1998, 2003). La cuantificación de P4, T, y E2 en cada ETE se hizo con la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) utilizando kits de

Diagnostic Systems Laboratories, Inc®, (Webster, Texas) y determinándose la concentración de cada hormona en un espectrofotocolorímetro (Microplate Reader, MR 600, Dynatech Product®).

Dado que la relación T/P4, T/E2 o la suma de las tres hormonas es mayor para los machos (Bishop & Hall 1991, Cockrem & Rounce 1994, Velloso *et al*. 1998),y que T>E2, se llevó a cabo una clasificación de las heces en dos grupos. Una vez clasificadas las muestras se ordenaron cronológicamente y esto definió los patrones hormonales para cada sexo. Para constatar diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones hormonales entre ambos grupos se realizó una prueba t de Student (Zar 1999).

Por último, con el objeto de detectar la presencia de conducta sexual en la pareja, se trató de detectar si ocurrían montas; presentación de genitales y/o cópulas (incluyendo intromisión y candado copulatorio); para lo cual se cuantificaron los eventos a manera de frecuencias absolutas (Mech 2000). El registro de observación se hizo dos veces al día, de 7:00 am a 11:00 am y de 5:00 pm a 8:00 pm.

RESULTADOS

Sexado. Los valores hormonales definiendo el sexo de las excretas estuvieron comprendidos por aquellas cuya concentración de T estaba entre 1 y 11 ng/gr (Grupo A) y por otro, las que estaban entre 17 y 85 ng/gr (Grupo B). Con la prueba *t* de student, para la testosterona se obtuvo para el grupo A una media de 3.63 ± 0.90 ng/gr y para el grupo B de 28.31 ± 6.88 ng/gr ($p<0.01$, *g.l.*35). En la comparación del estradiol para el grupo A se obtuvo un promedio de 15.77 ± 1.45 ng/gr y para el grupo B de 9.7 ± 2.45 ng/gr ($p<0.01$, *g.l.*35). A partir de lo anterior se consideró que el grupo A de heces provenían de la hembra y el grupo B del macho.

La asignación del sexo se confirmó a partir de un hecho desafortunado pero a la vez útil. En las 7 últimas semanas del estudio únicamente se recolectaron muestras de la hembra ya que el macho murió a finales de marzo (Fig. 1B) es decir, 4 días antes de realizar la recolecta de la semana 11. Al comparar la concentración de T y E2 de estas 7 semanas con las anteriores, cuando el macho aún vivía, se encontró que todas caían en los intervalos asignados al grupo A, apoyando la clasificación efectuada (Fig. 1A). Por otra parte, al sumar las concentraciones de P4-T-E2, y considerando la asignación del sexo, se constató claramente una mayor concentración (2 veces más; *t* de Student $p<0.001$, *g.l.* 21) de hormonas esteroides en el grupo B (macho) con respecto al A (hembra) (Fig. 1D).

Perfil Hormonal. La figura 1 muestra los perfiles hormonales de la hembra y el macho, asumiendo que la asignación de las excretas a cada uno de los sexos es correcta. En el macho la concentración de T tuvo un patrón cíclico con incrementos y decrementos (Fig. 1 A-B). La P4 tuvo variaciones cíclicas que en algunas semanas coincidieron con las de la T como lo fue en la tercera semana de enero y de febrero, respectivamente (Fig. 1B). El E2 se mantuvo sin cambios evidentes hasta la primera semana de marzo, en donde tuvo un incremento (Fig. 1B).

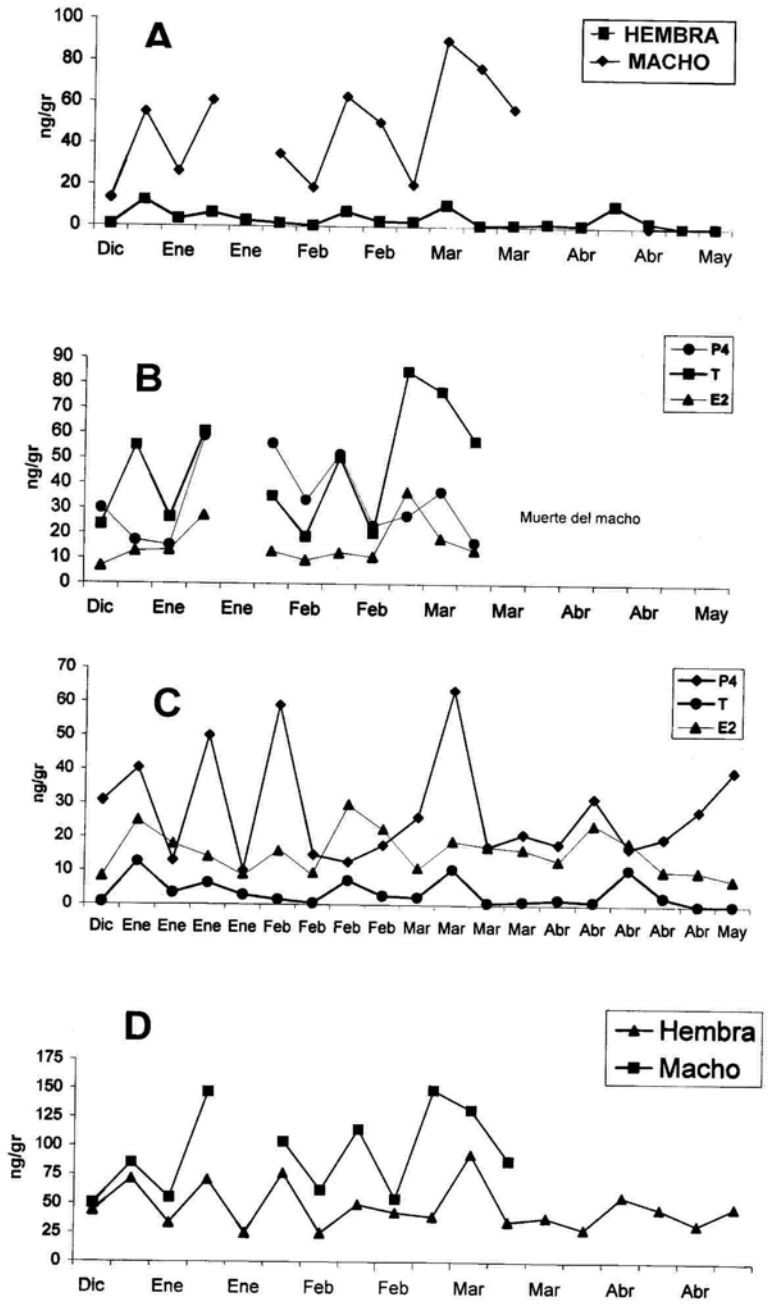


Figura 1

A, Concentraciones de testosterona en el macho y la hembra. **B**, Hormonas esteroides sexuales en el macho. **C**, Hormonas esteroides sexuales en la hembra. **D**, Esteroides sexuales en el macho y en la hembra.

En la hembra la P4 tuvo un patrón de aumentos-decrementos (Fig. 1C). La T tuvo cuatro incrementos evidentes: primera semana de enero; tercera de febrero; segunda de marzo, y tercera de abril (Fig. 1A-C). Por último, la concentración de E2 presentó tres incrementos evidentes en la primera semana de enero, tercera de febrero, y segunda de abril (Fig. 1C). Durante la cuarta semana de febrero, inicia su disminución, coincidiendo con el incremento de la concentración de la progesterona, que llega a su máximo en la segunda semana de marzo (Fig. 1C).

Conducta Sexual. Únicamente durante la segunda semana de marzo (día 16) se observaron 12 montas en las cuales la hembra desvió la cola presentando los genitales al macho, pero no se observaron cópulas.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, la metodología utilizada permitió diferenciar las heces de la pareja de lobos, haciendo la asignación del sexo de los animales con base en el contenido diferencial de HES en particular de la testosterona. Esta forma de sexado puede ser cuestionada debido a los cambios que por influencias ambientales presenten los organismos en la producción y/o concentración de HES, lo que permitiría incurrir en una asignación incorrecta del sexo de una muestra. Sin embargo, a pesar de estos riesgos es una metodología que tiene las siguientes ventajas: i) no es invasiva ni requiere manipulación de los ejemplares, lo que reduce el estrés y asegura un comportamiento normal de los individuos, y ii) es muy accesible por su fácil uso y bajo costo comparado con las metodologías de biología molecular (v. gr. determinación de genes sexo-determinantes).

Los estudios referentes a la diferenciación sexual mediada por las HES (Salame-Méndez & Villalpando-Fierro 1998) indican que los andrógenos (v. gr. testosterona) son las principales hormonas del sexo masculino, mientras que los estrógenos (v. gr. estradiol) lo son del sexo femenino. Por lo tanto, la producción relativa de unos y otros puede usarse como un indicador del sexo. Es decir, una mayor producción y/o contenido de andrógenos con respecto a la de estrógenos es una condición prevaleciente de los machos siendo lo contrario verdad para las hembras. Este método le permitió a Bishop y Hall (1991), Cockrem y Rounce (1994), y Velloso y cols.(1998) asignar el sexo a los individuos tanto en cautiverio como en vida libre. Sin embargo, no en todos los casos es posible utilizar esta técnica (García-Feria & Valdespino en preparación) debido a la limitante de detectar concentraciones hormonales bajas y/o similares en individuos jóvenes o animales adultos en sus períodos de quiescencia reproductiva.

En nuestro estudio la asignación del sexo a partir de la relación diferencial de T respecto al E2 y la P4 en las heces, se pudo validar a partir del deceso del macho. Habiendo sido asignado al grupo B, con mayor contenido de T respecto al de E2, al macho y lo contrario para las heces del grupo A, asignado a la hembra. En este sentido, la relación T>E2 concuerda con lo encontrado en machos y hembras adultos de lobo

mexicano durante su época reproductiva (Soto y cols. en preparación), lo cual apoya la fiabilidad de esta metodología utilizada para realizar el sexado de las heces de la pareja estudiada.

El lobo mexicano en latitudes templadas se aparea en los meses de febrero y marzo (Servín 1997), y como en todos los cánidos silvestres su reproducción es estacional. Un incremento en las concentraciones de HES es característico de la época reproductiva (Mech 2000, Asa 1999) y esto pudo constatarse en la pareja estudiada, en donde los principales incrementos de P4 y T en la hembra fueron de enero a mayo, y en el macho de enero hasta antes de su fallecimiento (primera semana de abril). Por su parte, la coincidencia del incremento de P4 con el de T en el macho podría explicarse a partir del hecho de que la progestina es uno de los intermediarios en la síntesis de andrógenos (Norman & Litwack 1997).

En perras y hembras de lobo gris (*Canis lupus*) hay una liberación pulsátil (incrementos-decrementos) de P4, E2 y LH (hormona luteinizante) durante su ciclo estral (Wildt *et al*. 1978, Seal *et al*. 1979). Sin embargo, se ha comprobado que durante la etapa reproductiva de hembras de lobo gris (Seal 1979) y de lobo mexicano (Esquivel *et al.* 1994) los perfiles de P4 en sangre son irregulares; irregularidad que también se encontró en las heces de la hembra de estudio. Por lo que estos datos permiten inferir que el patrón irregular del contenido de P4 es lo normal en las hembras de lobo mexicano durante su época reproductiva.

Un proceso fundamental en la biología reproductiva de las hembras es la fase del estro. Durante esta fase se lleva a cabo la liberación de los ovocitos de los folículos maduros, y a partir de la secreción y acción de las HES en el hipotálamo, la hembra despliega su conducta de apareamiento. En lobas, antes del estro, hay un incremento (pico) de E2 previo al pico de P4, tiempo en el que se presenta la conducta sexual (Asa 1997, Esquivel & Páramo 2001, Wildt *et al.* 1978). De tal manera que a partir de la relación P4-E2 antes y durante el estro, podría explicar la razón por la cual la hembra estudiada presentó sus genitales al macho (con clara desviación de la cola) en respuesta a una serie de montas el 16 de marzo, fecha en la cual se encontró coincidencia con un incremento del estradiol previo al pico de progesterona. Sin embargo, aún cuando la hembra desplegó algunas conductas de apareamiento no se pudo establecer con precisión si estaba en estro. Por su parte, el macho a pesar de que montó a la hembra no logró la penetración, sospechándose una disfunción reproductiva. Al considerar esta situación se podría explicar la razón por la cual esta pareja de lobo mexicano no tuvo descendencia durante el tiempo que permanecieron juntos -más de 3 años-. Por lo que se podría especular que el macho y/o la hembra tuviesen alguna disfunción debida a una etiología patológica, por ejemplo, debida a estrés. En este sentido, en el macho se constataron tres incrementos en el contenido de cortisol en heces, siendo el más significativo (arriba de los 100 Fg/gr) el correspondiente a la última toma de muestra que se hizo antes de su muerte (resultados no publicados). Se sabe que una situación de estrés crónico puede traer como consecuencia efectos deletéreos como la disminución de la fertilidad porque el incremento en la producción de cortisol inhibe la síntesis de esteroides sexuales (Nelson 2000).

De este modo, el uso que se hizo en este trabajo de concentraciones diferenciales de testosterona y otros esteroides sexuales para asignar las excretas colectadas a cada uno de los sexos debería ser tomado con precaución. El uso de la metodología descrita para sexar hormonalmente las heces de animales silvestres en cautiverio o en vida libre, permite registrar los perfiles de HES para estimar algunos procesos de la biología reproductiva y es un auxiliar en la detección de probables disfunciones reproductivas sin causar estrés por lo que se sugiere como objetivo inmediato, comprobarla en animales que desplieguen comportamientos sexuales normales. Utilizando la metodología paralelamente con observaciones de conducta, se lograría un manejo y conservación de especies más óptimo. Esto porque se podrían detectar alteraciones en el ciclo estral y así establecer, por ejemplo, con mayor precisión que hembras serían las más aptas para ser inseminadas o bien decidir que hembras son las adecuadas para la formación programada de parejas.

Los resultados obtenidos en este trabajo, aunque preliminares, son los primeros que describen en una pareja de lobo mexicano el perfil de HES y su correlación con eventos etológicos sexuales durante la época reproductiva. Nuestro grupo ha iniciado ya un estudio a largo plazo durante el cual se llevarán a cabo determinaciones de los contenidos de HES en heces de un mayor número de ejemplares hospedados en distintas instituciones del país, con el fin de tener evidencias más sólidas sobre la biología reproductiva de esta subespecie.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-2002-C01-0253, para M. A. Armella). Nuestro reconocimiento al Biól. Salvador Gaona por su apoyo al inicio del proyecto. A la Dirección General de Vida Silvestre por las facilidades otorgadas en la realización del trabajo en las instalaciones de la UMA San Cayetano. Al MVZ Luis Domenzain, director de la UMA por sus atenciones mostradas durante la temporada de recolecta de las muestras. Agradecemos a la Dra. Alondra Castro Campillo por habernos ofrecido durante el estudio espacio en su laboratorio para almacenar y procesar las muestras. A los biólogos Carolina Álvarez y Ricardo González les agradecemos su ayuda en las observaciones de conducta. Por último, a los tres revisores anónimos les agradecemos sus comentarios y sugerencias vertidas al manuscrito original, y en particular a la Dra. Carolina Valdespino por su apoyo y sugerencias para la publicación del trabajo.

LITERATURA CITADA

Asa, C. S. 1997. Hormonal and experiential factors in the expression of social and parental behavior in canids Pp. 129-149 *In:* G.N. Solomon and J.A. French (Eds). *Cooperative Breeding in Mammals.* Cambridge University Press. New York.

_____.1999. Dogs (*Canidae*). Pp. 80-87 *In*: E. Knobil and J. D. Neill (Eds). *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. New York.

Ayala-Cano, S. G. 2000. Desarrollo de una metodología para determinar los niveles de hormonas esteroides (P4, T, E2) en excretas de la población de borrego cimarrón *(Ovis canadiensis cremnobates)* en la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. Tesis de Licenciatura.

Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. 69 pp.

_____. 2003. Estrés fisiológico relacionado con la dinámica reproductiva del borrego Cimarrón *(Ovis canadensis cremnobates*) en la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. 159 pp.

Beach, F. A. 1948. *Hormones and behavior*. Paul Hoeber, New York, NY. USA.

_____. 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals. *Horm. and Behav.* 7:105-138.

Bernal, J. F. & J. M. Packard. 1997. Differences in winter activity, courtship and social behavior of two captive family groups of Mexican wolves (*Canis lupus baileyi*). *Zool. Biol.* 16:435-443.

Berkovitz, A. P., N. M. Cezkala & B. L. Lasley. 1978. A new method of sex determination in monomorphic birds. *J. Zool. Anim Med.* 9:114-124.

Bishop, C. M. & M. R. Hall. 1991. Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis. *J. Zool (Lond.)* 224:649-668.

Blanvillain, J. L., J. L.Berthier, M. C. Bomsel-Dmontoy, A. J. Sempéré, G. Olbricht & F. Schwarzenberg. 1997. Analysis of reproductive data and measurement of fecal progestrone metabolites to monitor the ovarian function in the Pudu *Pudu puda (Artiodactyla cervidae)*. *Mammalia* 61:589-602.

Cockrem, J. F. & J. R. Rounce. 1994. Fecal measurements of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation of plasma steroid concentration in the domestic fowl. *Br. Poultry Sci*. 35:433-443.

Esquivel, L. C. & R. M. Páramo. 2001. Eventos endocrinos del ciclo estral de la perra y fármacos utilizados como anticonceptivos y abortivos. *Rev. AMMVEPE* 126:9-11.

Esquivel, L. C., J. A. Rivera Rebolledo, R. M. Páramo, G. López Islas & F. Matacastro. 1994. Utilización de la citología vaginal exfoliativa para el seguimiento del ciclo estral del lobo gris mexicano(*Canis lupus baileyi*). Parte II. Pp. 1-10 *In: Memorias del primer Simposio Nacional sobre el lobo gris mexicano* (*Canis lupus baileyi*) Instituto Nacional de Ecología, México.

García-Moreno J., M. Matoc, M. Roy, E. Geffen & R. K. Wayne. 1996. Relationships and genetic purity of the endagered Mexican Wolf based on analysis of microsatellite loci. *Conserv. Biol.* 10:376-389.

Lasley, B. L. & J. F. Kirpatrick. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *J. Zool. Wildl. Med*. 22:23-31.

Martin, P. & P. Bateson. 1991. *La Medición del comportamiento*. Alianza Universidad. 237 pp.

Mech, D. L. 2000. *Wolf the ecology and behavior of an endangered species*. The University of Minnesota Press, 10th edition, Minneapolis, MN. 384 pp.

Meisel, R. L. & B. D. Sachs. 1994. The physiology of male sexual behavior. Vol. 2. Pp. 3-105 *In*: E. Knobil and Neill J. D. (Eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, NY.

Nelson, R. J. 2000. *An introduction of behavioral endocrinology*. Sinauer Publications, USA.

Norman A.W.& G. Litwack. 1997. *Hormones.* Academic Press. New York. 558 pp.

Plotka, E. D., U. S. Seal & L. J Ozaga. 1983. The adrenal gland in white-tailed deer: a significant source of progesterone. *J. Wildl. Mana*ge. 47:38-44.

Salame-Méndez, A., J. Herrera-Muñoz, N. Moreno-Mendoza & H. Merchant-Larios. 1998. Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J. Exp. Zool.* 280:304-313.

Salame-Méndez, A. & I. Villalpando-Fierro. 1998. La diferenciación sexual en vertebrados: hipótesis y teorías. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 73:89-110.

Salame-Méndez, A., R. M. Vigueras-Villaseñor, J. R. Herrera-Muñoz, E. Mendieta-Márquez, I. H. Salgado-Ugarte, A. Castro-Campillo & J. Ramírez-Pulido. 2003. Inmunolocalización y

contenido de esteroides sexuales en ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* Allen & Chapman, 1897 (Rodentia: Muridae) durante la primera mitad de la preñez. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 88:43-57.

Seal, U. S., F. D. Plotka, J. M. Packard & L. D. L. Mech. 1979. Endocrine correlates of reproduction in the wolf. I. Serum progesterone, estradiol and LH during the estrous cycle. *Biol. Reprod*. 21:1057-1066.

SEMARNAT. 2001. NORM-059. Diario oficial de la federación.

Servín, J. 1991. Algunos aspectos de la conducta social del lobo Mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 45:43-46.

_____. 1997. El período de apareamiento, nacimiento y crecimiento del lobo mexicano (*Canis lupus baileyi). Acta Zool. Mex (n.s.)* 71:45-46.

Shideler, S. E., A. M. Ortuño, F. M. Morán, F. M. Moorman & B. L. Lasley. 1993. Simple extraction and enzime inmunoassay for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during non-conceptive and conceptive ovarian cycles. *Biol. Reprod*. 48:1290-1298.

Siminsky, D. P. 2002. *International studbook for the mexican gray wolf*. Arizona-Desert Museum, Tucson, AZ. USA. 125 pp.

Valdespino, C., C. S. Asa & J. Bauman. 2002. Estrous cycles, copulation and pregnancy in fennec fox (*Vulpes cerda*). *J. Mamm*. 83:99-109.

Velloso, A. L., S. K. Monfort & J. M. Dietz. 1998. Longitudinal and fecal steroids excretion in Maned wolves (*Chrisocyon brachiurus*). *Gen. Comp. Endocrinol*. 112:96-107.

Wasser, S. K., S. L. Monfort, J. Southers & D. E. Wildt. 1994. Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) *faeces. J. Reprod. Fert*. 101:213-220.

Wildt, D. E., P. K. Chakraborty, W. B. Ranko, & S. W. J. Seager. 1978. Relationship of reproductive behavior, serum luteneizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol. Reprod*. 18:561-570.

Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Fourth Edition. Prentice Hall. N.J. USA. 123 pp.

Recibido: 20 de mayo 2003
Aceptado: 1 de abril 2004