



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**EVALUACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN  
HEMBRAS DE BALLENA AZUL (*Balaenoptera  
musculus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA**

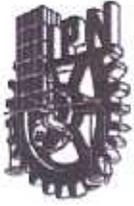
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**PRESENTA**

**MARCIA YOLANDA VALENZUELA MOLINA**

**LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2013**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S. siendo las 10:00 horas del día 31 del mes de Octubre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"EVALUACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN HEMBRAS DE BALLENA AZUL  
(*Balaenoptera musculus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

Presentada por el alumno:

VALENZUELA  
Apellido paterno

MOLINA  
materno

MARCIA YOLANDA  
nombre(s)

Con registro: 

B	1	1	0	4	1	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Director(a) de Tesis

DRA. DIANE GENDRON LANIEL

DRA. SILVIE DUMAS

DRA. CLAUDIA JANETL HERNÁNDEZ CAMACHO

DR. HÉCTOR VILLALOBOS ORTIZ

DRA. DULCE MARÍA BROUSSET HERNÁNDEZ JAUREGUI

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN  
CICIMAR  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 08 del mes Noviembre del año 2013  
el (la) que suscribe MVZ. MARCIA YOLANDA VALENZUELA MOLINA alumno(a) del  
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS  
con número de registro B110415 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DRA. DIANE GENDRON LANIEL

y cede los derechos del trabajo titulado:

"EVALUACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES EN HEMBRAS DE BALLENA AZUL  
(*Balaenoptera musculus*) DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo  
sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la  
siguiente dirección: ciamardelfin@hotmail.com dgendron@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del  
mismo.

*Marcia Valenzuela*

MVZ. MARCIAL YOLANDA VALENZUELA MOLINA

*nombre y firma*

## DEDICATORIAS

Dedico mi trabajo a mi familia querida esto es para ustedes porque son mi motor que siempre me ha impulsado y motivado para alcanzar mis objetivos pero sobre todo lo que me sostiene para no dar marcha a tras cuando las cosas se complican, los quiero mucho gracias por siempre apoyarme en todo, me siento dichosa de tenerlos.

Esto es gracias a ustedes y para ustedes:

Yolanda Molina

Héctor Valenzuela

Gabriel Valenzuela

Héctor Valenzuela

Carlos Valenzuela

Gabriela Lara

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero hacer un agradecimiento sincero a mis amigos ya que han sido mi familia sustituta dándome su apoyo y ayuda moral y a la vez mis asesores y mis mejores críticos académicos, muchas gracias.

Mirsha Mata  
Patricia Rosas  
Lorena Muñoz  
Geraldine Busquets  
Mario Pardo  
Azucena Ugalde  
Jorge Medina

También quiero dar un agradecimiento a todas las instituciones y colaboradores que permitieron la realización de este proyecto gracias por su confianza y apoyo.

American Cetacean Society  
Cetacean Society International  
Society for Marine Mammalogy  
National Marine Fisheries Service  
University of Alaska  
Conacyt  
CICIMAR-IPN

Dra. Shannon Atkinson  
MC. Kendall Mashburn  
Dr. Bob Brownell  
Tec. Arturo Sierra

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>V</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1. Estudios de hormonas esteroides en mamíferos terrestres.....	<b>4</b>
2.2. Estudios de hormonas esteroides en ballenas barbadas....	<b>5</b>
2.3. Hormonas esteroides.....	<b>6</b>
2.4. Concepto de estrés.....	<b>7</b>
2.5. Fisiología del estrés o respuesta al estrés.....	<b>8</b>
2.6. Metabolismo y excreción de las hormonas esteroides.....	<b>10</b>

2.7. Técnicas de evaluación de hormonas esteroides.....	10
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
4.1. Objetivo general.....	13
4.2. Objetivos particulares.....	13
<b>5. ÁREA DE ESTUDIO.....</b>	<b>14</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
6.1 Trabajo de campo.....	15
6.2 Trabajo de laboratorio.....	17
6.2.1. Extracción de hormonas esteroides.....	17
6.2.2. Pruebas de validación de la técnica.....	18
6.2.2.1. Técnica de Paralelismo ( <i>Parallelism</i> ).....	18
6.2.2.2. Técnica de recuperación ( <i>Recovery</i> ).....	18
6.2.2.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por las siglas en inglés de <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> ) .....	18
6.2.3. Radioinmunoensayo (RIA, por las siglas en inglés de <i>Radioimmunoassay</i> ).....	20
6.3. Análisis estadísticos.....	22
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>

7.1. Validaciones de la técnica de RIA.....	23
7.2. Recolecta de muestras e historial de avistamientos de ballena azul.....	26
7.3. Hormonas esteroides.....	29
7.3.1. Progesterona.....	29
7.3.2. Cortisol.....	29
7.3.3. Corticosterona.....	29
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
8.1. Validación de la técnica.....	36
8.2. Hormonas esteroides.....	36
8.2.1. Progesterona.....	36
8.2.2. Glucocorticoides.....	42
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>10. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Área de estudio, región suroeste del Golfo de California (entre Loreto y la Paz).....	14
<b>Figura 2.</b> Protocolo de recolecta de heces en campo, preservadas en seco para análisis endocrinológicos (Gendron, no publicado).....	16
<b>Figura 3.</b> Perfiles inmunoreactivos de glucocorticoides a partir de un <i>pool</i> de muestras de heces de hembras de ballena azul del Golfo de California.....	25
<b>Figura 4.</b> Concentración de progesterona fecal en individuos de ballena azul (Escala logarítmica). Las líneas horizontales representan la media (línea central) y el error estándar (línea superior e inferior a la media) ( $\bar{x} \pm EE 460.92 \pm 94.48 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Los valores que se ubicaron en la parte externa de los parámetros de la media y error estándar, es decir $>555 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ fueron categorizados como hembras gestantes.....	30
<b>Figura 5.</b> Concentración de 3 hormonas esteroides: corticosterona, cortisol y progesterona a partir de heces en hembras adultas de ballena azul. La línea en el medio de la caja representa la mediana, y la caja comprende del 25-75% de los datos, los bigotes fuera de la caja comprenden del 5-95% de los datos. Se cuenta con un solo dato para macho maduro. (Gestantes: n=5; Hembra en reposo: n=10; Lactantes: n=7 y Macho Maduro: n=1).....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Validación de la técnica de análisis de hormonas esteroides mediante la técnica de recuperación en heces de ballena azul. (CV: coeficiente de variación).....	24
<b>Tabla II.</b> Historial de avistamiento de ballenas azules muestreadas durante el periodo 2009-2012, con información sobre individuo (ID) y edad mínima inferida, basada en el año de primer avistamiento. Una ballena azul se considera adulta a partir de los 5 años de edad, así se infiere que una hembra acompañada de una cría avistada por primera vez, tendría al menos la edad mínima adulta (5 años).....	27
<b>Tabla III.</b> Concentración de hormonas esteroides (PROG= progesterona, CNA= corticosterona, COR= cortisol) para cada individuo (ID). Información sobre sexo y estado reproductivo (EDO. REPRO). Los individuos marcados con *corresponden al promedio de 2 muestras duplicadas a lo largo del mismo día.....	28
<b>Tabla IV.</b> Comparación de concentraciones promedio de progesterona y corticosterona ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ heces en base seca) con referencia al estado reproductivo del individuo ID# 124 en distintas fechas de muestreo en el Golfo de California.....	32
.	
<b>Tabla V.</b> Comparación de concentraciones promedio de progesterona ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ heces en base seca) con referencia al estado reproductivo del individuo ID# 65 y el ID# 41 en dos fechas distintas de muestreo en el Golfo de California.....	33
<b>Tabla VI.</b> Concentración de hormonas esteroides ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ heces base seca) por estado reproductivo en hembras adultas de ballena azul del Golfo de California. Los valores de las medias están presentados con el error estándar ( $\bar{x} \pm \text{EE}$ ) .....	35
<b>Tabla VII.</b> Comparación de concentraciones promedio de progesterona en 4 especies de misticetos por estado reproductivo.....	38

## GLOSARIO

**Anticuerpo:** Una inmunoglobulina producida contra un antígeno específico.

**Edad mínima inferida:** Edad considerada a partir del año en que una ballena azul es foto-identificada.

**Estrés:** Cualquier disturbio significativo de la homeostasis, por factores ambientales o psicológicos.

**Estresor:** Una condición, agente, u otro estímulo que provoque estrés a un organismo.

**Foto-identificación:** Identificación de individuos mediante fotografías. Para ballena azul se utiliza la comparación de manchas en el dorso, ya que cada individuo tiene un patrón de pigmentación único desde el nacimiento.

**Gónadas:** Órganos endocrinos que producen esteroides sexuales y gametos o células sexuales; como son los ovarios y los testículos.

**Glucocorticoides:** Forman uno de los dos tipos de corticosteroides, secretados por la corteza de la glándula adrenal. Los cuales están involucrados en el metabolismo de los carbohidratos y son liberados comúnmente en respuesta a un estímulo estresante.

**Hembra gestante:** En este estudio se denomina como hembra gestante a los individuos que presentan niveles de progesterona  $> 555 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ .

**Hembra en reposo:** Individuo foto-identificado con una edad mínima de 5 años, considerado como ballena adulta y sexualmente madura, sin encontrarse acompañada por una cría en el momento de muestreo.

**Hembra lactante:** Individuo en periodo de lactancia caracterizado por estar acompañado de una cría.

**Homeostasis:** Es el mantenimiento de un estado de equilibrio dentro de un organismo, por medio de mecanismos de retroalimentación fisiológicos o de comportamiento.

**Hormonas esteroideas:** Son una clase de sustancias químicas liposolubles relacionadas estructuralmente, que se derivan del colesterol y se caracterizan por presentar tres anillos de seis-carbonos y un anillo conjugado de cinco-carbonos. En los mamíferos cumplen importantes funciones como de regulación, estructurales y hormonales.

**Metabolito:** sustancia o molécula producida a partir de reacciones químicas que ocurren en el organismo (metabolismo).

**Radioinmunoensayo:** Técnica empleada para medir hormonas o sustancias biológicas utilizando anticuerpos y uniones radio-marcadas.

**Sensibilidad:** Se define como la concentración mínima detectable. Es la concentración más baja detectada que es estadísticamente diferente de cero.

## RESUMEN

El estudio de hormonas reproductivas y de estrés, ha permitido definir el estado endocrino de especies silvestres, revelando el mecanismo de las funciones internas por el cual los individuos responden a algunos desafíos de su ambiente y convirtiéndose en una herramienta para evaluar el estrés fisiológico con intereses de conservación. La finalidad de este estudio es la evaluación de hormonas esteroides para contribuir con un nuevo parámetro de salud en el diagnóstico integral del estado poblacional de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), en el suroeste del Golfo de California, un área invernal importante de alimentación, crianza y reproducción en su ciclo migratorio. Se determinó un parámetro de referencia de la hormona corticosterona para hembras de ballena azul por estado reproductivo: hembras gestantes, en reposo y lactantes a partir de muestras de heces. Previamente se evaluó el estado de gestación de hembras de ballena azul, midiendo sus niveles de progesterona. Se recolectó un total de 31 muestras de heces, provenientes de 24 hembras adultas, 1 macho maduro y 6 individuos de sexo no determinado, durante el periodo 2009-2012. Éstas fueron deshidratadas al sol y preservadas a temperatura ambiente hasta su análisis. Se extrajeron las hormonas esteroides y se validó la técnica de radioinmunoensayo para cortisol, corticosterona y progesterona, mediante los métodos de recuperación, paralelismo y cromatografía líquida de alta eficacia. Se categorizaron como hembras gestantes a los individuos que presentaron concentraciones de progesterona  $> 555 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , es decir valores superiores al margen de la media ( $\bar{x}$ ) y error estándar (EE) de todas las hembras ( $\bar{x} \pm \text{EE}: 460.92 \pm 94.48 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Siendo distintivos los valores altos de progesterona ( $\bar{x} \pm \text{EE}: 1835.07 \pm 503.13 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ), los cuales fueron hasta 35 veces más altos respecto a los demás estados reproductivos: hembras en reposo ( $W=50, p < 0.001; \bar{x} \pm \text{EE}: 80.4 \pm 44.48 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y hembras lactantes ( $W=35, p= 0.002; \bar{x} \pm \text{EE}: 22.98 \pm 5.37 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Los valores de corticosterona en hembras gestantes mostraron una tendencia similar a la de progesterona ( $\bar{x} \pm \text{EE}: 48.24 \pm 9.84 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ), siendo éstos valores 2 veces más altos respecto a los demás estados reproductivos: hembras en reposo ( $W=47, p= 0.004; \bar{x} \pm \text{EE}: 18.46 \pm 1.90 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y hembras lactantes ( $W=33, p=0.010; \bar{x} \pm \text{EE}: 16.85 \pm 2.85 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). En contraste el cortisol mostró una alta variabilidad y no se encontraron diferencias significativas ( $X^2= 3.58, \text{gdl} = 3, p= 0.310$ ) entre los 3 estados reproductivos. Los resultados reflejan la asociación que existe entre corticosterona y progesterona, conocida para otros mamíferos.

Palabras clave: Ballena azul, glucocorticoides, corticosterona, progesterona, estrés, parámetro de referencia, Golfo de California.

## ABSTRACT

The study of stress and reproductive hormones has proved to be useful in defining the endocrine status of wildlife species, revealing the mechanism of internal functions by which individuals respond to some environmental challenges. Being used as a tool to assess physiological stress with conservation interests. The aim of this project is the steroid hormone assessments to contribute with a new health parameter in the integral diagnosis of the population status of blue whales in the southwestern Gulf of California, an important wintering area for feeding, breeding and nursing during their migratory cycle. We determined a reference parameter of corticosterone hormone by reproductive status in pregnant, resting and lactating female blue whales in feces. Previously we assessed pregnancy status by measuring progesterone levels. A total of 31 fecal samples were collected (24 adult females, 1 adult male and 6 individuals of unknown-sex) during the 2009-2012 period. The samples were dried after collection and stored until analysis. We extracted steroid hormones and validated radioimmunoassay for cortisol, corticosterone and progesterone, through recovery, parallelism and high performance liquid chromatography. The pregnant females were categorized as the individuals that presented concentrations  $> 555 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , i.e. higher values above the margin of the mean ( $\bar{x}$ ) and standard error (EE) of all females ( $\bar{x} \pm \text{EE}: 460.92 \pm 94.48 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). High concentrations of progesterone were distinctive ( $\bar{x} \pm \text{EE}: 1835.07 \pm 503.13 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ), which were up to 35 times higher than resting females ( $W=50, p < 0.001; \bar{x} \pm \text{EE}: 80.4 \pm 44.48 \text{ ng/g}$ ) and lactating females ( $W=35, p= 0.002; \bar{x} \pm \text{EE}: 22.98 \pm 5.37 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Pregnant females also showed higher concentrations of corticosterone ( $\bar{x} \pm \text{EE}: 48.24 \pm 9.84 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) which were up to 2 times higher than resting females ( $W=47, p= 0.004; \bar{x} \pm \text{EE}: 18.46 \pm 1.90 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and lactating females ( $W=33, p=0.010; \bar{x} \pm \text{EE}: 16.85 \pm 2.85 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). In contrast, cortisol showed a high variability and we did not find significant differences ( $X^2= 3.58, \text{df}= 3, p= 0.310$ ). These results indicate an association between corticosterone and progesterone, similar to other mammals. A reference parameter of concentrations of corticosterone ( $8.17\text{--}79.11 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) for female blue whales in the current conditions were successfully established and are now validated bioindicators that contribute to the welfare monitoring of female blue whales from the Gulf of California

Keywords: Blue whale, glucocorticoids, corticosterone, progesterone, stress, reference parameter, Gulf of California.

## 1. INTRODUCCIÓN

La ballena azul (*Balaenoptera musculus*), pertenece al suborden Mysticeti donde se ubican las ballenas barbadas, y concierne a la familia Balaenopteridae, la cual pertenece al grupo de cetáceos conocido como rorcuales. Es el mamífero más grande que haya existido en la tierra y se encuentra en todos los océanos del mundo (Yochem & Leatherwood, 1985). Debido a su gran tamaño, fue perseguido por la caza ballenera moderna lo que llevó a la severa reducción de sus poblaciones (Small, 1971). Se le concedió protección a la especie por la Comisión Internacional Ballenera (CIB, en inglés: IWC) hasta el año 1966 (Yochem & Leatherwood, 1985). Debido a la lenta recuperación de sus poblaciones sigue catalogada como especie en peligro, en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, en inglés: IUCN, Reilly *et al.*, 2008). Asimismo la especie está incluida en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) y se encuentra catalogada como: Sujeta a protección especial (Pr) por parte de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (NOM-059-SEMARNAT-2010).

Es una especie vivípara y homeoterma, que regularmente se le encuentra sola o en pares. Las hembras paren una cría cada dos o tres años tras una gestación aproximada de 10 a 11 meses. Alcanza su madurez sexual entre los 5-15 años de edad aproximadamente (Sears, 2002).

La población de ballena azul del Pacífico Noreste, considerada la más saludable (Sears, 2002) y con alrededor de 3000 individuos (Calambokidis & Barlow, 2004), se distribuye entre las zonas de alimentación desde el Golfo de Alaska hasta California en verano (Fiedler *et al.*, 1998; Calambokidis *et al.*, 2009). En invierno y parte de la primavera, alrededor de 300 individuos migran al Golfo de California

(Gendron, 2002) y otra porción no conocida migra hasta el Domo de Costa Rica (Mate *et al.*, 1999). El Golfo de California es una región de alimentación, crianza y reproducción de alta calidad para la ballena azul. No obstante, se ha observado un incremento en las actividades de observación turística conocida como “whale-watching” en ésta especie (Gendron, 2002). Aunque la actividad de observación es estacional y su práctica ha iniciado recientemente en México, el incremento de embarcaciones ha sido notable, particularmente en la región costera del suroeste del Golfo de California. El cambio del uso marítimo en la zona costera preferida por las hembras de ballena azul con sus crías, cuestiona si podría repercutir en su conservación en el futuro (Gendron, 2002).

Previamente se ha documentado como los efectos de actividades de avistamiento de ballenas, ha tenido impactos a largo plazo. Algunos cetáceos pueden empezar a evitar ciertas áreas si los disturbios alcanzan cierto umbral o si existe un bajo costo al hacerlo (ver, Lusseau & Bejder 2007). Esto puede ocurrir por factores considerados estresantes que provocan un incremento en el costo energético del organismo, ya sea por mas energía invertida en navegación o disminución en el tiempo de descanso y de forrajeo, lo que conduce a reducir el estado físico de los individuos, y a nivel fisiológico puede inducir un decremento en la reproducción. Si estos factores de estrés ocurren continuamente las especies tienden a cambiar la estrategia de evasión del área a largo plazo (Lusseau & Bejder 2007), como ha sido observado en orcas residentes del Norte en Colombia Británica en Canadá (*Orcinus orca*; Williams *et al.*, 2006).

Por otra parte, existen estudios que indican como los programas de turismo responsable pueden afectar mínimamente a las especies y pueden proporcionar el incentivo económico necesario para los administradores locales para mantener los parques y reservas intactas, como ha sido observado en monos aulladores (*Alouatta seniculus*; Westin, 2007).

El presente estudio es el inicio de un parámetro de referencia mediante el uso de hormonas glucocorticoides como una herramienta para evaluar el estrés fisiológico, con la finalidad de monitorear si el incremento de actividades turísticas en el Suroeste del Golfo de California podría comprometer la salud y el bienestar de la ballena azul, siendo una manera preventiva de crear programas de turismo responsables. Esto mediante el empleo de técnicas no invasivas, como lo es la recolecta de heces para evaluar metabolitos hormonales, ya que es posible obtener una muestra sin perturbar al animal (Monfort, 2002; Millspaugh & Washburn, 2004).

La implementación de estudios de glucocorticoides a partir de metabolitos fecales está siendo de gran utilidad e interés con fines de conservación, debido a que el estrés puede alterar el comportamiento del animal, reducir la resistencia a enfermedades y afectar el rendimiento de las poblaciones (Millspaugh *et al.*, 2002; Millspaugh & Washburn, 2004). La evaluación de hormonas esteroides fecales en fauna silvestre, tiene una variedad de aplicaciones entre las que se encuentra el observar el funcionamiento normal y anormal del sistema endocrino enfocado a la función específica de las hormonas, por ejemplo para inferir gestación (hormona progesterona) o para cuestiones de estrés y salud en general (glucocorticoides).

En el caso de la ballena azul donde no se cuenta con un registro previo de una valoración hormonal que indique cuáles son las concentraciones normales, se requiere determinar un parámetro de referencia para tener valores con los cuales poder comparar en el futuro. En el presente trabajo se estimó el estado de gestación mediante la cuantificación de la hormona progesterona y se determinó un parámetro de referencia de los niveles de hormonas glucocorticoides (cortisol y corticosterona), en distintos estados reproductivos de hembras de ballenas azules que visitan el Golfo de California. Estos resultados fueron respaldados con el historial de avistamientos de individuos foto-identificados (1988-2012). Esta investigación permitirá reconocer cambios a nivel hormonal a través del tiempo, como parte del monitoreo de la salud de la especie.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Estudios de hormonas esteroides en mamíferos terrestres**

Diversos tipos de muestras, como fluidos (sangre), secreciones (orina, saliva, heces) y tejidos (biopsias de grasa, pelo) son útiles para realizar estudios endocrinos. El tipo de muestra más comúnmente recolectado para análisis hormonales, ha sido la sangre (Aubin, 2001). Sin embargo, recolectar este tipo de muestras requiere de contención física o anestesia, lo cual suele ser estresante y peligroso, así como costoso e impráctico. Además, el estrés fisiológico resultante de la manipulación, puede interferir en los valores normales de las hormonas (Monfort, 2002). Por lo cual en animales de granja, de zoológico y sobre todo en animales de vida silvestre se ha optado por el empleo de técnicas no invasivas, que tienen la ventaja de que pueden reflejar episodios similares que ocurren normalmente en la circulación sanguínea (Schwarzenberger *et al.*, 1996).

Análisis de corticosteroides y hormonas reproductivas en excretas fecales han sido utilizados en el monitoreo del estatus endócrino en mamíferos terrestres y en aves en cautiverio y en estado silvestre (Brown *et al.*, 1994; Monfort, 2002; Schwarzenberger, 2007). Estos estudios son de utilidad ya que brindan conocimiento sobre el estado reproductivo, y condiciones de salud. Además, mediante ésta técnica no invasiva se ha evaluado el estrés asociado a: dominancia, agresividad y disturbios humanos (Monfort, 2002), teniendo importantes implicaciones en el bienestar animal en cuestiones de conservación y manejo de vida silvestre (Monfort, 2002; Walker *et al.*, 2005).

## 2.2. Estudios de hormonas esteroides en ballenas barbadas

En los misticetos se desconoce gran parte de su fisiología, debido a su gran tamaño y hábitos acuáticos con muy poco tiempo de estadía en la superficie, lo cual hace logísticamente complicado el muestreo de sangre requerido para éste tipo de estudios (Hunt *et al.*, 2006). Como consecuencia muchas preguntas sobre el funcionamiento interno de estas especies quedan sin respuesta.

Existen dos antecedentes en el Laboratorio de Ecología de Cetáceos y Quelonios del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) relacionados con hormonas en ballena azul en el Golfo de California. El primero consistió en la valoración de hormonas esteroides en biopsias de grasa (Martínez-López, 2009), el cual mostró asociaciones entre las hormonas esteroides, así como diferencias en las concentraciones con respecto al sexo. Se observaron tendencias similares por estado reproductivo en comparación a los estudios en ballena franca de Rolland *et al.*, 2005 y Hunt *et al.*, 2006. Sin embargo, no se determinó gestación en este estudio. El segundo trabajo fue a partir de muestras de heces en base seca, en el cual se logró estimar el estado reproductivo de gestación, mediante altas concentraciones de progesterona que presentaron varias hembras, corroborándolo al identificar a una de ellas acompañada de una cría al año siguiente de su avistamiento (Gendron, 2010).

Uno de los primeros estudios de evaluación de hormonas esteroides en ballenas barbadas utilizando muestras de heces, se realizó en la ballena franca del Atlántico Norte, como una alternativa clave para la problemática en la cual se encuentra ésta especie. La ballena franca esta categorizada como especie en peligro, por parte de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, en inglés: IUCN) (Reilly *et al.*, 2012), debido al bajo número de su población y al decline en la tasa de reproducción (Kraus & Hatch, 2001). Además de contar con una distribución que incluye una de las áreas costeras más urbanizadas del mundo como lo es la Bahía de Fundy (Kraus & Rolland, 2007). En ésta especie se logró

evaluar satisfactoriamente hormonas sexuales por estado reproductivo, género y categoría de edad (Rolland *et al.*, 2005), y también hormonas glucocorticoides como un indicativo de estrés y condiciones de salud (Hunt *et al.*, 2006). Recientemente se evidenció el ruido marítimo como un estresor (Rolland *et al.*, 2012), lo cual es un ejemplo claro del empleo de las hormonas esteroides para la conservación y salud de ballenas barbadas.

### **2.3. Hormonas esteroides**

Las hormonas son sustancias bioquímicas, el término proviene del griego y significa "poner en movimiento". Éstas actúan como agentes muy potentes, capaces de influenciar en las funciones celulares para establecer un ambiente interno óptimo para una serie en particular de cambios y necesidades de supervivencia (Norris, 1996; Aubin, 2001; Squires, 2003; Nelson, 2011). Existen varios tipos de hormonas como son las hormonas esteroides donde el colesterol es su principal precursor y se caracterizan por ser liposolubles así como por su estructura química de tres anillos de seis-carbonos y un anillo conjugado de cinco-carbonos. Las tres principales fuentes que las secretan son: las glándulas adrenales, gónadas y el cerebro (Nelson, 2011).

En las gónadas, las hormonas esteroides que se secretan son las sexuales y una de ellas es la progesterona (prepara ("pro") a la matriz para la gestación). Esta hormona esteroide en mamíferos es de importancia ya que se encarga de mantener la gestación, estableciendo una vascularización alta en el útero necesaria para la implantación y desarrollo del embrión, asimismo se encarga de finalizar el comportamiento reproductivo, inhibiendo el ciclo del centro hipotalámico GnRH (por sus siglas en inglés, hormona liberadora de gonadotropina) durante la fase lútea evitando un segundo episodio ovulatorio (Norris, 1996; Senger, 1999; Nelson, 2011). La progesterona ha sido de utilidad en gran número de mamíferos domésticos, como herramienta diagnóstica de gestación, asociada con concentraciones mayores a

aquellas observadas en animales no gestantes (Engeland *et al.*, 1997; Chadio *et al.*, 2002).

En la corteza de las glándulas adrenales se secretan los glucocorticoides (cortisol y corticosterona) teniendo diversas funciones en estados de tensión (estrés): se inhibe la utilización de glucosa por tejidos periféricos, y alteran el metabolismo de los carbohidratos, ya que el principal propósito es incrementar y conservar la circulación de substratos de energía, y así se da preferencia al cerebro para la utilización de éstos. Asimismo los glucocorticoides, intensifican las acciones de la hormona de crecimiento en la lipólisis del tejido adiposo, los cuales son convertidos por el hígado en glucosa extra. Otra función es que permiten a las catecolaminas actuar en la vía metabólica y en la vasculatura arterial, y proveen adaptaciones de protección para el estrés, limitando las reacciones inmunológicas, incluyendo la inflamación, disminuyendo tejido y células dañadas (Munck *et al.*, 1984; Breazile, 1988; Norris, 1996).

Una gran variedad de estímulos específicos e inespecíficos pueden aumentar los glucocorticoides: traumatismos, miedo, calor o frío intensos, enfermedades, ejercicio, ambiente nuevo, gestación, ruido constante, agresión, separación madre-cría y otros más (Broom & Johnson, 1993).

#### **2.4. Concepto de estrés**

El estrés (del inglés stress, “tensión”) es el reconocimiento por parte del cuerpo de un factor que provoque la pérdida de la homeostasis dicho factor se conoce como estrés o estresor (Salposky, 1994; Chrousos, 1998). Y homeostasis es el término utilizado para indicar un balance o condiciones constantes en el ambiente fisiológico interno (Guyton & Hall, 1996). Un estímulo de estrés altera la homeostasis

y el mecanismo de retroalimentación tanto fisiológicamente como en la conducta del animal, como respuesta para restaurar el equilibrio (Stratakis & Chrousos, 1995).

## **2.5. Fisiología del estrés o respuesta al estrés**

La respuesta al estrés comprende dos etapas y ambas pueden afectar las interacciones hormonales y de comportamiento (Selye, 1937; Sapolsky, 1994). El estrés a corto-plazo se define como una respuesta adaptativa que ayuda a los individuos a hacer frente a situaciones de emergencia, por ejemplo cuando una presa es perseguida por su depredador. El estrés a largo-plazo se define como una respuesta que tiende a ser no-adaptativa (Selye, 1937). Es decir un factor constante que afecte el bienestar del individuo, por ejemplo un mamífero marino enmallado en una red durante un largo periodo de tiempo.

Dos sistemas endocrinos constituyen los principales componentes de la respuesta al estrés: 1) mediante la adrenalina a partir de la médula adrenal y 2) mediante los glucocorticoides a partir de la corteza adrenal (Stratakis & Chrousos, 1995). Estas respuestas fisiológicas al estrés se inician con la percepción del estímulo estresante por el hipotálamo. Éste estimula al sistema nervioso simpático que libera norepinefrina y epinefrina (adrenalina), las cuales promueven un incremento en la actividad motora, el ritmo cardiaco y la energía a través de la glicolisis y la lipólisis. Esta respuesta inmediata, en segundos (estrés agudo o a corto plazo) tiene como finalidad facilitar la huida o enfrentar al agente estresante (Knol, 1991; Nelson 2011).

En el mediano plazo (2-10 minutos) se activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales. En este caso, el hipotálamo estimula a la glándula hipófisis a liberar hormonas adrenocorticotrópicas (ACTH), que llegan a la corteza de las glándulas adrenales y promueven la liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo (Knol, 1991; Herman & Cullinam, 1997; Nelson, 2011).

En el caso de que un factor estresante sea constante (estrés crónico o de largo plazo) los glucocorticoides permanecen elevados por más tiempo (algunos días), y provocan una amplia variedad de consecuencias negativas (Sapolsky, 1992). Estos efectos negativos aparecen como patologías en el largo plazo e incluyen la depresión del sistema inmune, favoreciendo un incremento en la susceptibilidad a enfermedades (Munck *et al.*, 1984), la inhibición de la reproducción (Ferin, 1999; Wingfield & Sapolsky, 2003), la pérdida de tejido muscular (aun el cardíaco) y el decremento en la capacidad de aprendizaje (McEwen & Sapolsky, 1995).

El estrés es de importancia en cuestiones reproductivas, ya que contribuye como un factor en la disfunción sexual, así como en la infertilidad. Esto se debe a que la secreción de hormonas hipotalámicas e hipofisarias como la CRH (hormona liberadora de corticotropina) y la ACTH (hormona adrenocorticotropa), que promueven la reacción de estrés, afectan también la ritmicidad de las hormonas que regulan los ciclos reproductivos, afectando consecuentemente las concentraciones de estrógenos en las hembras (Dobson & Smith, 2000) y de andrógenos como la testosterona en los machos (Cummings *et al.*, 1983).

En machos una variedad de estresores se han reportado como supresores de la reproducción (Nelson, 2011). Mediante una serie de estudios en individuos machos de diversos mamíferos terrestres, como: ratones, ratas, búfalos, toros y monos ardilla se ha demostrado que al ser expuestos a condiciones estresantes específicas, los niveles de testosterona en plasma disminuyen (Knol, 1991). El estrés inhibe la producción de testosterona, y las concentraciones bajas de ésta hormona reducen la libido y el rendimiento sexual.

En hembras el estrés puede interrumpir el ciclo estral, lo que se ha observado en animales de laboratorio, domésticos y de zoológico, mientras que en mujeres resulta en el cese del ciclo menstrual (amenorrea) (Welsh *et al.*, 1999). Asimismo puede interrumpir la preñez y la lactación si las condiciones estresantes son muy severas (Nelson, 2011).

Es importante señalar que los mamíferos cuentan con mecanismos para inhibir la reproducción cuando caen en un balance energético negativo (Bronson, 1999). La supresión de la reproducción en respuesta al estrés puede ocurrir, en varios niveles fisiológicos y de comportamiento y pueden tener efectos severos en humanos y animales (Welsh *et al.*, 1999).

## **2.6. Metabolismo y excreción de las hormonas esteroides**

El órgano principal de desactivación y catabolismo de los esteroides es el hígado (Siiteri, 1981). Los esteroides parentales o metabolizados (hidroxilados, reducidos, sulfatados o glucoronidos), libres y/o unidos a proteínas acarreadoras, pasan al intestino emulsificados en los ácidos biliares, lo cual permite que sean eliminados en la materia fecal (Norman & Litwack, 1987; Cockrem & Rounce, 1994). Esta ruta fisiológica es la que permite determinar el funcionamiento gonádico y adrenal de un organismo por métodos no invasivos. Obteniendo excretas de los organismos de interés y evaluando en ellas las concentraciones de esteroides parenterales o metabolitos, es posible conocer el estado de un organismo sin necesidad de tomar una muestra de sangre (Heistermann *et al.*, 1995; von der Ohe & Servheen, 2002). Las cantidades que se eliminan en las excretas corresponden a la producción acumulada a través del tiempo, por lo que el tiempo de eliminación depende de la especie y factores fisiológicos (Valdespino *et al.*, 2007; Kraus & Rolland, 2007).

## **2.7. Técnicas de evaluación de hormonas esteroides**

La cuantificación de los metabolitos de las hormonas esteroides presentes en una muestra, se pueden llevar a cabo mediante diferentes inmunoanálisis como son: el radioinmunoensayo (RIA), el enzaimmunoanálisis (EIAs) y pruebas inmunoabsorbentes de unión enzimática (ELISA) (Wasser *et al.*, 2000).

## **Interpretación con análisis de glucocorticoides**

Los Análisis endocrinos a partir de muestras fecales deben ser siempre validados cuidadosamente. Debido a que las hormonas en este tipo de muestras pueden ser metabolizadas en el intestino de los mamíferos en forma de diversos metabolitos (en ocasiones desconocidos), con afinidades impredecibles para unirse a los anticuerpos (Wasser *et al.*, 2000). Debido a las limitaciones logísticas antes mencionadas la mayoría de las validaciones estándar, como son la infusión de cortisol marcado radioactivamente, o la administración de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), prueba de supresión con dexametasona, etc. (Brousset *et al.*, 2005) son imposibles de realizarse en ballenas barbadas (Hunt *et al.*, 2006).

Sin embargo una de las ventajas en la especie de estudio es que se cuenta con un historial de avistamientos desde 1988, donde se cuenta con más de 649 individuos foto-identificados y más de 323 con sexo determinado, además de datos de historial de crías. Lo que permite comparar las concentraciones de hormonas esteroides de individuos conocidos de los cuales se espera a priori, que posean cierta actividad adrenal. Por ejemplo se sabe que los glucocorticoides en heces tienden a incrementar durante la gestación (Foley *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2006) y también se encuentran elevados en animales heridos o enmallados, a diferencia de animales inmaduros y en estado no reproductivo donde los valores son muy bajos (Hunt *et al.*, 2006).

En base a esto se planteó la hipótesis si las hembras de ballena azul del Golfo de California, presentarían diferencias en la concentración de glucocorticoides en heces, de acuerdo a su estado reproductivo. Por lo cual se determinaron las concentraciones de hormonas esteroides en las condiciones actuales en las que se encuentra la especie.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La región del suroeste del Golfo de California representa un hábitat crítico para la población de ballena azul del Pacífico noreste, utilizada de manera estacional para alimentarse, cuidar a sus crías y para reproducirse (Gendron, 2002).

En la última década se han incrementado actividades turísticas relacionadas con ballena azul en el área de estudio, (Parque Nacional Marino de bahía de Loreto y bahía de La Paz, B.C.S.) y se prevé que habrá desarrollos costeros importantes, los cuales traerán un incremento en el tráfico marítimo así como en la demanda de actividades relacionadas a la observación de esta especie.

A partir de los resultados de esta investigación se podrá establecer un parámetro de referencia de las hormonas glucocorticoides en las condiciones actuales en las que se encuentra ésta especie, previo a que ocurran cambios significativos en la región, permitiendo así, monitorear variaciones a través del tiempo.

Asimismo se espera que este trabajo auxilie en el diagnóstico integral del estado de la población combinando diversos parámetros poblacionales, de salud y ambientales recolectados a largo plazo. El conjunto de estos estudios, facilitará proponer lineamientos y soluciones para el plan de manejo y conservación de la especie en esta zona.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

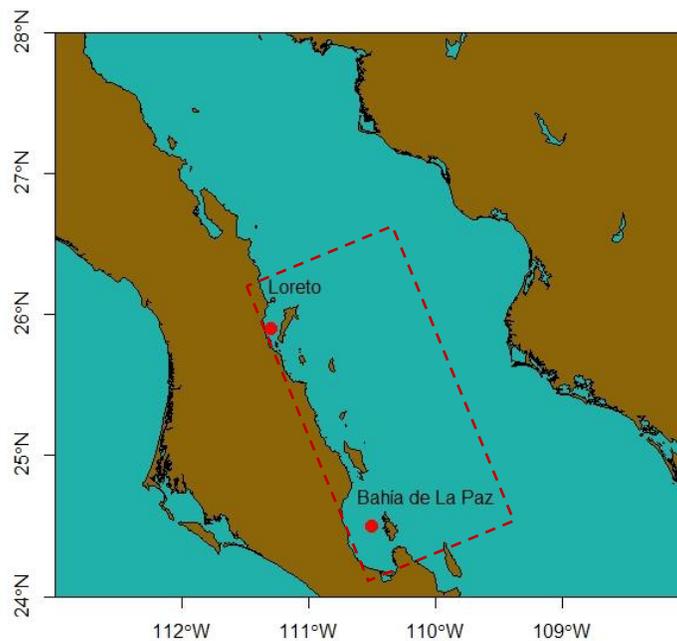
Determinación de un parámetro de referencia de concentraciones de glucocorticoides por estado reproductivo en heces de hembras de ballena azul del Golfo de California.

### **4.2. Objetivos particulares**

- Validación de la técnica de análisis de hormonas glucocorticoides en heces de ballena azul.
- Determinación de hembras gestantes, mediante la evaluación de la hormona esteroide progesterona.
- Determinación de la variabilidad de glucocorticoides entre hembras gestantes, en reposo y lactantes.

## 5. ÁREA DE ESTUDIO

El Golfo de California se encuentra en una zona subtropical de alta productividad primaria propiciada por las características hidrográficas de esta región (Álvarez-Borrego, 1983). Topográficamente presenta diversas cuencas que conforme se distribuyen hacia el Sur van aumentando en profundidad, confiriéndole ciertas características morfológicas que permiten dividirlo en 3 zonas: norte, centro y sur (Álvarez-Borrego & Lara-Lara, 1991). Al Oeste está limitado por la Península de Baja California y al Este por los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Jalisco (Roden, 1964). El área de estudio se ubica en la región suroeste del Golfo de California (Fig. 1). En esta región se presentan características únicas por ser una zona de transición tropical-subtropical debido a que es cruzado por el trópico de Cáncer y es influenciado por las aguas del Océano Pacífico. Las corrientes que presenta son generadas por diferencias termo-halinas y vientos predominantes en invierno y verano (Marione, 2003).



**Figura 1.** Área de estudio, región suroeste del Golfo de California (entre Loreto y La Paz)

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Trabajo de campo

El presente estudio se llevó a cabo utilizando muestras del banco de heces del Laboratorio de Ecología de Cetáceos y Quelonios del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), conservadas en seco desde el año 2009. Las muestras de heces provienen de diferentes muestreos realizados en el área de la Bahía de La Paz y Loreto Baja California Sur, de manera oportunista en la superficie del mar dentro de la huella que deja el individuo al sumergirse a un buceo profundo (detalles en Flores-Cascante, 2012). El muestreo se llevo a cabo a bordo de embarcaciones menores: lanchas de 7 m de eslora con motor fuera de borda y de 9 m de eslora con motor diésel. Durante un avistamiento de ballena azul se tomaron fotografías para foto-identificación (Gendron & Ugalde de la Cruz, 2012), y datos generales como fecha, hora, coordenadas geográficas (GPS en tiempo real), estado del mar (escala Beaufort) entre otros. Para la determinación de sexo (Enríquez-Paredes, 2005) se obtuvieron biopsias de piel y grasa mediante una flecha diseñada para tal fin disparada por una ballesta (detalles en Gendron, 2002). Para la evaluación hormonal, se obtuvieron las muestras de heces mediante una red de nylon para piscina y se vertieron y homogenizaron en cajas petri, para ser deshidratadas al sol a bordo de la embarcación. Las muestras secas fueron posteriormente pulverizadas y transferidas en viales criogénicos, obteniendo así una muestra en base seca, las cuales fueron conservadas a temperatura ambiente hasta su procesamiento (Fig. 2) (Gendron, 2011).

Asimismo en este laboratorio se cuenta con una base de datos sobre el historial de avistamientos de individuos de ballena azul foto-identificados desde 1988 a la fecha, que contiene información sobre el sexo, categoría de edad y el estado

reproductivo de los individuos. Se verificó la identidad de los individuos comparando las fotografías asociadas a las muestras colectadas con el catálogo de ballena azul, obteniendo información específica sobre el individuo tales como sexo, categoría de edad, avistamientos con crías y estado reproductivo.



**Foto-identificación**



**Recolecta de heces**



**Secado en caja petri al sol**



**Heces en base seca**

**Figura 2.** Protocolo de recolecta de heces en campo, preservadas en seco para análisis endocrinológicos (Gendron, no publicado).

## **6.2. Trabajo de laboratorio**

Se realizaron diferentes pruebas de laboratorio para la evaluación de tres hormonas esteroides (progesterona, cortisol y corticosterona). Se llevó a cabo la extracción hormonal, asimismo se realizó la prueba de Recuperación y Paralelismo para la validación de la técnica usando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para separación y cuantificación hormonal y la prueba de Radioinmunoensayo para análisis y cuantificación de las hormonas. Las pruebas se realizaron en el laboratorio de endocrinología de la Universidad de Alaska Fairbanks en Juneau AK, EUA., en colaboración con la Dra. Shannon Atkinson y la M.C. Kendall Mashburn.

### **6.2.1. Extracción de hormonas esteroides**

La extracción de hormonas esteroides se realizó a partir de heces en base seca siguiendo el protocolo descrito por Monfort *et al.*, 1998. Los extractos hormonales se obtuvieron diluyendo aproximadamente 0.125 g de heces en 4 ml de etanol al 100% utilizando tubos de vidrio (16x125), se mezclaron en un agitador de vórtice y se hirvieron en baño maría durante 20 minutos. Posteriormente se añadió de nuevo etanol a todas las muestras que mostraron evaporación, reconstituyéndolas al mismo nivel y se mezclaron nuevamente y centrifugaron a 7500 rpm durante 10 minutos. Se obtuvo el sobrenadante por decantación y se vertió a tubos de vidrio nuevos para ser secados totalmente, debajo de un soporte especial montado con una corriente de aire comprimido. Se reconstituyeron nuevamente en 4 ml de etanol y se volvieron a secar, se repitió este último proceso a 2 ml de etanol para asegurar que la muestra fuera removida de las paredes del tubo. Después de secarlas por tercera ocasión, se añadió 1 ml de metanol (MeOH) y de estas se pasaron 800 µl a viales de plástico (12x75) para ser secados y conservados en congelación (-20°C) hasta su análisis. Para evaluar la eficiencia de la extracción de las hormonas esteroides, previamente se añadieron 10 µl de <sup>3</sup>H-corticosterona (isotopo radioactivo) a cada muestra. Este trazador se usó para monitorear el porcentaje de hormonas contenido en la muestra fecal.

## **6.2.2. Pruebas de validación de la técnica**

Un ensayo que se desarrolla por primera vez para una especie nueva debe ser validado, para asegurarse que la prueba está evaluando la sustancia de interés.

### **6.2.2.1 Técnica de paralelismo (*Parallelism*)**

En ésta validación se realiza una mezcla de los extractos (*pool*), vertiendo la misma cantidad de varias muestras al azar en un mismo vial, y se hace una dilución acorde a los estándares del ensayo. La prueba consiste en verificar el paralelismo entre la dilución de los extractos contra la curva estándar, lo que indica si un anticuerpo receptor se está uniendo adecuadamente a los metabolitos fecales a través de un rango de concentración (Chard, 1995).

### **6.2.2.2 Técnica de recuperación (*Recovery*)**

Este método es una evaluación cuantitativa del ensayo, donde se mide si lo que se está añadiendo, en este caso la hormona esteroide, se recupera después del ensayo. Esto tiene la función de corroborar si existe algún otro agente en la muestra que pueda interferir en la lectura de la hormona. Mediante una regresión lineal se determina la pendiente de la curva, la cual según el resultado (mayor o menor a 1) sugiere una sobre o subestimación de la masa de la hormona respectivamente (Chan & Perlstein, 1987).

### **6.2.2.3 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por las siglas en inglés de *High-Performance Liquid Chromatography*)**

Es una herramienta analítica útil para la separación y cuantificación de un analito o componente de una sustancia de interés (Chan & Perlstein, 1987; Bidlingmeyer, 1992). Esta técnica determina el número y concentración de componentes incluidos en una muestra, así como el grado de pureza de cada uno

(Bidlingmeyer, 1992). El proceso consiste en que la muestra es disuelta en un solvente que es inyectado en un extremo de la columna y llevado a través de ésta mediante un flujo continuo del solvente, a esta etapa se le llama "fase móvil". La separación de los componentes de la muestra tiene lugar en esta columna la cual tiene partículas absorbentes de gran área de superficie, estas partículas se refieren como la "fase estacionaria". El dispositivo para aplicar el volumen preciso de la muestra sobre la columna es el inyector. Los componentes de la muestra que son inyectados inversamente, interactúan con la fase estacionaria de forma continua. La fase móvil también llamada "eluyente", consiste en bombear a través del piso de la columna las partículas cromatográficas las cuales se encuentran estrechamente compactas, esto utilizando un sistema de suministro de solvente (bombeado). Con la elección de la fase móvil apropiada y la columna del material compactado, algunos componentes de la muestra serán desplazados más lentamente que otros a través de la columna. Los componentes de la muestra emergen de la columna y un detector es utilizado como monitor y transmite una señal al dispositivo de grabación. El cromatograma es el registro de la respuesta del detector en función del tiempo, e indica la presencia de los componentes como picos (Bindlingmeyer, 1992).

Para la técnica **HPLC** (Microsorb RP C-18, Waters, Milford, MA 01757, EUA) se utilizó el protocolo descrito por Monfort *et al.*, 1998. Mediante esta prueba se determinaron los componentes de corticosteroides inmunoreactivos de metabolitos fecales en ballena azul. A partir de los extractos, se eligieron las muestras más representativas por estado reproductivo, de las cuales se hizo un pool de 3 ml, secándolo por completo mediante aire comprimido, para posteriormente reconstituirlo a 400 µl. Previo al análisis HPLC los extractos fecales fueron inyectados mediante fase inversa en la columna C-18 (Spice™, Analtech, Newark, Delaware 19720, EUA). Se mezclaron 55 µl del extracto con el isotopo <sup>3</sup>H-corticosterona (2,500 d.p.m. NEN, Boston MA 02118, EUA) y fueron separados con un gradiente lineal de 20-100% de metanol (1 ml·min<sup>-1</sup> de velocidad de flujo). Se obtuvieron los perfiles de los eluyentes, identificando la inmunoreaccion y radioactividad de los metabolitos corticosteroides y fueron expresados a 1 ml por fracción colectada.

### **6.2.3. Radioinmunoensayo (RIA, por las siglas en inglés de *Radioimmunoassay*)**

Este método se basa en la medición de la concentración de un metabolito en particular o proteínas como lo son las hormonas esteroides provenientes de diversas muestras, en este caso de heces fecales. El método utiliza la especificidad de un anticuerpo para unirse con ciertas estructuras llamadas antígenos. Los antígenos de interés son las hormonas esteroides. El RIA tiene 4 elementos: a) La hormona esteroide de la muestra (llamada “hormona fría” en cantidad desconocida); b) hormona esteroide radioactiva (“hormona caliente” idéntica a la hormona no radioactiva y añadida en cantidad conocida) marcada con isotopos como el tritio  $^3\text{H}$ , carbono 14  $^{14}\text{C}$  o el yodo 125  $^{125}\text{I}$ ; c) anticuerpo y d) el mecanismo para separar las fracciones de esteroides unidas de las no unidas (Chard, 1995).

Añadiendo cantidades conocidas de hormona caliente (muestra radioactiva) y anticuerpo a la hormona fría (muestra fecal), se crea una competencia entre la hormona caliente y la hormona fría por los sitios de unión con el anticuerpo (Chan & Perlstein, 1987; Tizard & Shubot, 2002). Como consecuencia parte del antígeno caliente o marcado radioactivamente no se unirá a los anticuerpos y la cantidad de radioactividad en el sobrenadante aumentará. Posteriormente se miden las cantidades de hormona caliente unida al anticuerpo lo que permite calcular la concentración de la hormona fría mediante la curva estándar utilizando cantidades conocidas de antígeno no marcado como referencia (Tizard & Shubot, 2002).

Se utilizaron kits específicos para la determinación de cada una de las tres hormonas siguiendo las instrucciones del fabricante, a excepción de que todos los volúmenes fueron divididos a la mitad y se añadió un estándar adicional a la curva estándar (el estándar más bajo fue dividido a la mitad para incrementar la sensibilidad):

**Kit-progesterona  $^{125}\text{I}$  RIA** de doble anticuerpo (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, California 92626, EUA). La reactividad cruzada (porcentaje de interferencia con otros analitos) que presenta el kit con otros esteroides es:  $20\alpha$ -dihydroprogesterona (5.41%), desoxycorticosterona (3.80%), corticosterona (0.70%),  $17\alpha$ -hydroxyprogesterona (0.67%), pregnenolona (0.41%), androstenediona (0.23%), testosterona (0.16%) y menos de 0.01% para el resto de los esteroides probados.

**Kit-cortisol  $^{125}\text{I}$  RIA fase solida** (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Los Angeles California 90045, EUA). La reactividad cruzada (porcentaje de interferencia con otros analitos) que presenta el kit con otros esteroides es: prednisolona (76.0%), 11-deoxycortisol (11.4%), cortisona (0.98%), corticosterona (0.94%), tetrahydrocortisol (0.34%), 11-deoxycorticosterona (0.26%), aldosterona (0.03%), progesterona y pregnenolona (0.02%), flumethasona (0.017%) y menos de 0.01% para el resto de los esteroides probados.

**Kit-corticosterona  $^{125}\text{I}$  RIA** de doble anticuerpo (MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY 10962, EUA). La reactividad cruzada (porcentaje de interferencia con otros analitos) que presenta el kit con otros esteroides es: desoxycorticosterona (0.34%), testosterona (0.10%), cortisol (0.05%), aldosterona (0.03%), progesterona (0.02%) y menos de 0.01% para el resto de los esteroides probados.

La lectura de los 3 ensayos se realizó mediante un contador gama (C12 Diagnostic products, Los Angeles, CA). Los valores de los ensayos RIA fueron corregidos por la dilución empleada, el porcentaje de eficiencia de extracción, el peso específico de la muestra y por ultimo fueron expresados a unidades  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco.

Las muestras fueron siempre procesadas por duplicado para todos los ensayos. Y las que llegaron a presentar un coeficiente de variación  $>10\%$  entre los duplicados fueron procesadas nuevamente.

### 6.3. Análisis estadísticos

De los datos analizados se consideró la información disponible de los individuos conocidos, tomando en cuenta sus historias de vida, como el sexo, estado reproductivo (hembra en reposo, lactante) y la edad mínima inferida de los individuos. Respecto a la edad mínima, se considera de 1 año a las ballenas fotografiadas por primera vez, y de 5 años si la hembra fotografiada fue avistada acompañada de una cría. El estado reproductivo fue catalogado como en reposo para aquellas hembras con una edad mínima de 5 años o más que no eran acompañadas por una cría. Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Se analizaron los datos por estado reproductivo para probar si existían diferencias significativas entre éstos. Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff, dado que los datos resultaron ser no paramétricos se aplicó el test de Kruskal-Wallis y posteriormente la prueba pos hoc Wilcoxon-Mann-Whitney para comparaciones entre dos grupos. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de  $p < 0.05$ . Los valores de las concentraciones hormonales de individuos de ballena azul que fueron muestreados varias veces en el mismo día fueron promediados previo a los análisis estadísticos. Los individuos que fueron muestreados en diferentes días o meses se consideraron como muestras independientes. Todos los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa R (R Core Team, 2013).

## **7. RESULTADOS**

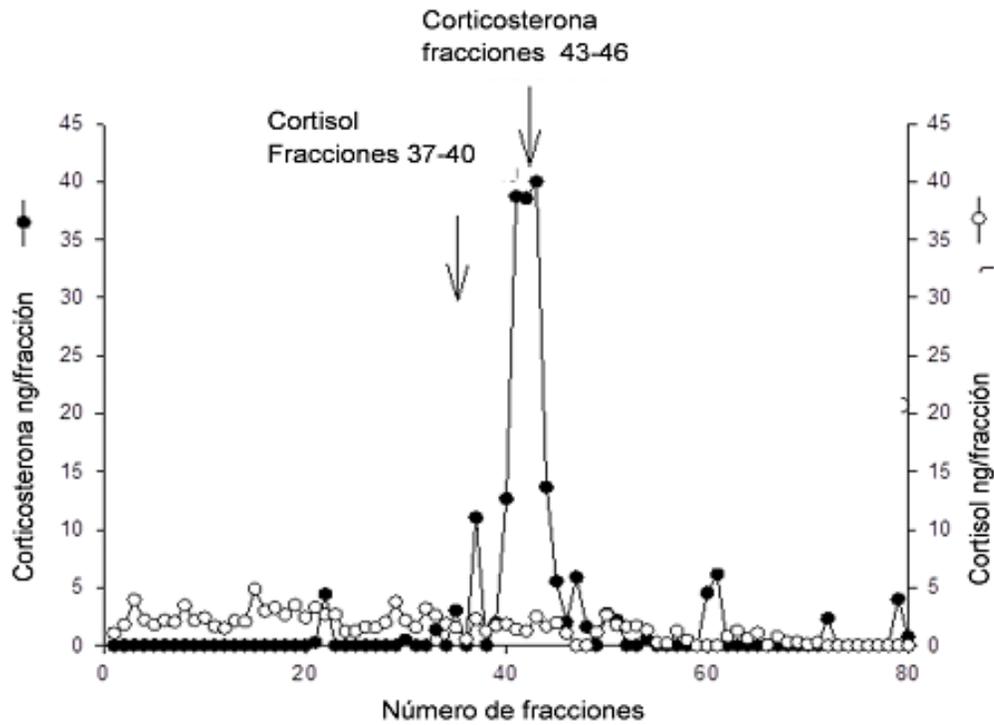
### **7.1. Validaciones de la técnica de RIA**

Las técnicas de paralelismo y de recuperación demostraron que el RIA midió de forma confiable a las hormonas esteroides: progesterona, cortisol y corticosterona en heces de ballena azul. Los ensayos de paralelismo, mostraron un buen desplazamiento paralelo de las pendientes, respecto a la curva estándar de cada hormona. De igual manera en la prueba de recuperación las 3 hormonas mostraron una buena recuperación de la hormona (Tabla I).

**Tabla I.** Validación de la técnica de análisis de hormonas esteroides mediante la técnica de recuperación en heces de ballena azul. (CV: coeficiente de variación).

Validaciones	Hormonas		
	Progesterona	Cortisol	Corticosterona
<b>Recuperación</b> (% $\pm$ ng·g <sup>-1</sup> )	107.1 $\pm$ 20.3	103.97 $\pm$ 4.3	102.6 $\pm$ 10.5
<b>CV (%)</b>	19.01	4.12	10.22
	(y=0.029+1.02X, r <sup>2</sup> =0.99)	(y=0.22+1.03X, r <sup>2</sup> =0.99)	(y=-10.5+1.10X, r <sup>2</sup> =0.96)
<b>CV inter-ensayo (%)</b> Controles internos (bajo y alto)	25.96 y 17.34  (n=3 para todas las muestras analizadas)	15.55 y 99.62  (n=2 para todas las muestras analizadas )	6.68 y 5.52  (n=4 para todas las muestras analizadas )
<b>CV Intra-ensayo (%)</b>	<5	<5	<5
<b>Sensibilidad</b>	0.06 ngml <sup>-1</sup>	0.84 $\mu$ gdl <sup>-1</sup>	14.12 ngml <sup>-1</sup>
<b>Dilución</b>	1:4	1:2	1:2

Los resultados de la HPLC (Fig. 3) de muestras fecales de ballena azul, muestran que 67.6% de inmunoreactividad se asocia con un pico que exhibe polaridad intermedia entre los trazadores de referencia para corticosterona, y solo una mínima porción de inmunoreactividad (4.8%) co-eluye con el cortisol radio-marcado.



**Figura 3.** Perfiles inmunoreactivos de glucocorticoides a partir de un *pool* de muestras de heces de hembras de ballena azul del Golfo de California.

## 7.2. Recolección de muestras e historial de avistamientos de ballena azul

Un total de 31 muestras de heces de ballena azul se recolectaron entre Loreto y la Bahía de La Paz, durante el periodo del 2009 al 2012. De éstas muestras, 25 (81%) correspondieron a ballenas con un historial de avistamientos conforme a la base de datos de individuos foto-identificados del CICIMAR-IPN, las demás muestras fueron de individuos no conocidos.

De éstas 25 muestras 2 individuos ID# 124 y ID# 334 (Tabla III), tuvieron duplicado de muestras a lo largo del mismo día por lo que se utilizó la media para el resto de los análisis estadísticos. Por lo tanto el número de muestras totales de individuos foto-identificados fue de 23 en distintos años de avistamiento: de los cuales 3 individuos (ID# 124, 41 y 65) contaron con segunda recaptura de muestras en distintas fechas de muestreo y fueron consideradas como muestras independientes. Las muestras correspondieron a 20 individuos conocidos con una edad inferida entre 5-21 años y con un promedio de 13 años de registro de avistamientos, por lo que todos los individuos de ballena azul muestreados fueron adultos sexualmente maduros (Tabla II).

Estos individuos incluyeron: 1 macho, 15 hembras y 7 hembras lactantes. Mediante la evaluación de la hormona progesterona se clasificó un estado reproductivo adicional (gestación, ver sección 8.4), resultando 3 estados reproductivos para hembras adultas: 7 hembras lactantes, 10 hembras en reposo y 5 hembras gestantes.

**Tabla II.** Historial de avistamiento de ballenas azules muestreadas durante el periodo 2009-2012, con información sobre individuo (ID) y edad mínima inferida, basada en el año de primer avistamiento. Una ballena azul se considera adulta a partir de los 5 años de edad, así se infiere que una hembra acompañada de una cría avistada por primera vez, tendría al menos la edad mínima adulta (5 años).

ID	AÑOS DE AVISTAMIENTOS												Edad mínima inferida												
	85	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	00		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
116																						R			20
41																						R	R		18
761																								R	5
667																							R		6
75																							R		22
483																						R			9
253																						R			12
49																								R	19
160																						R			14
395																						R			8
59																						R			21
124																						R*	R		21
134																						R			16
334																						R			9
266																						R*			14
106																							R*		18
65																						R*			18
12																						R			21
825																								R	1
836																								R	1

Hembras adultas	
Machos adultos	
Hembras con cría	
No conocidos	
Año de recolecta de muestra	R
Hembras gestantes	*

**Tabla III.** Concentración de hormonas esteroides (PROG= progesterona, CNA= corticosterona, COR= cortisol) para cada individuo (ID). Información sobre sexo y estado reproductivo (EDO. REPRO). Los individuos marcados con \*corresponden al promedio de 2 muestras duplicadas a lo largo del mismo día.

ID	DÍA	MES	AÑO	EDO.REPRO	PROG	CNA	COR
ND	ND	ND	ND	Lactante	8.1	14.18	52.59
483	21	3	2009	Lactante	40.2	30.66	181.65
41	5	3	2010	Lactante	10.19	14.9	202.06
116	25	3	2010	Lactante	8.04	8.17	49.84
667	14	2	2011	Lactante	31.98	11.72	176.37
75	30	3	2011	Lactante	37.86	22.8	0.02
761	6	3	2012	Lactante	24.5	15.5	138.51
160	16	3	2009	Reposo	24.08	18.24	151.87
334*	20	3	2009	Reposo	7.29	14.58	153.55
59	27	2	2009	Reposo	9.5	8.63	116.49
395	30	3	2009	Reposo	9.16	14.86	319.84
253	31	3	2009	Reposo	7.85	18.21	253.67
65	2	4	2009	Reposo	324.13	28.26	221.91
124	26	3	2010	Reposo	9.74	27.69	360.6
41	19	2	2011	Reposo	367.91	17.16	146.33
134	28	3	2011	Reposo	35.92	21.41	427.43
49	23	3	2012	Reposo	8.46	15.58	160.05
124*	29	3	2009	Gestante	1037.18	79.11	151.83
124	30	3	2009	Gestante	3387.96	56.62	160.56
65	30	3	2009	Gestante	1276.38	41.93	N/A
266	23	3	2010	Gestante	2654.32	44.64	188.73
106	31	1	2011	Gestante	819.49	18.9	229.78
12	19	3	2010	Macho Maduro	20.65	14.51	167.44

### 7.3. Hormonas esteroideas

#### 7.3.1. Progesterona

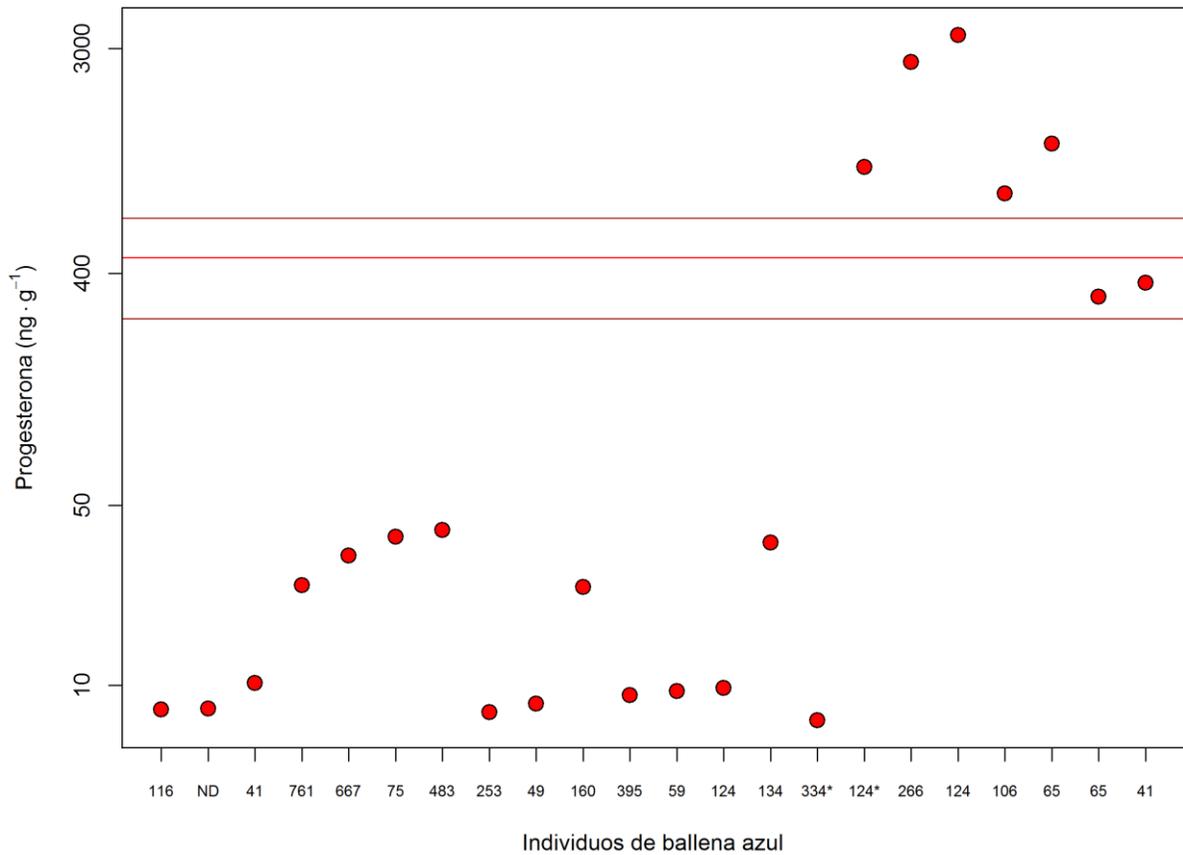
Las hembras gestantes fueron categorizadas utilizando como parámetros la Media ( $\bar{x}$ ) y error estándar (EE) de las concentraciones de progesterona ( $\bar{x} \pm EE$  460.92  $\pm$  94.48 ng·g<sup>-1</sup>). Los individuos que presentaron concentraciones superiores al margen, fueron considerados dentro de ésta categoría (Fig. 4). Siendo distintivos los valores altos de progesterona ( $\bar{x} \pm EE$  1835.07  $\pm$  503.13 ng·g<sup>-1</sup>), los cuales fueron al menos 35.5 veces más altos respecto a los demás estados reproductivos: hembras en reposo (W=50, p < 0.001;  $\bar{x} \pm EE$ : 80.4  $\pm$  44.48 ng·g<sup>-1</sup>) y hembras lactantes (W=35, p= 0.002;  $\bar{x} \pm EE$ : 22.98  $\pm$  5.37 ng·g<sup>-1</sup>) (Fig. 5).

#### 7.3.2. Cortisol

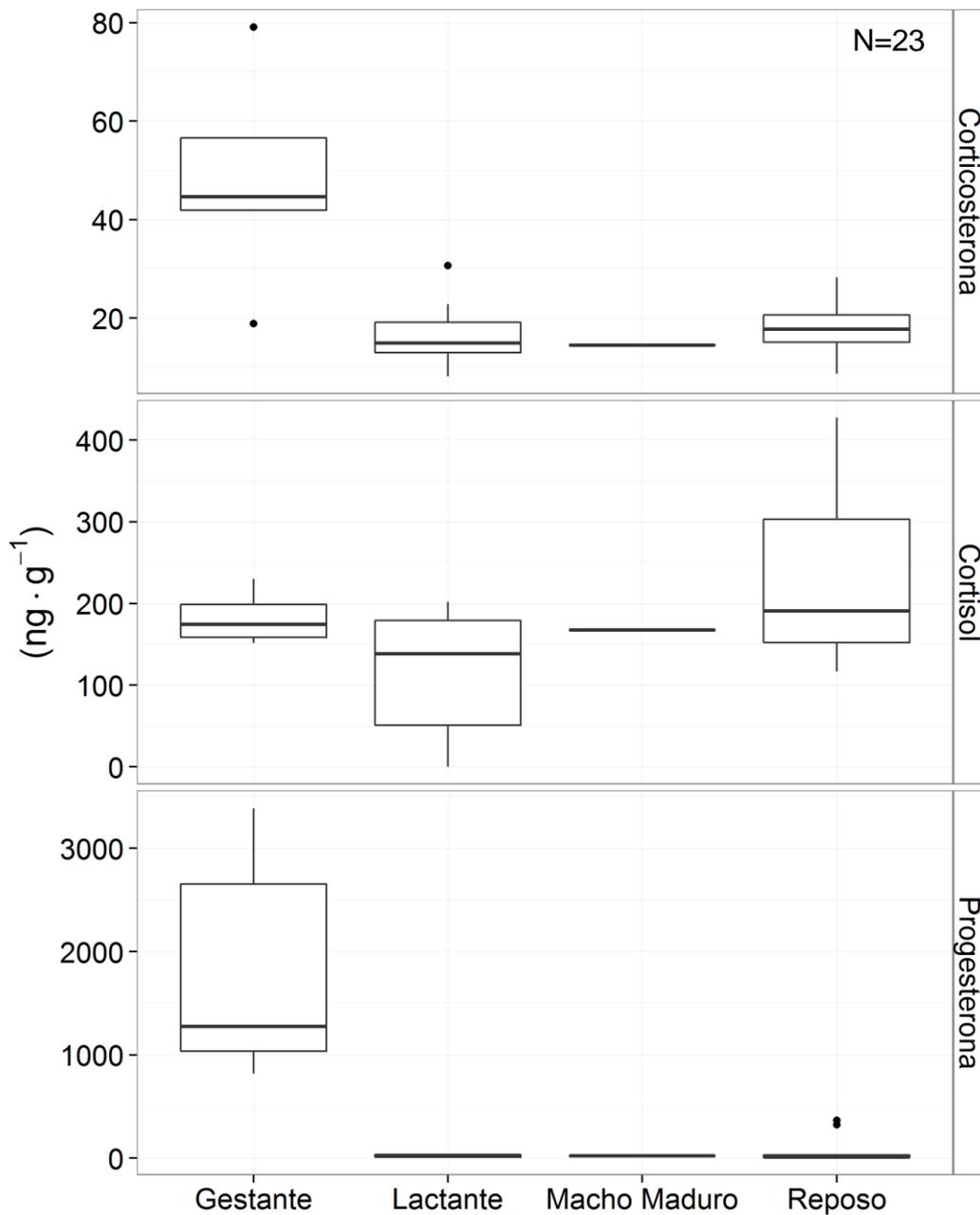
En contraste el cortisol mostró una alta variabilidad en los datos, y no se encontraron diferencias significativas ( $X^2= 3.58$ , gdl = 3, p= 0.310) entre ninguno de los 3 estados reproductivos: hembras gestantes ( $\bar{x} \pm EE$ : 182.73  $\pm$  17.55 ng·g<sup>-1</sup>), hembras en reposo ( $\bar{x} \pm EE$ : 231.17  $\pm$  33.57 ng·g<sup>-1</sup>), hembras lactantes  $\bar{x} \pm EE$ : 114.43  $\pm$  29.96 ng·g<sup>-1</sup>) (Fig. 5).

#### 7.3.3. Corticosterona

Los valores de corticosterona en hembras gestantes mostraron una tendencia similar a la de la progesterona ( $\bar{x} \pm EE$ : 48.24  $\pm$  9.84 ng·g<sup>-1</sup>), siendo éstos valores 2.7 veces más altos, respecto a los demás estados reproductivos: hembras en reposo (W=47, p= 0.004;  $\bar{x} \pm EE$ : 18.46  $\pm$  1.90 ng·g<sup>-1</sup>) y hembras lactantes (W=33, p=0.010;  $\bar{x} \pm EE$ : 16.85  $\pm$  2.85 ng·g<sup>-1</sup>) (Fig. 5).



**Figura 4.** Concentración de progesterona fecal en individuos de ballena azul (Escala logarítmica). Las líneas horizontales representan la media (línea central) y el error estándar (línea superior e inferior a la media) ( $\bar{x} \pm EE$   $460.92 \pm 94.48$   $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Los valores que se ubicaron en la parte externa de los parámetros de la media y error estándar, es decir  $>555$   $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  fueron categorizados como hembras gestantes.



**Figura 5.** Concentración de 3 hormonas esteroides: corticosterona, cortisol y progesterona a partir de heces en hembras adultas de ballena azul. La línea en el medio de la caja representa la mediana, y la caja comprende del 25-75% de los datos, los bigotes fuera de la caja comprenden del 5-95% de los datos. Se cuenta con un solo dato para macho maduro. (Gestantes: n=5; Hembra en reposo: n=10; Lactantes: n=7 y Macho Maduro: n=1).

A nivel individual se observó un incremento de 3 veces más la concentración de progesterona entre replicas tomadas en dos días consecutivos del ID# 124 (Tabla IV). Por otro lado, en las concentraciones de corticosterona no se observó variación en las réplicas recolectadas en el mismo día (79.7-78.51 ng·g<sup>-1</sup>). Sin embargo, se observó un decremento de 1.4 veces en la muestra del día siguiente respecto a los promedios del día anterior.

A su vez, al comparar entre años consecutivos de muestreo al mismo individuo (ID# 124), éste presentó niveles de progesterona muy elevados en el primer año (2009), lo que sugiere gestación. Sin embargo, en el siguiente año de muestreo (2010) no se observó con cría y presentó niveles bajos de progesterona y de corticosterona a comparación del 2009.

**Tabla IV.** Comparación de concentraciones promedio de progesterona y corticosterona (ng·g<sup>-1</sup>heces en base seca) con referencia al estado reproductivo del individuo ID# 124 en distintas fechas de muestreo en el Golfo de California.

ID	Día	Mes	Año	Sexo	Edo.repro	Progesterona	Corticosterona
124	29	3	2009	H	Gestante	785.47	79.7
124	29	3	2009	H	Gestante	1288.88	78.51
124	30	3	2009	H	Gestante	3387.96	56.62
124	26	3	2010	H	Reposo	9.74	27.69

El individuo ID# 65 mostró un decremento en las concentraciones de progesterona en sus replicas de hasta un 25% en un lapso de 3 días (Tabla V).

El ID# 41 fue muestreado en el año 2010 como hembra lactante y en el año consecutivo 2011 como hembra en reposo (Tabla V).

**Tabla V.** Comparación de concentraciones promedio de progesterona ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  heces en base seca) con referencia al estado reproductivo del individuo ID# 65 y el ID# 41 en dos fechas distintas de muestreo en el Golfo de California.

<b>ID</b>	<b>Día</b>	<b>Mes</b>	<b>Año</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edo.repro</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Corticosterona</b>
<b>65</b>	30	3	2009	H	Gestante	1276.38	41.93
<b>65</b>	2	4	2009	H	Reposo	324.13	28.26
<b>41</b>	5	3	2010	H	Lactante	10.19	14.9
<b>41</b>	19	2	2011	H	Reposo	367.91	17.16

## 8. DISCUSIÓN

En este estudio se llevo a cabo la evaluación de 3 hormonas esteroides (progesterona, corticosterona y cortisol) con el objetivo de determinar un parámetro de referencia de concentraciones hormonales, que pueda ser útil en un futuro como indicador de estrés fisiológico, dicho parámetro se evaluó en base al estado reproductivo en el cual se encontraban las hembras (lactante, gestante y en reposo). Los valores fueron obtenidos a partir de muestras de heces de ballena azul durante el periodo enero-abril 2009 a 2012 en el Golfo de California, siendo correspondientes a niveles hormonales en las condiciones actuales en las que se encuentra la especie (Tabla VI). La evaluación de las hormonas esteroides representa una nueva herramienta en el diagnóstico integral del estado de la población, que permitirá monitorear cambios en las concentraciones de glucocorticoides a través del tiempo.

Si bien previamente se habían extraído y cuantificado glucocorticoides y progesterona a partir de biopsias de grasa (Martínez-López, 2009) y progesterona en heces de ballena azul (Gendron, 2010) mediante la técnica de ELISA (prueba inmunoabsorbente de unión enzimática), el presente trabajo es el primero en analizar glucocorticoides y progesterona en un mismo estudio mediante una metodología no invasiva como lo es la recolecta de muestras fecales, utilizando la técnica de radioinmunoensayo que al igual que la técnica de ELISA es común su empleo ya que este tipo de ensayos tienen la capacidad de cuantificar mínimas concentraciones hormonales. Los resultados de progesterona de este trabajo coinciden con lo reportado previamente por Gendron (2010), donde se menciona que es posible determinar la gestación en ballenas azules a partir de muestras de heces. En la evaluación de hormonas de estrés la corticosterona resulto ser el glucocorticoide más abundante en heces de ballena azul, siendo de interés por su variación entre los estados reproductivos de las hembras.

**Tabla VI.** Concentración de hormonas esteroides ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  heces base seca) por estado reproductivo en hembras adultas de ballena azul del Golfo de California. Los valores de las medias están presentados con el error estándar ( $\bar{x} \pm \text{EE}$ )

<b>Estado reproductivo</b>	<b>Progesterona</b>	<b>Corticosterona</b>	<b>Cortisol</b>
<b>Gestantes</b>			
Media	1835.07 $\pm$ 503.13	48.24 $\pm$ 9.84	182.73 $\pm$ 17.55
Mínimo	819.49	18.9	151.83
Máximo	3387.97	79.11	229.78
n=5			
<b>Hembras en reposo</b>			
Media	80.4 $\pm$ 44.48	18.46 $\pm$ 1.90	231.17 $\pm$ 33.57
Mínimo	7.29	8.63	116.49
Máximo	367.91	28.26	427.43
n=10			
<b>Lactantes</b>			
Media	22.98 $\pm$ 5.37	16.85 $\pm$ 2.85	114.43 $\pm$ 29.96
Mínimo	8.04	8.17	0.02
Máximo	40.2	30.66	202.06
n=7			

## **8.1. Validación de la técnica**

Se validó satisfactoriamente la extracción y cuantificación de hormonas esteroides mediante las técnicas de paralelismo y recuperación, demostrando que el método de radioinmunoensayo mide de forma confiable a las hormonas esteroides. Estos resultados demuestran que los metabolitos fecales de las hormonas corticosterona, cortisol y progesterona en ballena azul, pueden ser medidos de forma precisa en heces conservadas en seco y analizadas mediante kits comerciales de radioinmunoensayo de fase sólida para cortisol y de doble anticuerpo para progesterona y corticosterona.

La aplicación de técnicas de inmunoensayo en una especie en particular, a partir de metabolitos fecales debe incluir una validación previa a la medición de hormonas esteroides, ya que los anticuerpos diseñados para hormonas en plasma no siempre se unen a metabolitos fecales en todas las especies y existen diferencias entre anticuerpos y técnicas de inmunoensayo (Goymann *et al.*, 1999). Es fundamental estandarizar la prueba para cada caso en particular y asegurar que se esté evaluando la sustancia de interés.

Asimismo, la ruta de excreción y el tipo de metabolitos presentes en heces, pueden variar entre especies incluso entre subespecies, como en el caso del rinoceronte negro donde otros factores como variación a nivel individual, genotipos y diferencias en la composición de la dieta pueden afectar los resultados (Berkeley *et al.*, 1997).

## **8.2. Hormonas esteroides**

### **8.2.1. Progesterona**

La identificación de las hembras gestantes por sus altos niveles de progesterona coincide con lo reportado por Gendron (2010), quien incluso pudo

corroborar el estado gestante de una hembra, al ser observada con su cría al año siguiente de su muestreo. Coincide de igual forma, con el estudio en ballenas francas (*Eubalaena glacialis*), donde también se analizaron niveles altos de progesterona en hembras que fueron avistadas con sus crías varios meses después en las áreas de crianza (Rolland *et al.*, 2005).

De manera general los resultados obtenidos concuerdan con las tendencias de otros estudios en mamíferos marinos, en donde la progesterona se ha empleado como un buen indicador de gestación, ya que altos valores en muestras de grasa, se han asociado con la presencia de embriones en el rorcual minke (*Balaenoptera acutorostrata*; Mansour *et al.*, 2002), y en tres especies de delfínidos (familia: Delphinidae; Kellar *et al.*, 2006), utilizando los métodos de radioinmunoensayo y análisis inmunoenzimático, respectivamente. También se han reportado análisis de progesterona, a partir de suero en muestras de sangre *post mortem*, en el rorcual común (*Balaenoptera physalus*) de captura comercial, empleando el método de radioinmunoensayo y complementando con parámetros anatómicos e histológicos (Kjeld *et al.*, 2006). En cautiverio se ha determinado gestación en orcas (*Orcinus orca*) mediante muestras de orina y sangre (Walker *et al.*, 1988) y en tursiones (*Tursiops truncatus*) en muestras de leche (West *et al.*, 2000). También en pinnípedos como el lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*), a partir de suero y plasma usando radioinmunoensayo (Villegas-Amtmann *et al.*, 2009).

La hormona esteroide progesterona es una herramienta diagnóstica de gestación, asociada a concentraciones mayores a aquellas observadas en animales no gestantes. Siendo corroborado ampliamente en especies domésticas y silvestres en cautiverio principalmente, mediante pruebas de sangre (Yimer *et al.*, 2012), ultrasonido (West *et al.*, 2000; Berkeley *et al.*, 1997), la presencia de embriones (Kellar *et al.*, 2006) y la presencia de crías al término de la gestación (Foley *et al.*, 2000; West *et al.*, 2000). Por otro lado en especies en estado silvestre es posible obtener muestras no invasivas con valores notoriamente altos de progesterona, por lo tanto se infiere que se encuentra gestante y se confirma al observar crías en

fechas posteriores según el periodo de gestación (Rolland *et al.*, 2005), sin embargo estas inferencias en ocasiones no es posible corroborarlas debido a diversos factores como abortos, reabsorción fetal y pseudogestación (West *et al.*, 2000), así como muerte del neonato por diferentes causas naturales patológicas o por depredación.

Los valores de progesterona encontrados en ballenas azules gestantes, fueron notoriamente mayores que los de hembras lactantes y hembras en reposo (ver Tabla VI, página 35). Estos valores fueron mucho menores a los encontrados en ballena franca (Rolland *et al.*, 2005) pero mostraron las mismas tendencias por estado reproductivo. Fisiológicamente la progesterona se encarga de mantener la gestación, variando significativamente según la etapa en la que se encuentre y variando característicamente entre especies (Senger, 1999). Por lo tanto solo es posible comparar las tendencias y no las concentraciones entre especies, además de influir el tipo de muestras y técnicas empleadas en dicha comparación (Tabla VII).

**Tabla VII.** Comparación de concentraciones promedio de progesterona en 4 especies de misticetos por estado reproductivo.<sup>1</sup>Valenzuela-Molina, (2012); <sup>2</sup>Martínez-López (2009); <sup>3</sup>Rolland *et al.* (2005); <sup>4</sup>Kjeld *et al.* (2006); <sup>5</sup>Mansour *et al.* (2002). RIA= Radioinmunoensayo. EIA= Análisis inmunoenzimático.

Concentración promedio de progesterona en 4 especies de misticetos					
Estado reproductivo	Ballena azul <sup>1</sup> (heces) ng g <sup>-1</sup>	Ballena azul <sup>2</sup> (grasa) ng g <sup>-1</sup>	Ballena franca <sup>3</sup> (heces) ng g <sup>-1</sup>	Ballena de aleta <sup>4</sup> (suero) nmol l <sup>-1</sup>	Ballena minke <sup>5</sup> (grasa) ng·g <sup>-1</sup>
Gestantes	1835.07 ± 503.13	-	201,240 ± 27,025	37.4	132.96 ± 22.4
No gestantes	80.4 ± 44.48	235.81 ± 73.05	295 ± 144.7	1.06	1.95 ± 0.32
Lactantes	22.98 ± 5.37	168.48 ± 38.30	273 ± 45.7	0.8	-
Técnica de inmunoensayo	RIA	EIA	RIA	RIA	RIA

En este trabajo los niveles de metabolitos fecales de progesterona no mostraron diferencias significativas entre las hembras lactantes y las hembras en reposo ( $W = 30$ ,  $p = 0.669$ ). Esto coincide con lo reportado en el estudio de ballena franca (Rolland *et al.*, 2005), donde tampoco encontraron diferencias entre ambos estados reproductivos. En otros mamíferos es necesario medir estrógenos y andrógenos para poder diferenciar a nivel endócrino a los animales lactantes de aquellos que se encuentran en reposo reproductivo (Tuker, 1998).

Las diferencias sustantivas en la concentración de progesterona encontradas entre réplicas de muestras del ID# 124 colectadas en 2 días consecutivos (Tabla IV, página 32) pueden deberse a causas fisiológicas, como el tiempo de tránsito intestinal. El lapso de tiempo de la excreción en heces puede corresponder con el tiempo de tránsito de alimentos (Goymann, *et al.*, 1999).

En cuanto a causas logísticas existe la posibilidad que en el caso de las réplicas provenientes del mismo día, la recolecta de la muestra se haya llevado a cabo en una porción de la excreta con más concentración hormonal que otra. Existen ciertas restricciones en base a los protocolos de recolecta de heces para disminuir la variabilidad en las mediciones, Millspaugh & Washburn (2004) señalan importantes recomendaciones basadas en estudios previos, las cuales fueron tomadas en cuenta para el presente estudio como son la recolecta de muestras frescas para evitar degradación (< 2 hrs) y provenientes de individuos de edad, sexo y estado reproductivo conocidos ya que estos factores pueden influir en la actividad hormonal ocasionando efectos en la evaluación de metabolitos fecales.

Asimismo es importante realizar un mezclado homogéneo de las excretas para obtener una concentración más representativa, debido a que se ha observado que los metabolitos hormonales pueden estar distribuidos de forma irregular y encontrarse en distinta proporción si la muestra es tomada en el interior o en la parte externa de la excreta (Wasser *et al.*, 1996) y por último la conservación de las

muestras como polvo seco para el posterior análisis de laboratorio con la finalidad de disminuir la variabilidad en los datos.

En el caso de la ballena azul tal vez podría influenciar la masa o el tamaño de varios metros de la excreta a viceversa como en pequeñas aves cantoras su excreta es tan diminuta (0.02 g; base seca) que toda la excreta se analiza pudiendo resultar en concentraciones de metabolitos proporcionalmente más elevados y los resultados verse sobrestimados (visto en: Millspaugh & Washburn, 2004), al contrario en ballena azul un minúscula sub muestra se obtiene de una porción de la excreta de metros de longitud. Esto habría que corroborarlo con más estudios ya que se suelen recolectar muestras por duplicados sin encontrarse variación significativa entre ellos.

De las 4 hembras gestantes foto-identificadas, 2 fueron avistadas en la temporada siguiente (ID# 124 y 106; ver Tabla III página 28). Aunque ambas ballenas se avistaron 3 veces durante la temporada de migración: 18, 22 y 26 de marzo 2010 para el ID# 124; 14, 19 y 26 de febrero 2012 para el ID# 106, no se observaron acompañadas por una cría. Esto puede deberse a que las hembras hayan perdido a sus crías por algunos de los factores antes mencionados, o a la posibilidad de que no se haya observado a la cría junto a la madre, aunque esto es poco probable.

Otro caso particular dentro del estado reproductivo gestante, es el del ID# 65 en cuya réplica con un intervalo de solo 3 días después de la primera recolecta, presentó un decremento del 25%, en las concentraciones de progesterona (Tabla V página 33). Existe la posibilidad de que ésta hembra pudiera haber estado gestante y sus valores estuvieran decreciendo porque estaba cercana la fecha de parto. En el aspecto fisiológico se conoce que al llegar al término de la gestación, se inicia un pico de estrógenos y la progesterona empieza a declinar rápidamente justo antes del parto, lo que indica el inicio de un conjunto de cambios fisiológicos en el organismo, implicando distintas hormonas y permitiendo así la expulsión del feto (Senger, 1999;

Snegovskikh *et al.*, 2006). Esto no fue posible corroborarlo, ya que no se observó a esta hembra en fechas posteriores.

De las 6 ballenas foto-identificadas como lactantes 2 fueron avistadas al año siguiente de su muestreo (ID# 41 y 667). El ID# 41 presentó concentraciones por debajo del promedio general de individuos de ballena azul (Fig. 4), siendo categorizada como hembra en reposo ( $367.91 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Sin embargo ésta concentración es 4 veces más elevada, respecto al promedio de la categoría de hembras en reposo. Posiblemente la hembra ID# 41 estaba pasando por la etapa de estro, ya que aparentemente había destetado a la cría con la cual se observó en el año 2010 (Tabla V página 33) (la lactación en ballena azul tiene una duración de 6 meses). Cuando transcurre el estro, el cual se caracteriza porque la hembra se encuentra receptiva a la copulación, los estrógenos se encuentran muy elevados y a medida que declinan la progesterona empieza a elevarse, si se produce una fecundación continuará elevada hasta el término de la gestación, de lo contrario si no se produjo gestación la progesterona volverá a sus niveles basales nuevamente (Senger, 1999; Snegovskikh *et al.*, 2006). Al desconocer los parámetros endocrinos naturales del ciclo estral de la ballena azul, queda un umbral que no permite distinguir los rangos límites de concentración de progesterona entre la ovulación y la fecundación.

En muchas especies silvestres no es posible corroborar estos parámetros endocrinos debido a las limitantes logísticas, por lo que es necesario monitorear al individuo hasta el término de la preñez o hasta la observación de una cría, para distinguir en qué momento las concentraciones de progesterona son indicadoras de un diagnóstico de gestación, lo que implica un seguimiento focal de los individuos de mucho tiempo, incluso años (Foley *et al.*, 2000). En ballenas barbadas estos seguimientos son logísticamente complejos por el hábitat acuático donde se desenvuelven.

### 8.2.2. Glucocorticoides

Para estimar cual metabolito (cortisol o corticosterona) tenía predominancia en las heces de ballena azul, se realizó la prueba de validación de HPLC la cual mostró como los componentes inmunoreactivos de los metabolitos fecales son mucho menores en cortisol que en corticosterona, con el 4.8% y 67.6% respectivamente. No es posible predecir el tipo de metabolito que será predominante en alguna especie, por ejemplo, entre los primates el cortisol está presente en las heces de marmosetas (*Saguinus sp* y *Callithrix sp*), pero no ha sido detectado en papiones (*Papio sp*), macacos (*Macaca sp*) ni chimpancés (*Pan troglodytes*) (Wasser *et al.*, 2000). Para identificar específicamente la ruta de excreción más importante, así como el tipo y proporción de metabolitos presentes en la muestra, es necesario administrar cortisol marcado radiactivamente ( $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ ) y posteriormente realizar técnicas de cromatografía e inmunoanálisis (Wasser *et al.*, 2000; Brousset *et al.*, 2004). En ballena azul no es posible de corroborarlo por las limitaciones logísticas que implica el acceso a la vía endovenosa.

Los valores de cortisol encontrados en heces de hembras de ballenas azules fueron muy variados y no mostraron diferencias significativas entre estados reproductivos, incluso algunas de las concentraciones se encontraron en el límite de detección del ensayo. Es fundamental realizar estos análisis ya que son especie-específico, si bien la mayoría de los animales producen ya sea cortisol o corticosterona, rara vez ambos glucocorticoides se producen en grandes cantidades. Asimismo existen especies que solo producen exclusivamente corticosterona como ratas y ratones o solo cortisol como en el caso de primates y humanos. Existen excepciones como en el hámster Sirio el cual produce casi la misma cantidad de cortisol y corticosterona (Nelson, 2011).

Las técnicas de radioinmunoensayo y HPLC indicaron que la hormona corticosterona es el glucocorticoide que más predomina en heces de ballena azul útil para interpretación. Sin embargo para confirmar que la hormona corticosterona sea

el principal glucocorticoide de actividad adrenal en la circulación de esta especie, habría que hacer una validación adicional con una prueba de infusión de cortisol radiomarcado, la cual se emplea para observar cual es la proporción de metabolitos que es excretada, debido a que la eliminación de metabolitos de hormonas esteroides a partir de la circulación ocurre por el tracto urinario, tracto gastrointestinal o ambos. Por ejemplo, se ha reportado que en marmosetas, macacos y chimpancés 82-91% de metabolitos de cortisol son excretados vía urinaria y solo 9-18% son excretados en heces. De forma similar en liebres europeas se observó que la tasa promedio de excreción de glucocorticoides radiomarcados en orina y heces fue de 91.5 y 8.5% respectivamente (Visto en: Millspaugh & Washburn, 2004). Como consecuencia, un ensayo particular solo mide una proporción del total de metabolitos producidos por el animal.

Los valores de metabolitos fecales de corticosterona mostraron una tendencia similar a la de los de progesterona (Fig. 5), mostrando en las hembras gestantes concentraciones 2.7 veces más elevadas, respecto a las hembras lactantes y hembras en reposo. Coincidiendo con lo observado en otros mamíferos, la gestación se considera como un importante estresor fisiológico, presentándose concentraciones elevadas de glucocorticoides para llenar las demandas metabólicas del feto y para preparar a la hembra para la lactancia (Foley *et al.*, 2000; Kraus & Rolland *et al.*, 2007; Nelson, 2011). Se ha demostrado que la progesterona y los glucocorticoides están correlacionados positivamente uno con otro durante el periodo de gestación (Foley *et al.*, 2000) siendo de importancia también en el desarrollo normal del cerebro y sistema neuroendocrino del feto (Kapoor *et al.*, 2006) e influyendo a su vez en el mecanismo por el cual se desencadena la labor de parto al término de la preñez (Senger, 1999; Snegovskikh *et al.*, 2006).

Por otro lado, en otros estudios se han evidenciado niveles más elevados y homogéneos de glucocorticoides en el estado reproductivo lactante comparado con el estado de hembras en reposo, en heces de ballena franca y en grasa de ballena azul (Rolland *et al.*, 2005; Martínez-López, 2009). En el presente estudio no se logró

hacer esta distinción mediante las concentraciones de corticosterona, lo cual puede deberse al número de muestras.

A nivel individual la hembra ID# 124 mostró poca variabilidad en las réplicas colectadas en un día (79.7-78.51 ng·g<sup>-1</sup>), sin embargo en el muestreo del día siguiente sí se observó un decremento de 1.4 veces respecto a los promedios del día anterior. Esto puede atribuirse a las condiciones fisiológicas de tiempo de tránsito intestinal (Goymann, *et al.*, 1999), así como al ritmo circadiano manifestándose con decrementos al final de la mañana (Nelson, 2011). Sin embargo debe tomarse en cuenta que existen variaciones así como otros factores externos que influyen en los niveles de estas hormonas (Guyton & Hall, 1996).

En estudios de glucocorticoides debe considerarse que existen una variedad de estímulos tanto específicos como no específicos, que pueden influenciar las concentraciones de los glucocorticoides, desde ejercicio o juego hasta miedo o enfermedad, etc. (Guyton & Hall, 1996). Además de estos factores, las elevaciones hormonales también pueden verse mediadas por el ritmo circadiano que ocurre en los glucocorticoides. A diferencia de la progesterona, los glucocorticoides empiezan a incrementarse durante la noche, resultando en un pico diario usualmente exhibido justo antes de despertar, coincidiendo con la actividad del inicio de la mañana (Nelson, 2011). Por otro lado se deben considerar las variaciones a nivel individual de cómo se percibe un estímulo estresante, debido a que un estímulo particular, puede ser estresante para un individuo y ser placentero para otro, de igual forma pueden manifestarse elevaciones de glucocorticoides, causadas tanto por eventos estresantes como placenteros (Nelson, 2011).

### **Estudio de glucocorticoides en el futuro**

La finalidad de llevar a cabo este estudio es poder monitorear cambios a través del tiempo y si es posible realizar comparaciones con las áreas de alimentación, en las costas fuera de California en verano donde existe mayor tráfico

marítimo y disturbios antropogénicos, a comparación con el área invernal en el Golfo de California. No obstante el seguimiento de este estudio debe llevarse con cautela y considerarse los distintos factores que pueden influenciar en los niveles de glucocorticoides, antes de atribuir posibles causas. Uno de ellos son las variaciones estacionales como se ha visto en gorrión corona-blanca (*Zonotrichia leucophrys gambelii*; Romero & Wingfield, 1998), donde se reportó que los niveles de corticosterona eran menores durante el invierno y en periodos de muda y elevados durante periodos de actividad reproductiva.

Uno de los desafíos más grandes es distinguir qué niveles de glucocorticoides indican distrés o una respuesta dañina para las especies (Millspaugh & Washburn, 2004), una de las validaciones que se suele realizar para este fin es la prueba de desafío con la administración de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual consiste en imitar una respuesta natural de estrés adrenal, provocando un incremento en la circulación de glucocorticoides y posteriormente volviendo a los niveles basales unas horas después, según la especie y el tiempo de tránsito intestinal (Norris, 1996). En especies donde no es posible realizar esta validación debe darse un seguimiento muy cercano de los individuos y de las condiciones que los rodean, para tomar en cuenta otras variables que puedan complementar la interpretación.

Se debe considerar ser cuidadoso en la interpretación para evitar confundir elevaciones de glucocorticoides con respuestas dañinas o perjudiciales, si bien niveles elevados de glucocorticoides pueden advertir posibles daños por disturbios antropogénicos (Creel *et al.*, 2002; Martínez-Mota & Valdespino, 2008; Rolland *et al.*, 2012), no en todos los casos se refleja en una disminución en la abundancia de las poblaciones (Creel *et al.*, 2002). Por lo contrario se debe evaluar si los niveles observados resultan en un costo biológico significativo (visto en: Millspaugh & Washburn, 2004) que pudieran afectar posteriormente a la especie de estudio.

Aun considerando las limitaciones del estudio en ballenas barbadas donde no es posible realizar validaciones hormonales directas, este tipo de evaluaciones

pueden tener grandes beneficios si se da un seguimiento continuo a los individuos de interés y sobre todo si se mantienen bases de datos completas. Por ejemplo se ha demostrado que es posible obtener resultados útiles para la conservación de la ballena franca, donde fue posible evaluar mediante estudios acústicos la reducción del ruido asociándolo con un decremento en los niveles basales de estrés medidos en metabolitos fecales de glucocorticoides (Rolland *et al.*, 2012).

La validación de la técnica de radioinmunoensayo en heces de ballena azul además de permitir la determinación confiable de la corticosterona, provee un nuevo parámetro de monitoreo contando con un punto de referencia para comparar cambios en el futuro, contribuyendo en el seguimiento de la salud de la población de ballena azul del Golfo de California.

## 9. CONCLUSIONES

El análisis de hormonas esteroides, a partir de muestras de heces de ballena azul mediante la técnica de radioinmunoensayo, fue satisfactoriamente validado.

Se corroboró que la concentración de la hormona progesterona es una herramienta diagnóstica útil para inferir el estado reproductivo de gestación en la ballena azul.

La hormona corticosterona resultó ser el glucocorticoide predominante y útil para interpretación de estrés fisiológico, en heces en base seca de ballena azul.

Se logró establecer un parámetro de referencia de metabolitos fecales de corticosterona en hembras de ballena azul en las condiciones actuales, con un rango general de  $18.9-79.11 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Y por estado reproductivo: hembras gestantes,  $8.63-28.26 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , hembras en reposo y  $8.17-30.66 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en lactantes, utilizando la técnica de radioinmunoensayo, con muestras en base seca.

## 10. RECOMENDACIONES

Se recomienda dar continuidad al estudio y seguir muestreando a través de los años, tanto en el Golfo de California, como en las áreas de alimentación en las costas fuera de California, permitiendo así la aplicación del estudio al comparar una zona con alto tráfico marítimo con una donde se está desarrollando.

Asimismo se recomienda combinar este estudio con parámetros adicionales como: condición corporal, carga parasitaria, acústica, datos de comportamiento, variables ambientales, etc., ya que muchos factores pueden alterar las elevaciones de glucocorticoides.

Al ser especies de difícil acceso y manipulación se sugiere aprovechar la presencia de ballenas azules varadas, para obtener muestras de diferentes tejidos y excreciones, para comparar las concentraciones hormonales y permitir hacer inferencias más claras del funcionamiento endocrino en esta especie.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Borrego, S. 1983. Gulf of California. 427-449. *En: Ketchum, B.H. (Ed.) Ecosystems of the World 26 Estuaries and enclosed seas.* Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam. 500 p.

Álvarez-Borrego, S. & J.R. Lara-Lara. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. 555-567. *En: Dauphin, J.P. & B.R.T. Simoneit (Eds.) The Gulf and Peninsula, Province of the California.* Amer. Assoc. of Petrol. Geol., Memoria 47. Oklahoma. 834 p.

Berkeley, E.V., J.F. Kirkpatrick, N.E. Schaffer, W.M. Bryant & W.R. Threlfall. 1997. Serum and fecal steroid analysis of ovulation, pregnancy and parturition in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Zoo Biol.*, 16: 121–132.

Bidlingmeyer, B.A. 1992. *Practical HPLC Methodology and Applications.* A Wiley-Interscience Publication. USA. 452 p.

Breazile, J.E. 1988. The physiology of stress and its relationship to mechanisms of disease and thera-peutics. *Vet.Clin.North Am. Food Anim. Pract.*, 4 (3): 441–480.

Bronson, F.H. 1999. Puberty and energy reserves: a walk on the wild side.15–33. *En: Wallen, K. & J.E. Schneider (eds.) Reproduction in Context: social and environmental influences on reproduction.* Mit Press, Cambridge, MA. 534 p.

Broom, D.M. & K.G. Johnson. 1993. Assessing welfare: short term responses. 87-144. *En: Broom, D.M. & K.G. Johnson (Eds.) Stress and animal welfare.* Chapman and Hall. London. 207 p.

Brousset Hernández-Jáuregui, D.M., F. Galindo-Maldonado, R.A. Valdez-Pérez, M. Romano-Pardo & A. Schuneman de Aluja. 2005. Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Vet. Méx.*, 36 (3): 325-337.

Brown, J.L., S.K. Wasser, D.E. Wildt & L.H. Graham. 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biol. Reprod.*, 51: 776–786.

Calambokidis, J. & J. Barlow. 2004. Abundance of blue and humpback whales in the eastern North Pacific estimated by capture-recapture and line-transect methods. *Mar. Mamm. Sci.*, 20: 63– 85.

Calambokidis, J., J. Barlow, J.K.B. Ford, T.E. Chandler & A.B. Douglas. 2009. Insights into the population structure of blue whales in the Eastern North Pacific from recent sightings and photographic identification. *Mar. Mamm. Sci.*, 25 (4): 816-832.

Chadio, S., E. Xylouri, D. Kalogiannis, E. Michalopoulou, S. Evagelatos & I. Menegatos. 2002. Early pregnancy diagnosis in swine by direct radioimmunoassay for progesterone in blood spotted on filter paper. *Anim. Reprod. Sci.*, 69: 65–72.

Chan D.W. & M.T. Perlstein. 1987. *Immunoassay a practical guide*. Academic Press, INC, USA, California 167 p.

Chard, T. 1995. *An introduction to radioimmunoassay and related techniques* 5<sup>th</sup> edition. Elsevier, Amsterdam. 328 p.

Chrousos, G.P. 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptative response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 85: 311-355.

Cummings, D.C., M.E. Quigley & S.S. Yen. 1983. Acute suppression of circulating testosterone levels by cortisol. *Men. J. Clinic Endocrin. Metabol.*, 57: 671-673.

Cockrem, J.E. & J.R. Rounce. 1994. Faecal measurements of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation on plasma steroid concentrations in the domestic fowl. *Brit. Poultry Sci.*, 35: 433-443.

Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. 1992. Apéndices I y II. Cetácea, 11 de junio de 1992. 8 p.

Dobson, H. & R.F. Smith. 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.*, 60: 743–752.

Engeland I.V., E. Ropstad, Ø. Andresen & L.O. Eik. 1997. Pregnancy diagnosis in dairy goats using progesterone assay kits and oestrous observation. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 237–43.

Enríquez-Paredes, L.M. 2005. *Identidad genética de la población de ballena azul (Balaenoptera musculus) en el Pacífico Nororiental: agregaciones mexicanas*. Tesis de Doctorado. UABC. Ensenada, Baja California, México. 198 p.

Ferin, M. 1999. Stress and the reproductive cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84: 1768-1774.

Fiedler, P., S. Reilly, R. Hewitt, D. Demer, V. Philbrick, S. Smith, W. Armstrong, D. Croll, B. Tershy & B.R. Mate. 1998. Blue whale habitat and prey in the Channel Islands. *Deep-Sea Res. II.*, 45: 1781-1801.

Flores-Cascante. L. 2012. *Caracterización de la carga parasitaria intestinal en ballenas azules del Golfo de California*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 76 p.

Foley, C.A.H., S. Papageorge, & S.K. Wasser. 2000. Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging african elephants. *Conserv. Biol.*, 15 (4): 1134-1142.

Gendron, D. 2010. El método de muestreo de animal focal adaptado a ballenas azules: un estudio piloto. Resumen. *En: 32ª Reunión Internacional sobre el Estudio de los Mamíferos Marinos*, Xalapa, Veracruz.

Gendron, D. 2002. *Ecología poblacional de la ballena azul de la Península de Baja California*. Tesis de doctorado. CICESE. México. 112 p.

Gendron, D. & A. Ugalde De la Cruz. 2012. A new classification method to simplify blue whale photo-identification technique. *J. Cetacean Res. & Manage.*, 12 (1): 79-84.

Goymann, W., E. Möstl, T. Van't Hof, M.L. East & H. Hofer. 1999. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 114: 340-348.

Guyton, A.C. & J.E. Hall, 1996. *Textbook of Medical Physiology*, 9<sup>th</sup> edition. W.B. Saunders Co, Philadelphia, P.A. 1148 p.

Heistermann, M., E. Möstl & J.K. Hodges. 1995. Non-invasive endocrine monitoring of female reproductive status: methods and applications to captive breeding and conservation of exotic species. 36-48. *En: Gauslophe, A., J.K. Hodges & W. Kaumanns (Eds.) Research and captive propagation*. Filander Verlag Gmbh Erlanger. Finlandia. 338 p.

Herman, J.P. & W.E. Cullinam. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.*, 20: 78-84.

Hunt, K.E., R.M. Rolland, S.D. Kraus & S.K. Wasser. 2006. Analysis of fecal glucocorticoids in the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148: 260–272.

Kjeld, M., Ö. Ólafsson, G.A. Víkingsson & J. Sigurjónsson. Sex hormones and reproductive status of the North Atlantic fin whales (*Balaenoptera physalus*) during the feeding season. *Aquat. Mamm.*, 32 (1): 75-84.

Kapoor, A., D. Elizabeth, A. Kostaki, M.H. Andrews & S.G. Matthews. 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids., *J. Physiol.*, 572: 31–44.

Kellar, N.M., M.L. Trego, C.I. Marks & A.E. Dizon, 2006. Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids., *Mar. Mamm. Sci.*, 22 (1): 1-16.

Knol, B.W. 1991. Stress and the endocrine hypothalamus-pituitary-testis systems: a review. *Vet. Quart.*, 13: 104-114.

Kraus, S.D. & J.J. Hatch. 2001. Mating strategies in the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). *J. Cetacean Res. & Manage*, Special Issue, 2: 237-244.

Kraus, S.D. & R.M. Rolland. 2007. *The urban whale. North Atlantic right whales at the crossroads*. Harvard University Press. USA. 543 p.

Lockyer, C.H. 1984. Review of baleen whale (mysticeti) reproduction and implications for management. *Rep. Int. Whal. Commn. Spec. Iss.*, 6: 27-50.

Lusseau, D. & L. Bejder. 2007. The long-term consequences of short-term responses to disturbance: Experiences from whalewatching impact assessment. *Int. J. Comp. Psych.* 20 (2-3): 228-236.

Mansour, A.A.H., D.W. McKay, J. Lien, J.C. Orr, J.H. Banoub, N. Oien & G. Stenson. 2002. Determination of pregnancy status from blubber samples in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Mar. Mamm. Sci.*, 18: 112-120.

Marinone, S.G. 2003. A three-dimensional model of the mean and seasonal circulation of the Gulf of California. *J. Geoph. Res.*, 108: 21-27.

Martínez-López, G.L. 2009. *Contenido de hormonas esteroides en grasa de ballena azul (Balaenoptera musculus) del Golfo de California*. Tesis de maestría. CICIMAR. México. 107 p.

Martínez-Mota, R. & C. Valdespino. 2008. Determination of Fecal Glucocorticoid Metabolites to Evaluate Stress Response in *Alouatta pigra*. *Int. J. Primatol.*, 29: 1365-1373.

Mashburn, K. L. & S. Atkinson. 2004. Evaluation of adrenal function in serum and feces of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*): influences of molt, gender, sample storage, and age on glucocorticoid metabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 136: 371–381.

Mate, B.R., B.A. Lagerquist & J. Calambokidis. 1999. Movements of north pacific blue whales during the feeding season off southern California and their southern fall migration. *Mar. Mamm. Sci.*, 15: 1246-1257.

McEwen, B.S. & R.M. Sapolsky. 1995. Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5: 205-216.

Millsaugh, J.J., B.E. Washburn, M.A. Milanick, J. Beringer, L.P. Hansen & T.M. Meyer. 2002. Noninvasive techniques for stress assessment in white-tailed deer. *Wildlife Soc. B.*, 30: 899–907.

Millsaugh, J.J. & B.E. Washburn. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 138: 189–199.

Monfort, S.L. 2002. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. 147-165. En: Holt, W.V. & A.R. Pickard (Eds.) *Reproductive science and integrated conservation*. 426 p.

Monfort, S.L., K.L. Mashburn, B.A. Brewer & S.R. Creel. 1998. Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *J. Zoo Wildlife Med.*, 29 (2): 129-133.

Munck, A., P.M. Guyre & N.J. Holbrook. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.*, 5: 25–44.

Nelson, R.J. 2011. *An introduction to behavioral endocrinology* 4<sup>th</sup> edition. Sinauer Ass. Inc. Pub. Massachusetts, USA. 712 p.

Norman, A.W. & G. Litwack. 1987. *Hormones*. Acad. Press. Orlando, USA. 345 p.

Norris, D.O. 1996. *Vertebrate endocrinology, third edition*. Acad. Press, USA. 634 p.

R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. (<http://www.R-project.org/>).

Reilly, S.B., J.L. Bannister, P.B. Best, M. Brown, Jr. Brownell, R.L., D.S. Butterworth, P.J. Clapham, J. Cooke, G.P. Donovan, J. Urbán & A.N. Zerbini. 2008. *Balaenoptera musculus*. En: IUCN 2013. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2013.1. (<http://www.iucnredlist.org>).

Reilly, S.B., J.L. Bannister, P.B. Best, M. Brown, Jr. Brownell, R.L., D.S. Butterworth, P.J. Clapham, J. Cooke, G.P. Donovan, J. Urbán & A.N. Zerbini. 2012. *Eubalaena glacialis*. En: IUCN 2013. *IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2013.1. (<http://www.iucnredlist.org>).

Roden, G.I. 1964. Oceanographic aspects of the Gulf of California. En: van Andel T.H. & G.S. Shore (Eds.) *Marine Geology of the Gulf of California*. America Assoc. of Petroleum Geologist Memoirs, 3: 30-58.

Rolland, R.M., K.E. Hunt, S.D. Kraus & S.K. Wasser. 2005. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 142: 308–317.

Rolland, R.M., S.E. Parks, K.E. Hunt, M. Castellote, P.J. Corkeron, D.P. Nowacek, S.K. Wasser & S.D. Kraus. 2012. Evidence that ship noise increases stress in right whales. *Proc. R. Soc. B.*, 279 (1737): 2363–2368.

Romero, L.M., J.C. Wingfield. 1998. Seasonal changes in adrenal sensitivity alter corticosterone levels in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 119 (1): 31–36.

Sapolsky, R.M. 1992. Neuroendocrinology of the stress response. 287-324. *En: Becker J.B., S.M. Breedlove, D. Crews & M.M. McCarthy (Eds.) Behavioural endocrinology.* Massachusetts Institute of Technology Press N.Y. USA. 749 p.

Salposky, R.M. 1994. *Why zebras don't get ulcers: A guide to stress, stress-related diseases, and coping.* W.H. Freeman, New York. 368 p.

Schwarzenberger, F. 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *Int. Zoo Yb.*, 41: 52–74.

Schwarzenberger, F., E. Möstl, R. Palme & E. Bamberg. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitor & of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 515-526.

Sears, R. 2002. Blue whale. 112-116. *En: Perrin, W.F., B. Würsig & J.G.M. Thewissen (Eds.) Encyclopedia of Marine Mammals. 1ª Edition.* Academic Press Elsevier. USA. 1355 p.

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Jueves 30 de diciembre de 2010, Segunda sección, México 36 p.

Senger, P.L.1999. *Pathways to pregnancy and parturition*, 1<sup>st</sup> revised edition. Current conceptions, Inc. Washington, USA. 281 p.

Selye, H. 1937a. Studies on adaptation. *Endocrinol.*, 21: 169-188.

Siiteri, P.K. 1981. Extra glandular oestrogen formation and serum binding of oestradiol: relationship to cancer. *J. Endocrin.*, 89: 119-129.

Small, G.L. 1971. *The blue whale*, Columbia University Press, 248 p.

Snegovskikh, V., J.S. Park & E.R. Novwitz. 2006. Endocrinology of parturition. *Endocrinol. Metab. Clin. Nam.*, 35: 173-191.

Squires E.J. 2003. *Applied Animal Endocrinology*. Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. 230 p.

St Aubin, D.J. 2001. Endocrinology. 165-192. *En: Dierauf, L.A. & F.M.D. Gulland (Eds.) CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 2<sup>nd</sup> edition. CRC. Press. USA. 1065 p.

Stratakis, C.A. & G.P. Chrousos. 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 771: 1–18.

Tizard, I.R. & R.M. Schubot. 2002. *Inmunología Veterinaria, Sexta edición*, McGraw-Hill Interamericana Editores, México, 517 p.

Tucker, H.A. 1988. Lactation and its hormonal control. *En: Knobil, E. & J.D. Neill, (Eds.) The Physiology of Reproduction.* J.D. Raven Press, New York, NY, 3269 p.

Valdespino, C., R. Martínez-Mota., L.M. García-Feria & L.E. Martínez-Romero. 2007. Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: evolución de una metodología no invasiva. *Acta Zool. Mexicana* (n.s.), 23 (3): 151-180.

Villegas-Amtmann, S., S. Atkinson, & D.P. Costa. 2009. Low synchrony in the breeding cycle of Galapagos sea lions revealed by seasonal progesterone concentrations. *J. Mammal.*, 90 (5): 1232–1237.

Von der Ohe, C.G. & C. Servheen. 2002. Measuring stress in mammal using fecal glucocorticoids: opportunities and challenges. *Wildlife Soc. B.*, 30 (4): 1215-1225.

Walker, B.G., P.D. Boersma & J.C. Wingfield. 2005. Field Endocrinology and Conservation Biology. *Integr. Comp. Biol.*, 45: 12–18.

Walker, L.A., L. Cornell, K.D. Dahl, N.M. Czekala, C.M. Dargen, B. Joseph, A.J.W. Hsueh & B.L. Lasley. 1988. Urinary concentrations of ovarian steroid hormone metabolites and bioactive in killer whales (*Orcinus orca*) during ovarian cycles and pregnancy. *Biol. Reprod.*, 39: 1013-1020.

Wasser S.K., K.E. Hunt, J.L. Brown, K. Cooper, C.M. Crockett & U. Bechert. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Endocrinology.* 120: 260-275.

Welsh, T.H., C.N. Kemper-Green & K.N. Livingston. 1999. Stress and reproduction. 662-674. *En: Knobil, E. & J.D. Neill (eds.) Encyclopedia of reproduction.* Acad. Press., San Diego, 4768 p.

West, K.L., S. Atkinson, M.J. Carmichael, J.C. Sweeney, B. Krames & J. Krames. 2000. Concentrations of Progesterone in Milk from Bottlenose Dolphins during Different Reproductive States *Gen. Gen. Comp. Endocrinol.*, 117: 218-224.

Westin, J.L. 2007. *Effects of tourism on the behavior and health of red howler monkeys (Alouatta Seniculus) in Suriname.* Tesis de doctorado. University of Michigan. USA. 220 p.

Wingfield, J.C. & R.M. Sapolsky. 2003. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinol.* 15: 711-724.

Williams, R., D. Lusseau & P.S. Hammond. 2006. Estimating relative energetic costs of human disturbance to killer whales (*Orcinus orca*). *Biol. Cons.*, 133 (3): 301-311.

Yimer, N., Y. Rosnina, H. Wahid, M.M. Bukar, A. Malik, K.C. Yap, M. Fahmi, P. Ganesamurthi & A.A. Saharee. 2012. Fecal Progesterone Extraction and Analysis for Non-invasive Monitoring of Ovarian Cycle in Beef Cows. *Pak. Vet. J.*, 32 (4): 584-588.

Yochem, P.K. & S. Leatherwood. 1985. Blue whale (*Balaenoptera musculus* Linnaeus, 1758) 193-240. *En: Ridgway, S.H. & S.R. Harrison (Eds.) Handbook of Marine Mammals, Vol. 3: The Sirenians and Baleen Whales,* Acad. Press, NY. 1116 p.