



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**DINAMICA ANUAL DE HORMONAS
ESTEROIDEAS DEL LOBO MARINO
DE CALIFORNIA (*Zalophus californianus*)**

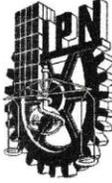
T E S I S

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

PRESENTA

BRENDA MORALES PÉREZ

LA PAZ, B. C. S., FEBRERO DE 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14 BIS
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de siendo las horas del día del mes de del se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: para examinar la tesis titulada: por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	MORALES	Apellido Materno:	PÉREZ	Nombre (s):	BRENDA
-------------------	---------	-------------------	-------	-------------	--------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **NO APROBAR** la tesis, en virtud de los motivos siguientes: "SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"

Comité tutorial

DRA. CLAUDIA JANETL HERNÁNDEZ CAMACHO
(Directora de Tesis)
13791-EF-18/3- PROFESOR COLEGIADO

DR. RODRIGO MONCAYO ESTRADA
12937-EE-17- PROFESOR COLEGIADO

DR. PABLO DEL MONTE LUNA
14080-EE-19 - PROFESOR COLEGIADO

DRA. VANESSA LABRADA MARTAGÓN
(2ª. Directora de Tesis)
PROFESORA OTRA INSTITUCIÓN

DRA. TANIA ZENTENO SAVIN
PROFESORA OTRA INSTITUCIÓN

Presidente del Colegio de Profesores

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 17 del mes de Febrero del año 2020

El (la) que suscribe BIÓL. BRENDA MORALES PÉREZ Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A180526 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. CLAUDIA JANETL HERNÁNDEZ CAMACHO Y DRA. VANESSA LABRADA MARTAGÓN

y cede los derechos del trabajo titulado:

"DINÁMICA ANUAL DE HORMONAS ESTEROIDEAS DEL LOBO MARINO DE CALIFORNIA

Zalophus californianus)"

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: brendamoralesperez@gmail.com - cjhernandez78@gmail.com - vlabrada@gmail.com

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

BIÓL. BRENDA MORALES PÉREZ

Nombre y firma del alumno

La Paz, B. C. S. a 7 de febrero de 2020.

**H. Colegio de Profesores
CICIMAR-IPN
PRESENTES**

Los miembros del Comité de Tesis de Maestría de la estudiante Brenda Morales Pérez:

Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho (Directora de tesis)
Dra. Vanessa Labrada Martagón (2ª Directora de tesis)
Dr. Pablo del Monte Luna
Dr. Rodrigo Moncayo Estrada
Dra. Tania Zenteno Savín

Damos constancia de que el manuscrito titulado

DINÁMICA ANUAL DE HORMONAS ESTEROIDEAS DEL LOBO MARINO DE CALIFORNIA (*ZALOPHUS CALIFORNIANUS*).

Desarrollado por la tesista reúne las exigencias de originalidad requeridas. Se anexa el dictamen emitido por la aplicación utilizada (Turnitin).

Sin más por el momento, lo saludamos muy

ATENTAMENTE

LOS MIEMBROS DEL COMITÉ

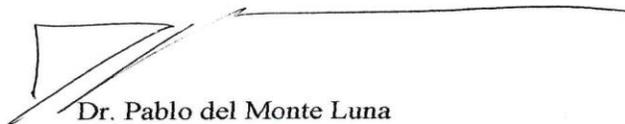


Dra. Claudia Janetl Hernández Camacho

VoBo



Dra. Vanessa Labrada Martagón


Dr. Pablo del Monte Luna


Dr. Rodrigo Moncayo Estrada


Dra. Tania Zenteno Savín

Turnitin Informe de Originalidad

Procesado el: 06-feb.-2020 15:12 CST
 Identificador: 1252763218
 Número de palabras: 19887
 Entregado: 1

Versión final de la tesis de maestría
 Por Brenda Morales Pérez

1% match (trabajos de los estudiantes desde 06-dic.-2018)

[Submitted to CONACYT on 2018-12-06](#)

< 1% match (Internet desde 29-jul.-2019)

Índice de similitud

5%

Similitud según fuente

Internet Sources:	5%
Publicaciones:	2%
Trabajos del estudiante:	2%

<https://studylib.es/doc/7050468/evaluaci%C3%B3n-de-los-perfiles-de-%C3%A1cidos-g-rasos-del>

< 1% match (Internet desde 14-oct.-2014)

<http://www.islaespiritusanto.org/pdf/PMEspirituSantopar%20ConsultaPublica.pdf>

< 1% match (Internet desde 19-feb.-2018)

<http://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/14525/1/porrasp1.pdf>

< 1% match (Internet desde 12-abr.-2018)

<http://zalophuscalifornianus.bloaspot.com/>

< 1% match (Internet desde 16-abr.-2018)

<http://repositorio.ucp.edu.pe/bitstream/handle/UCP/87/FEH-E-T-TSP-2016-ANGULO-FERNANDEZ-Situaci%C3%B3n.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

< 1% match (Internet desde 19-jul.-2015)

<http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/185.pdf>

< 1% match (Internet desde 26-ago.-2013)

<http://lajamjournal.org/index.php/lajam/article/download/224/176>

< 1% match (Internet desde 21-dic.-2019)

<http://cienciasmarinas.com.mx/index.php/cmarinas/article/download/3019/420420491/>

< 1% match (Internet desde 24-may.-2016)

<http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/1695/1/RI001168.pdf>

< 1% match (Internet desde 02-ago.-2019)

http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/14451/S%C3%A1nchez_TCV.pdf?isAllowed=y&sequence=1

< 1% match (Internet desde 30-nov.-2015)

<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/21105/rochinb1.pdf?sequence=1>

< 1% match (Internet desde 15-dic.-2019)

<http://centro.paot.mx/documentos/conano/Logros-2012.pdf>

< 1% match (Internet desde 14-dic.-2014)

<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/16353/paezr2.pdf?sequence=1>

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente todos los miembros de mi Comité por el tiempo dedicado para mejorar la presentación de este proyecto.

Gracias en especial a la Dra. Tanía Zeneno, además de su aporte como miembro del Comité, por enriquecer la discusión de los resultados y facilitar las herramientas para el procesamiento de las muestras.

Al Ingeniero Orlando Lugo por compartir amablemente su conocimiento, y su tiempo, además de compromiso para conseguir procesar las muestras.

Al Maestro Gustavo de la Cruz Agüero por su dedicación para contribuir de manera relevante en la formación de los estudiantes.

Al Dr. David Alfaro Siqueiros por transmitir su compromiso y generar consciencia sobre en la buena práctica del quehacer científico.

A CONANP y el equipo de guardaparques por las facilidades con el transporte a la isla y por su amabilidad para recibirnos en la cabaña.

A los proyectos: SIP 20195945, Estado de la población y efecto de la actividad turística en la Colonia de lobo marino de California de Los Islotes, Bahía de La Paz, B.C.S., México.

SIP 20182709. Viajes y áreas de alimentación del lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*) de las Islas San Benito, B.C.

A CONACyT por la beca de manutención.

A mis padres: Guadalupe y Enrique, por siempre ser mi apoyo, el mejor ejemplo y por creer en mí.

A mi hermano Jorge por todos los consejos y por venir de visita con la mejor actitud para hacer y deshacer.

A Carlos (*mon ami*), y Sergio por escucharme y alegrarme cada que lo necesito.

A Sam por darme ánimos, por la compañía y los paseos que salieron.

A Ángel por ser el mejor compañero para todo... ¡el plan maestro ya empezó!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. ANTECEDENTES	4
2. JUSTIFICACIÓN	7
4. OBJETIVOS	8
4. 1. Objetivo general	8
4. 2. Objetivos específicos	8
5. HIPÓTESIS	9
6. MATERIALES Y MÉTODOS	9
6. 1. Área de estudio	9
6. 2. Colecta de muestras	11
6. 3. Ensayos inmunoenzimáticos para la cuantificación hormonal	14
6. 4. Extracción de esteroides de la fase sólida	14
6. 5. Validación de los ensayos inmunoenzimáticos para las hormonas esteroideas	14
6. 5. 1. Prueba de paralelismo	15
6. 5. 2. Prueba de precisión	16
6. 5. 3. Factor de dilución de las muestras para la cuantificación hormonal	17
6. 6. Cuantificación hormonal	17
6. 7. Análisis estadísticos	18
6. 8. Identificación del sexo	19
6. 9. Análisis de cosinor	20
7. RESULTADOS	21
7. 1. Validación del inmunoensayo para cuantificación de hormonas esteroideas en heces de lobo marino de California	21
7. 1. 1. Prueba de paralelismo	21
7. 1. 2. Prueba de precisión	22
7. 2. Factor de dilución para la cuantificación hormonal de las muestras	25
7. 3. Concentración hormonal	27

7. 4. Identificación del sexo del animal al que pertenecen las muestras	30
7. 5. Razón testosterona estradiol (T:E).....	35
7. 6. Oscilación anual	35
8. Discusión	38
8. 1. Validación del inmunoensayo para la cuantificación de hormonas esteroideas en heces de lobo marino de California	38
8. 2. Cuantificación hormonal	40
8. 3. Variación hormonal con relación al ciclo reproductivo	41
8. 4. Proporción de cada hormona en las muestras	44
8. 5. Oscilación anual de las hormonas	46
8. 6. Identificación de sexo	50
9. Conclusiones	53
10. Recomendaciones.....	55
11. Referencias	56
Anexo I. Protocolo para la colecta de muestras fecales de lobo marino de California <i>Zalophus californianus</i>	65
Anexo II. Protocolo para la extracción de esteroides a partir de una fase orgánica sólida	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de Los Islotes, en el complejo Insular Espíritu Santo - La Partida, a 50km de la Ciudad de La Paz	10
Figura 2. Zonificación de Los Islotes de acuerdo con el plan de manejo del Parque Nacional Zona Marina del Archipiélago de Espíritu Santo. APFF Islas del Golfo de California, B.C.S. (CONANP, 2014)	11
Ilustración 3. Representación del ciclo reproductivo anual del lobo marino de California en Los Islotes, bahía de La Paz, B. C. S., México. En cada recuadro se señala el tiempo que toma cada evento y el mes en el que inicia.	13
<i>Figura 4. Representación de las diluciones seriales aplicadas en la mezcla de extractos (ME)</i>	16
Figura 5. Prueba de paralelismo con los modelos de regresión lineal para la ME y CE de cada hormona.	23
Figura 6. Modelos de regresión lineal entre las concentraciones esperadas de acuerdo con la CE y las observadas de la ME más las diferentes concentraciones de CE de cada hormona analizada.....	24
Figura 7. Concentración hormonal cuantificada por factor de dilución de la curva estándar (CE) y mezcla de extractos (ME). Los asteriscos señalan la dilución de ME que tiene la una concentración cercana a los estándares 3 y 4 de CE.	26
Ilustración 8. Concentración promedio de hormonas esteroideas cuantificadas en heces de lobo marino de California en Los Islotes, B.C.S., México. Los datos atípicos extremos no fueron incluidos en esta gráfica.....	28
Figura 9. Concentraciones hormonales promedio en heces de lobo marino de California durante los meses de muestreo en Los Islotes, B.C.S., México.	29
Figura 10. Proporción de hormonas esteroideas en cada muestra, agrupadas por mes de muestreo.	30
Figura 11. Proporción de hormonas sexuales en cada muestra, agrupadas por mes de muestreo. La información para la muestra 51 no se presenta, pues la progesterona en dicha muestra no pudo ser cuantificada.	31
Figura 12. Representación biespacial de los dos primeros componentes principales generados por el ACP. Las claves representan a cada muestra y las líneas los vectores generados para cada hormona.	32
Figura 13. Análisis de cluster para los valores hormonales en heces de lobo marino de California. Se distinguen 5 grupos, grupo 1 muestras con mayor concentración de testosterona respecto a las horas hormonales. Grupo 5 muestras con mayor proporción de progesterona de todo el estudio. Los grupos intermedios presentan mayor asociación con estradiol y menor con progesterona.....	34
Figura 14. Razón testosterona:estradiol por muestra, agrupados por mes.....	36
Figura 15. Oscilación anual de cada hormona.	37
Figura 16. Fotoperíodo en la ciudad de La Paz por mes de muestreo.....	38
Figura 17. Ejemplificación de heces de lobo marino, el punto verde señala el área del copro de la que se obtuvo la muestra.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Acontecimientos relevantes en el ciclo reproductivo de la especie <i>Zalophus Californianus</i>	13
Tabla 2. Comparación de las pendientes de los modelos lineales para la ME y la Ce.....	22
Tabla 3. Rangos y promedios de la concentración de hormonas esteroideas en heces de lobo marino de California en Los Islotes, sin considerar los datos atípicos extremos.	27
Tabla 4. Rango de la curva estándar de cada kit comercial y coeficientes de variación estimados para los ensayos EIA realizados.	27
Tabla 5. Valores de probabilidad de la prueba Klmogorov-Smirnov con ajuste de Lillefors.	28
Tabla 6. Rangos de la proporción de hormonas detectada en las muestras de heces de lobo marino de California en Los Islotes. (ee, error estándar).	29
Tabla 7. Rangos de la proporción de hormonas detectada en heces de lobo marino de California en Los Islotes (ee, error estándar).....	31
Tabla 8. Parámetros del análisis de cosinor para cada hormona.....	37

GLOSARIO

Analito: componente de interés en una muestra que es separado de la matriz.

Caracteres sexuales secundarios: cambios anatómicos y fisiológicos que generan las características propias que diferencian la anatomía y fisiología de hembras y machos.

Ciclo biológico: oscilación de un parámetro biológico dependiente de un reloj endógeno y de sincronizadores ambientales.

Ciclo reproductivo: reproducción de los organismos regulada por cambios endócrinos con diferencias especie específicas.

Diluciones seriales: reducción progresiva, paso a paso, de la concentración de una sustancia en disolución.

Dimorfismo sexual: variaciones en la fisiología y anatomía entre machos y hembras de una misma especie.

Ensayo inmunoenzimático: método que permite la cuantificación de un marcador de interés en una muestra biológica. Dicho marcador puede ser un anticuerpo, una hormona, un péptido o una proteína.

Hormona: Sustancia química producida por un órgano, o por parte de él, cuya función es la de regular la actividad de un tejido determinado.

Metabolismo: conjunto de los cambios químicos y biológicos que se producen continuamente en las células vivas de un organismo

Pinnípedo: mamíferos marinos del orden Carnívora, con las extremidades en forma de aletas, su cuerpo es fusiforme y alargado.

Poliginia: habito de reproducción en el cual el macho copula con más de una hembra.

Sistema de apareamiento: es la forma en la que un grupo está estructurado con relación al comportamiento sexual.

Validación: conjunto de pruebas para evaluar la aptitud de un método en cuestión.

RESUMEN

El lobo marino de California (*Zalophus californianus*) presenta reproducción anual sincronizada con las variaciones en el ambiente para asegurar la supervivencia de las crías. A pesar de que el comportamiento durante el ciclo reproductivo ha sido ampliamente descrito, la información sobre los parámetros endócrinos de esta especie es escasa y se desconoce la variación anual de las hormonas esteroideas a lo largo del ciclo reproductivo, las cuales pueden utilizarse como una herramienta para el monitoreo de la condición de los animales e identificación del sexo. El objetivo de este estudio fue evaluar la dinámica de las hormonas testosterona, estradiol, progesterona y cortisol en heces de lobo marino de California en la colonia Los Islotes, Bahía de La Paz, Baja California Sur, México, a lo largo de un ciclo reproductivo. Se realizaron cuatro muestreos desde julio 2018 hasta abril 2019. Se determinó la concentración de cada hormona en las muestras fecales ($n=60$) por medio de ensayos inmunoenzimáticos. Se estandarizó el proceso de extracción de hormonas en las heces y se validaron los kits para cada hormona. En los resultados se observó una variación anual particular de cada hormona que se ajustó a los requerimientos encaminados a la reproducción. Por ejemplo, los niveles de testosterona y estradiol presentaron una tendencia similar; sus valores máximos no se presentaron en la temporada reproductiva. La concentración de progesterona incrementó en octubre y febrero, meses en los que se reporta que la gestación es activa. Se observó variabilidad en los niveles de cortisol a lo largo del año con un rango de 240.3-9699 pg mL⁻¹ y los valores elevados no estuvieron asociados a un evento del ciclo reproductivo en particular. En este estudio se describió la dinámica endócrina anual de la colonia Los Islotes y se presentó por vez primera la proporción de hormonas esteroideas que puede ser cuantificada en heces de lobo marino de California para el monitoreo de animales en vida libre. A pesar de que las heces son una matriz adecuada para la cuantificación hormonal en esta especie, se requieren otros análisis cuantitativos que permitan evaluar la relación entre la concentración de hormonas esteroideas y la identificación del sexo de los individuos.

ABSTRACT

The California sea lion (*Zalophus californianus*) annual reproductive cycle is synchronized with environmental variations in order to maximize offspring survival. Information on this species' endocrinological parameters is scarce. Although ample research documents the reproductive cycle of this pinniped species, annual variations in sex steroid hormones and their association with reproductive events are unknown. These data are essential for monitoring animal condition and for sex identification of immature organisms. Thus, the objective of this study was to evaluate the dynamics of the sex hormones testosterone, estradiol, progesterone, and cortisol as recorded in scat samples collected from California sea lions at the Los Islotes colony in Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mexico, throughout an entire reproductive cycle. A total of four sampling excursions were undertaken from July 2018 to April 2019. The concentration of each hormone in the scat samples ($n = 60$) was determined by means of immunoenzymatic assays. The process of extracting hormones from the scat samples was standardized and all hormone assays were validated. The particular annual variation of each hormone reflects the dynamic requirements of the annual reproductive cycle. For example, testosterone and estradiol displayed similar trends and their maximum values did not occur during the reproductive season. Progesterone concentration increased in October and February, by which time delayed implantation has ended and gestation is underway. Great variability was observed in cortisol levels throughout the year; however, elevated values were not associated with any particular reproductive event. Additional quantitative analyses are required in order to provide more detailed information on patterns of hormone variation and to corroborate the parameters suggested here regarding sex identification based on steroid hormone levels. This study describes the annual endocrine dynamics of the Los Islotes California sea lion colony and presents for the first time the proportion of steroid hormones that can be quantified in California sea lion scat for use in monitoring of wild animals.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas son un mecanismo para mantener la homeostasis (Mashburn y Atkinson, 2004) y contribuyen a mediar los cambios estacionales en la fisiología de los organismos (Rosen y Kumagai, 2008). Su monitoreo brinda información precisa sobre eventos como el crecimiento, la reproducción y la salud de los individuos (Mashburn y Atkinson, 2004). Las variaciones en los niveles de hormonas necesarias para llevar a cabo los eventos reproductivos son específicas para cada especie, de manera que pueden ser utilizadas como indicadores de la condición de los animales (Mashburn y Atkinson, 2004) pero requieren ser determinadas y estudiadas en cada población particular bajo estudio.

Los datos sobre la endocrinología reproductiva del lobo marino de California (*Zalophus californianus*) son limitados, y obtenidos principalmente de animales varados y en cautiverio, debido a la dificultad para obtener muestras seriales de los individuos en vida libre (Boyd, 1991). Al ser una especie gregaria y con sincronía reproductiva (Cassini, 1999; Wartzok, 1991), las variaciones endócrinas de *Z. californianus* a lo largo del ciclo atienden cambios anatómicos y conductuales propios de las diferentes fases del ciclo reproductivo (Jiménez et al., 2015; Zubeldia-Brenner et al., 2016). En el ciclo reproductivo anual del lobo marino de California pueden distinguirse los siguientes eventos: conductas de cortejo, apareamiento, diapausa embrionaria, implantación del blastocito, desarrollo fetal y parto (Gales et al., 1997; Atkinson y Gilmartin, 1992; Larson y Casson, 2007; Atkinson y Robbeck, 2001).

El lobo marino de California, presenta un sistema de apareamiento poligínico con defensa del territorio tipo *lek* (Heath, 1989; Bohórquez-Herrera et al., 2014) y dimorfismo sexual (Bartholomew, 1970), característica que se encuentra estrechamente asociada con la poliginia. De manera que los machos de gran tamaño poseen mayores reservas energéticas y son capaces de permanecer más tiempo al cuidado de su territorio y de las hembras que lo habitan (Wartzok, 1991). Las hembras y los machos alcanzan la madurez sexual a los cinco años, pero los

machos son capaces de defender sus territorios a la edad de 9 años (Bohórquez-Herrera et al., 2014).

Las hembras suelen dar a luz a una cría por temporada, son las encargadas del cuidado de éstas e intercalan los eventos de amamantamiento con viajes de alimentación (García-Aguilar y Auriol-Gamboa, 2003b). Los partos se concentran en un intervalo corto de tiempo que comprende desde los últimos días de mayo hasta mediados de julio; la etapa de amamantamiento generalmente toma 12 meses (Hernández-Camacho et al., 2008). Todas las hembras entran en estro 21 días después del parto (García-Aguilar y Auriol-Gamboa, 2003a); gracias a que la receptividad está sincronizada, los machos pueden copular con varias hembras en poco tiempo (Wartzok, 1991).

La mayoría de las cópulas ocurren en agosto y el blastocito se implanta tres meses después; en consecuencia, la gestación inicia en octubre. La implantación retardada del blastocito se presenta en todos los pinnípedos con una duración variable entre especies, de tal manera que las hembras dan a luz en la misma temporada cada año (Boyd et al., 1993; Dardente, 2015).

La estrategia anterior aumenta las probabilidades de que las crías nazcan cuando las condiciones de temperatura y disponibilidad de alimento sean adecuadas para su supervivencia (Boyd, 1991; Gales et al., 1997; Atkinson y Gilmartin, 1992; Larson y Casson, 2007). De esta forma resulta esencial que los animales se anticipen fisiológicamente ante las variaciones en las condiciones del medio para coordinar la disponibilidad de recursos con eventos fisiológicos como la reproducción (Boyd, 1991).

Una señal periódica del medio capaz de sincronizar el ciclo reproductivo en los pinnípedos es el fotoperiodo (Temte, 1991), cuya variación a lo largo del año es más pronunciada en altas latitudes (Temte, 1985). En lobos marinos en cautiverio entre las latitudes 21° N y 43° N, los nacimientos ocurren 0.6 días antes por cada grado de desplazamiento hacia el norte y la duración de la temporada de nacimientos es mayor en bajas latitudes (Temte y Temte, 1993).

Particularmente, en el lobo marino de California se ha comparado el inicio y duración de la temporada de nacimientos en dos colonias ubicadas en el golfo de California con diferente latitud: Los Cantiles (29°53´N) y Los Islotes (24° 58´N). La temporada de nacimientos inicia primero en Los Cantiles, abarca de la segunda semana de mayo a la primera de julio; presenta dos picos de nacimientos en la primer (21%) y tercer (55%) semana de junio. En Los Islotes esta temporada requiere más tiempo, los nacimientos inician la cuarta semana de mayo y terminan la segunda semana de julio, con un pico de nacimientos (40%) en la tercer semana de junio (García-Aguilar y Auriolles-Gamboa, 2003a).

Los eventos reproductivos están regulados por los niveles de ciertas hormonas (Jiménez et al., 2015; Zubeldia-Brenner et al., 2016), como la testosterona, el estradiol y la progesterona (Asdell, 1946; Jiménez et al., 2015). Estas hormonas se conocen como hormonas esteroideas debido a que se sintetizan a partir del colesterol (Zubeldia-Brenner et al., 2016), con efectos en la anatomía, fisiología y comportamiento de los organismos (Meise et al., 2016; Negro et al., 2010; Helm et al., 2013; Zubeldia-Brenner et al., 2016) y están presentes en ambos sexos. Las variaciones en las concentraciones de las hormonas reproductivas pueden reflejar la estacionalidad reproductiva (Burgess et al., 2016). Los niveles y variaciones de las hormonas durante el periodo reproductivo son específicas para cada especie (Atkinson y Gilmartin, 1992; Larson y Casson, 2007) y están relacionados con los desafíos que enfrenta cada sexo, como conseguir pareja y dejar descendencia (Jiménez et al., 2015).

En mamíferos, la testosterona es indispensable para el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de los machos (Asdell, 1946; Goymann y Wingfield, 2014). El incremento en su secreción presenta cambios estacionales, asociados con la temporada reproductiva, estimula la expresión de conductas agresivas, territoriales y de protección del harem (Boyd, 1991). La disminución en la concentración de esta hormona se asocia con la interrupción de las conductas de cortejo, cuando no es temporada reproductiva (Jiménez et al., 2015). Los niveles de testosterona también influyen en cambios morfológicos, como incremento en la masa testicular y en el

diámetro de los túbulos seminíferos, previo a y durante la temporada reproductiva (Boyd, 1991).

De manera general, las hembras de mamíferos presentan fluctuaciones hormonales en las diferentes etapas del ciclo estral (Asdell, 1946). Por ejemplo, el estro postparto se caracteriza por concentraciones elevadas de estradiol (Asdell, 1946; Boyd, 1991) seguido de la elevación en los niveles de progesterona (Boyd, 1991), la cual está involucrada en la implantación del blastocito, la continuación de la gestación, y probablemente evita que la hembra se encuentre receptiva (Asdell, 1946; Das Chagas et al., 2014; Pietraszek y Atkinson, 1994).

Otra hormona esteroidea asociada con los eventos reproductivos es el cortisol. En machos, los niveles de esta hormona decaen cuando la temporada reproductiva llega a su fin (Sherie et al., 1992). El cortisol es el principal glucocorticoide liberado durante un evento estresante y es concomitante con el incremento en el ritmo cardíaco (Romero y Butler, 2007), la agresividad, la propensión a enfermedades y la disminución de la tasa de crecimiento corporal, lo cual afecta negativamente la supervivencia de los individuos (Karatsoreos et al., 2011; McEwen, 1998). Si bien, niveles elevados de glucocorticoides inhiben la reproducción, estas hormonas son necesarias para mantener una adecuada función gonadal (Whirledge y Cidlowski, 2010) e intervienen en la respuesta inmune (Romero et al., 2009).

En este estudio se describió la dinámica endócrina anual del lobo marino de California (*Z. californianus*) en la colonia reproductiva de Los Islotes, Baja California Sur, México, y se presenta por vez primera la proporción y rango de concentración de hormonas reproductivas que pueden ser cuantificadas en heces de esta especie para el monitoreo de animales en vida libre.

1. ANTECEDENTES

La colonia de Los Islotes es la colonia de crianza más sureña dentro de la distribución de *Zalophus californianus*, y la más estudiada en México (Hernández-Camacho et al., 2008). Ésta se ubica en el complejo insular Espíritu Santo – La Partida (CONANP, 2014). Gracias a su proximidad con la ciudad de La Paz, Los Islotes es un sitio con atractivo turístico de reconocimiento internacional (Labrada-

Martagón et al., 2005). A pesar de que la mayoría de las colonias del golfo de California presentan tendencia de crecimiento negativa (Szteren et al., 2006), ésta colonia ha mostrado incremento constante en su abundancia (Szteren et al., 2006; Hernández-Camacho, datos no publicados). Su población actual es de aproximadamente 600 individuos (Pelayo González, 2018).

La población de lobos marinos en Los Islotes exhibe fluctuaciones estacionales en el número de individuos y se compone por cuatro categorías de edad: crías, subadultos, hembras y machos adultos (Aurioles et al., 1983). Durante el verano, la temporada de reproducción, las categorías más abundantes son las hembras adultas y las crías. Mientras que, durante el otoño y el invierno el número de machos adultos aumento debido a la llegada de machos migrantes del norte del golfo de California y de la costa occidental de la península de Baja California (Aurioles et al., 1983; Aurioles-Gamboa y Zavala-González, 1994; Elorriaga-Verplancken et al., 2018).

De tal forma que se presentan dos picos de abundancia en el sitio. Al final de la primavera, cuando llegan los machos adultos para reproducirse en el verano próximo y en el otoño con la llegada de machos subadultos y adultos del norte del gofo de California y la costa del Pacífico (Elorriaga-Verplancken et al., 2018).

Los únicos estudios sobre la endocrinología del lobo marino de California que se han realizado en esta colonia son los de Pedernera-Romano (2010) y Labrada-Martagón et al. (2007) quienes cuantificaron los niveles de cortisol en suero y en saliva de las crías. En las crías de Los Islotes, se encontró que los valores más altos de cortisol en ambas matrices se presentaron en los sujetos que amamantaron con menor frecuencia (Labrada-Martagón et al., 2007) y el promedio de cortisol sérico en sujetos de diferentes colonias después de la captura fue mayor en hembras que en machos. En una segunda muestra, el cortisol presentó elevación, como resultado del estrés causado por la captura, manipulación y anestesia (Pedernera-Romano et al., 2010).

La mayor parte de la información sobre ejemplares maduros de lobo marino de California proviene de animales varados y en cautiverio. Las hembras presentan los

valores más elevados de progesterona en suero entre septiembre y noviembre, sin diferencias significativas entre las preñadas y no preñadas (Greig et al., 2007); entre febrero y abril las hembras preñadas presentan valores más elevados de esta hormona que las no preñadas (Greig et al., 2007). También existe relación entre la concentración elevada de estrógenos en suero con los períodos de estro e implantación del blastocito (Greig et al., 2007).

Las hormonas esteroideas también se han cuantificado en grasa subcutánea de lobos marinos de California varados, ejemplo de ello es el trabajo de Beaulieu-McCoy y colaboradores (2017) donde cuantificaron y compararon la concentración de cortisol y progesterona en individuos de ambos sexos, encontraron una relación directa entre los valores de dichas hormonas en grasa. Argumentan que la progesterona es un precursor metabólico del cortisol. También asociaron los niveles elevados de progesterona en grasa con la condición de embarazo.

Para especies, como el lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*), los niveles de progesterona en suero incrementan entre los tres y cinco meses de gestación y son una herramienta para identificar hembras preñadas (Sattler y Polasek, 2017). En la foca gris (*Halichoerus grypus*) y la foca de puerto (*Phoca vitulina*), los niveles de esta hormona en plasma se reducen después de haber dado a luz (Boyd, 1991).

En madres y crías de lobo marino Antártico (*Arctocephalus gazella*), se encontró que los niveles de testosterona y cortisol obtenidos en muestras de pelo aumentan cuando se encuentran en un área delimitada con más individuos (Meise et al., 2016). Estas hormonas están asociadas con el comportamiento agresivo y resistencia a enfermedades, por lo tanto, también con el éxito reproductivo de los organismos (Boyd, 1991; McEwen, 1998). Se desconoce si esto ocurre en los individuos de lobo marino de California en Los Islotes, donde se sabe que el número de nacimientos cada temporada se ha mantenido estable en los últimos cinco años y la densidad de animales ha incrementado (Hernández-Camacho, datos no publicados).

El cortisol ha sido cuantificado en el plasma de hembras de focas de puerto (*Phoca vitulina*) en vida libre y presenta variaciones estacionales. Los mayores valores se presentaron en la fase de implantación retardada y durante el último trimestre de

gestación. Mientras que los más bajos se observaron durante la temporada reproductiva (Gardiner y Hall, 1997). Por lo tanto, los patrones anuales de las concentraciones plasmáticas de cortisol pueden relacionarse con fases fisiológicas y conductuales en el ciclo anual de este pinnípedo (Gardiner y Hall, 1997).

La cuantificación de hormonas se ha realizado también a partir de muestras fecales, pues de esta manera es factible la obtención longitudinal de datos y se evita el estrés resultante de la manipulación de los individuos (Mashburn y Atkinson, 2004). Ejemplo de ello es la descripción de la respuesta adrenal del lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) asociada a la inyección de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que promueve la liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo, como ocurre en una situación estresante (Mashburn y Atkinson, 2004). Se cuantificó la concentración de corticosterona en excretas de dos hembras y un macho en edad reproductiva en cautiverio obtenidas cada cuatro horas después de la inyección de ACTH en dosis de 2 IU/kg, I.M. Se observó un pico en la concentración de corticosterona 32 horas después de la inyección de ACTH. No se presentaron diferencias entre las dos hembras y el macho (Mashburn y Atkinson, 2004). En contraste, Hunt et al. (2004), al cuantificar la concentración de corticosteroides en heces después de la inyección de ACTH en dosis de 2 IU/kg en dos hembras y dos machos de la misma especie en cautiverio, encontraron diferencias entre sexos. Los machos presentaron líneas basales más altas, y picos aún más elevados y retardados que las hembras.

La testosterona es otra hormona que ha sido cuantificada en excretas. En el lobo marino de Nueva Zelanda (*Arctocephalus forsteri*), la concentración de esta hormona en heces es mayor en los machos territoriales comparados con los machos no territoriales (Negro et al., 2010), quienes exhiben conductas dominantes, mientras que los no territoriales exhiben conductas subordinadas hacia los machos territoriales (Negro et al., 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Los Islotes, en Baja California Sur, es la colonia de crianza más sureña en la distribución de *Zalophus californianus* (Hernández-Camacho et al. 2008). Ha sido

monitoreada por el laboratorio de Ecología de Pinnípedos “Burney J. Le Boeuf” desde la década de los ochentas y desde hace cinco años como parte del programa de Monitoreo Biológico y Programa de Manejo de Áreas Naturales Protegidas de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). Es la colonia más estudiada en México. Por ello, se cuenta con información detallada sobre demografía, hábitos alimenticios y comportamiento. Además, el sitio es un atractivo turístico a nivel internacional (Labrada-Martagón et al., 2005). Sin embargo, no existen valores endócrinos de referencia para el monitoreo del estado endócrino de los individuos en esta colonia. La información disponible para animales en vida libre sugiere que existen diferencias en la excreción de metabolitos esteroideos específicas para cada especie. De manera que es necesario caracterizar el perfil de hormonas esteroideas en *Zalophus californianus* para sentar las bases del monitoreo de esta especie.

4. OBJETIVOS

4. 1. Objetivo general

Determinar las variaciones en la concentración de testosterona, estradiol, progesterona y cortisol, durante un ciclo reproductivo, en heces de lobo marino de California que habita en la colonia Los Islotes, Baja California Sur, México.

4. 2. Objetivos específicos

Evaluar la utilidad de las heces de lobo marino de California para la cuantificación de la concentración de las hormonas testosterona, estradiol, progesterona y cortisol.

Identificar patrones en las concentraciones de testosterona, estradiol y progesterona cuantificadas en heces de lobo marino de California para la determinación del sexo de los individuos.

Determinar la variación en la concentración de testosterona, estradiol, progesterona y cortisol a lo largo del ciclo reproductivo anual del lobo marino de California en Los Islotes.

5. HIPÓTESIS

Las heces constituirán una muestra biológica no invasiva útil para la determinación y cuantificación de hormonas esteroideas en lobo marino de California. Estas hormonas serán extraídas de la fase sólida con el protocolo que ha sido reportado con éxito para otras especies de mamíferos marinos.

La relación de concentración de estradiol y testosterona exhibirá diferencias que permitan discriminar el sexo del animal al que pertenece la muestra, donde la relación elevada de estradiol respecto a testosterona se presentará en las hembras, contrario a lo que ocurrirá con los machos.

Se presentará un incremento en la concentración de testosterona, estradiol y cortisol durante la temporada reproductiva, y de progesterona durante la fase de gestación de acuerdo con lo reportado en suero para otras especies de pinnípedos y en el lobo marino de California.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6. 1. Área de estudio

La colonia de Los Islotes se ubica en el complejo insular Espíritu Santo-La Partida ($24^{\circ}35'N$, $110^{\circ}23'W$) en el margen suroccidental del golfo de California, 50 km al norte de la ciudad de La Paz, Baja California Sur (Fig. 1). La isla forma parte del Área de Protección de Flora y Fauna Islas Golfo de California y Parque Nacional Zona Marina del Archipiélago de Espíritu Santo.

Los Islotes son dos elevaciones de origen volcánico producidas por un fallamiento, cuya superficie es de 0.046 km^2 y su altura máxima es 60 msnm. En la periferia de este sitio la profundidad es menor de 6 m. El área presenta clima seco árido y desértico, con invierno fresco, la temporada cálida comprende de julio a octubre, en estos meses también se presentan lluvias. La temperatura media anual es de $23.6^{\circ}C$, y el rango es de 11 a $44^{\circ}C$ (SEMARNAT, 2000).

Los lobos marinos se distribuyen en todo el perímetro de Los Islotes, principalmente en las zonas denominadas A, B y C (Fig. 2). Las tres zonas son áreas de reproducción y están ocupadas principalmente por machos territoriales, hembras y

crías. Las zonas A y B se encuentran dentro del área de uso público, donde las embarcaciones pueden permanecer sujetadas a las boyas hasta por una hora y media mientras las personas nadan o practican buceo autónomo (CONANP, 2014). Estas actividades se pueden realizar todo el año excepto del 1 de junio al 31 de agosto, de acuerdo con la restricción impuesta por CONANP en 2017. En la zona C únicamente se permite el tránsito lento de las embarcaciones durante todo el año (CONANP, 2014).

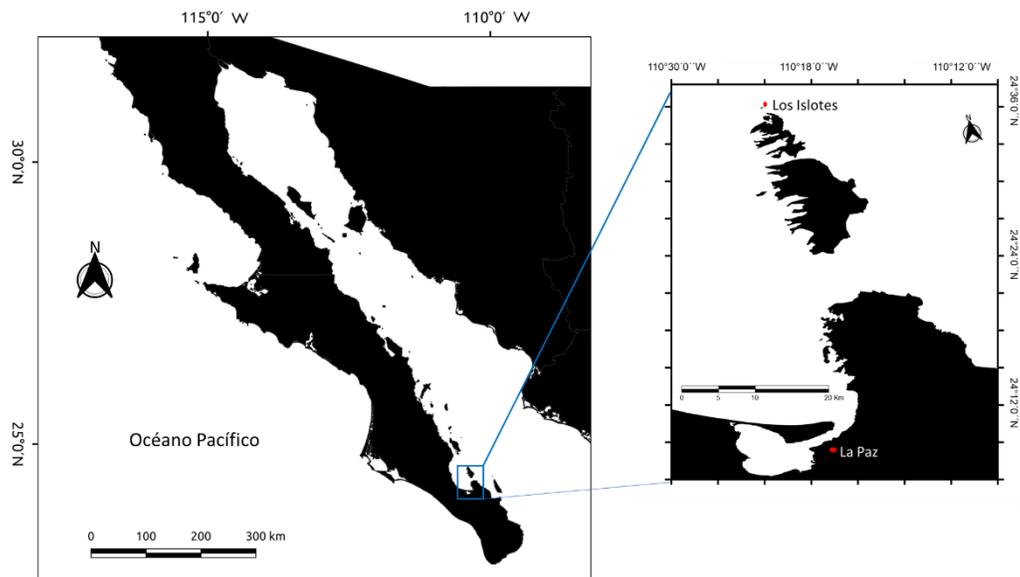


Figura 1. Localización de Los Islotes, en el complejo Insular Espíritu Santo - La Partida, a 50km de la Ciudad de La Paz

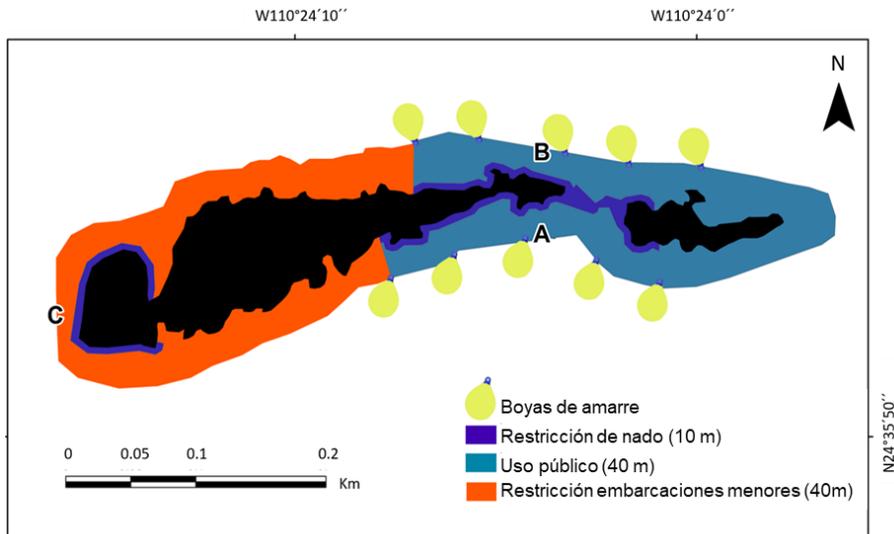


Figura 2. Zonificación de Los Islotes de acuerdo con el plan de manejo del Parque Nacional Zona Marina del Archipiélago de Espíritu Santo. APFF Islas del Golfo de California, B.C.S. (CONANP, 2014)

6. 2. Colecta de muestras

Se realizaron cuatro salidas de campo a Los Islotes a lo largo de un ciclo reproductivo entre julio de 2018 y abril de 2019 (Fig. 3). Los meses de muestreo se seleccionaron de tal manera que coincidieran con los eventos del ciclo reproductivo esta especie, es decir, después de que ocurrieron los partos de la temporada, al final de la implantación retardada, en el inicio del segundo trimestre de gestación, y cuando llegan machos territoriales a la colonia y la gestación es avanzada (Tabla 1). En cada salida de campo se colectaron heces recién depositadas de lobos marinos, de acuerdo con la metodología descrita abajo. Para definir la fecha exacta de colecta, además de considerar los eventos del ciclo reproductivo antes mencionados, se consultó el calendario de mareas de CICESE, (<http://predmar.cicese.mx/calendarios/>) el cual indica en qué momento del mes se presenta la marea baja. Con ello se tuvo oportunidad de recorrer el área de estudio y tomar las muestras.

Los viajes de campo a la colonia se realizaron, en 2018, los días 14 de julio y 14 de octubre; los muestreos de 2019 se llevaron a cabo el 1 de febrero y el 14 de abril cerca de medio día. Se colectó la parte interior de 15 heces recién depositadas en cada viaje de campo, en el área que comprende la zona “A” por ser de fácil acceso

y la más expuesta a la interacción con turistas (Anexo I, Fig. 17). Cada muestra fue guardada en bolsas de plástico, con el fin de permanecer el menor tiempo posible cerca de los animales y evitar perturbarlos. Posteriormente, cada muestra fue transferida a un tubo criovial de 4 mL para ser almacenada en un tanque con nitrógeno líquido hasta llegar al laboratorio. El protocolo completo para la colecta de muestras puede consultarse en el Anexo I.

Tabla 1. Acontecimientos relevantes en el ciclo reproductivo de la especie *Zalophus Californianus*

Mes	Acontecimiento	Fuente	Fecha de colecta
Julio	Temporada reproductiva: Todos los partos han ocurrido, las cópulas están en proceso.	García-Aguilar y Auriolos-Gamboa, 2003a	14 julio 2018
Octubre	Termina implantación retardada e inicia gestación. Machos migran hacia otras colonias.	Boyd, 1991	14 octubre 2018
Febrero	La gestación lleva tres meses, la lactancia inició. Incremento de machos adultos y subadultos en Los Islotes	Auriolos et al., 1983	1 febrero 2019
Abril	Menor interacción madre-cría, las crías son más independientes y el embarazo es avanzado.	Melin et al., 2000	14 abril 2019

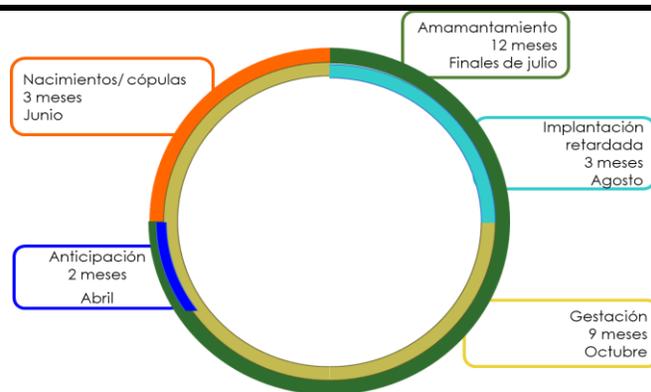


Ilustración 3. Representación del ciclo reproductivo anual del lobo marino de California en Los Islotes, bahía de La Paz, B. C. S., México. En cada recuadro se señala el tiempo que toma cada evento y el mes en el que inicia.

6. 3. Ensayos inmunoenzimáticos para la cuantificación hormonal

Los inmunoensayos son métodos bioanalíticos en los que una reacción antígeno-anticuerpo permite la cuantificación de un analito, el cual actúa como antígeno y se une al anticuerpo, cuando estos reactivos se mezclan e incuban se forma un complejo inmune. En el análisis se mide la actividad del marcador, que en el caso de los ensayos inmunoenzimáticos es una enzima. Se construye una curva estándar de calibración al correr el ensayo con diluciones seriales de la hormona o analito de interés en una concentración conocida. La señal es medida por medio de un cambio en la coloración en función de la concentración del analito no marcado en la muestra. La concentración de analito desconocida se determina a partir de la curva estándar de calibración (Darwish, 2006).

6. 4. Extracción de esteroides de la fase sólida

Previo a la cuantificación de las hormonas en heces por medio de ensayos inmunoenzimáticos (EIA), es necesario extraer los esteroides de la fase sólida. Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Marina de CICIMAR, IPN. Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el protocolo de extracción de esteroides en sólidos del proveedor de los kits para ensayos inmunoenzimáticos, Arbor Assays® (Michigan, EE. UU) para la posterior cuantificación hormonal. Brevemente, las muestras fueron liofilizadas y pulverizadas, se resuspendieron 0.2 g de cada una en 2 mL de etanol al 90%, y fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se evaporó con nitrógeno gaseoso y el precipitado se resuspendió en una solución amortiguadora proporcionada en el kit para continuar con la cuantificación. Para mayores detalles, ver la traducción del protocolo de extracción de esteroides de fase sólida en el Anexo II.

6. 5. Validación de los ensayos inmunoenzimáticos para las hormonas esteroideas

Debido a que es la primera vez que se cuantifican las hormonas testosterona, estradiol, progesterona y cortisol en heces de lobo marino de California por medio de ensayos inmunoenzimáticos, fue necesario hacer las pruebas de validación para cada hormona. La validación se compone de dos pruebas, el paralelismo y la precisión (Sattler y Polasek, 2017). Estas pruebas permiten conocer si la

sensibilidad del ensayo hace posible la cuantificación precisa de la concentración hormonal en una matriz de interés (Burgess et al., 2016). La sensibilidad se define como la menor cantidad de analito que puede ser detectado en el ensayo (López-Cobá y Montes-Pérez, 2016); está determinada por la afinidad de unión del anticuerpo con el antígeno (analito de interés; Arkin et al., 2012) y por la especificidad, la cual es la capacidad de los reactivos del ensayo para distinguir el analito de interés (Tu y Bennett, 2017).

La prueba de paralelismo muestra si la unión del anticuerpo en la mezcla de los extractos de esteroides de las muestras de estudio y la curva estándar de la hormona de interés son lo suficientemente similares para permitir la determinación del analito en las muestras diluidas. Las diluciones de la mezcla de extractos esteroides de las muestras también fueron útiles para identificar el factor de dilución requerido para la cuantificación hormonal en las muestras (Tu y Bennett, 2017). Mientras que la prueba de precisión permitió conocer qué cantidad del analito de interés se une al anticuerpo al comparar la concentración observada de la hormona de interés y la concentración esperada a partir de los diferentes puntos de la curva estándar (Chen et al., 2017).

6. 5. 1. Prueba de paralelismo

Se elaboró una prueba de paralelismo por cada hormona evaluada. Para ello, se prepararon la curva estándar de calibración (CE) y la mezcla de extractos (ME). La CE se conforma de diluciones seriales del estándar de la hormona de concentración conocida contenido en el kit para cada hormona. La ME se elaboró a partir de la mezcla de 25 μ L de los extractos de las muestras de tres salidas de campo ($n = 45$) que, posteriormente, se diluyó de manera serial 1:2 V:V hasta alcanzar la dilución 1:16. Así, la concentración en cada dilución equivale a la mitad de la dilución que le antecede (Fig. 4). Las diluciones seriales de la ME y de la CE se elaboraron con solución amortiguadora de trabajo contenida también en cada kit para los ensayos inmunoenzimáticos.

Una vez obtenidas las diluciones seriales requeridas para la ME y la CE de cada hormona, se corrió el respectivo ensayo de acuerdo con las instrucciones del

proveedor. Las diluciones de la ME y la CE de la hormona se corrieron por duplicado en la placa, se añadieron los reactivos necesarios para generar el conjugado con la hormona de interés y generar una reacción colorimétrica que depende de la concentración del analito a cuantificar. Las densidades ópticas de cada pozo fueron leídas para obtener las absorbancias para cada dilución de la CE y la ME.

Para conocer el paralelismo, se graficaron de las absorbancias obtenidas en el eje de las ordenadas, con el logaritmo de las concentraciones conocidas de la CE en el eje de las abscisas (Chen et al., 2017). Posteriormente, se generaron los respectivos modelos de regresión lineal de las diluciones de la ME y la CE. Finalmente, se compararon las pendientes de la ME y la CE por medio de una ANCOVA. Se asume paralelismo cuando no existen diferencias significativas entre las pendientes (Chen et al., 2017).

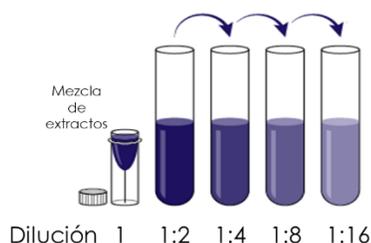


Figura 4. Representación de las diluciones seriales aplicadas en la mezcla de extractos (ME)

6. 5. 2. Prueba de precisión

Para evaluar la precisión de cada ensayo se generaron modelos de regresión lineal en los que se relacionó la concentración esperada de acuerdo con las diluciones del estándar de la hormona de interés para formar la CE y la concentración observada resultante de incorporar 25 μ L de la ME sin diluir a 25 μ L de cada estándar de hormona de concentración conocida que conforma la CE. Se eliminaron del análisis los puntos identificados como puntos palanca (*bad leverage points*), es decir, aquellos que modifican la tendencia del grupo de datos, para obtener un mejor ajuste del modelo. Se consideraron como valores aceptables de precisión una $r^2 > 0.90$ y pendiente con un rango de 0.7 a 1.3 (Hunt et al., 2017).

6. 5. 3. Factor de dilución de las muestras para la cuantificación hormonal

Cuando se cuantifican las hormonas esteroideas por primera vez en determinada matriz, como en este caso las heces de *Z. californianus*, se desconoce si la concentración hormonal en las muestras es superior a la que se puede cuantificar en el ensayo. Por esta razón, se llevaron a cabo diluciones seriales de la ME y se identificó si las muestras podían ser diluidas para que su concentración estuviera dentro del rango que abarca la CE (Andreasson et al., 2015). Se comparó la concentración de cada punto de la CE con la concentración de las diluciones seriales de la ME para cada hormona. Se determinó como el factor de dilución para la cuantificación hormonal, aquella dilución cuya concentración coincidiera con la concentración de los puntos estándar 3 o 4 de la CE de la hormona de interés, la cual se compone de cinco puntos en el caso del estradiol, y de siete para la testosterona, progesterona y cortisol.

6. 6. Cuantificación hormonal

La cuantificación hormonal se realizó a partir de los extractos obtenidos de las muestras fecales en el Laboratorio de Estrés Oxidativo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C. Se determinó la concentración de testosterona, estradiol, progesterona y cortisol, por medio de un ensayo inmunoenzimático (EIA). Se utilizaron kits comerciales de la marca Arbor Assays® (Michigan, EE. UU.), con los números de catálogo: K030-H1, K025-H1, K032-H1, K003-H1W. Estos kits han sido validados para la cuantificación hormonal en diferentes matrices y especies como: grasa subcutánea de lobo marino de California (Beaulieu-McCoy et al., 2017); vapor de respiración de cetáceos (Burgess et al., 2016); grasa subcutánea (Champagne et al., 2016), suero y heces de delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*; Champagne et al., 2018) y en barbas de ballena boreal (*Balaena mysticetus*; Hunt et al., 2014).

Antes de iniciar el ensayo para la cuantificación, las muestras fueron diluidas según con el factor de dilución elegido para cada hormona. Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y cada muestra fue corrida por duplicado. Las absorbancias se obtuvieron por medio de un lector de microplacas Multiskan™ de la marca Thermo Scientific™ y el cálculo de la concentración se

obtuvo por medio del ajuste de los valores de absorbancia de los puntos de la curva estándar de concentración conocida a la curva logística de cuatro parámetros para formar la curva de calibración, con el software libre del fabricante disponible en la página: <https://www.myassays.com/home.aspx>

6. 7. Análisis estadísticos

Para identificar si los valores de concentración de las muestras para cada hormona se ajustaron a una distribución normal, se realizó la prueba Kolmogorov-Sminov con ajuste de Lilliefors. En esta prueba la hipótesis nula es que los datos provienen de una población con distribución normal. Si el nivel de significancia es menor que 0.05, la distribución no es normal; si es mayor que 0.05 la distribución es normal (Romero-Saldaña, 2016).

Con la finalidad de evaluar la variación en la concentración hormonal a lo largo del año, se compararon los promedios de concentración de cada hormona entre los meses de muestreo con la prueba Kruskal Wallis. Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn con nivel de significancia de 0.05 para determinar las diferencias significativas entre meses, debido a que se presentaron grupos con diferente número de observaciones (Zar, 2010). En estas pruebas no se consideraron los datos atípicos extremos, definidos como, aquellos que resultaron mayores al tercer cuartil más tres veces el rango intercuartil del conjunto de los valores de las concentraciones de cada hormona (Amón-Uribe y Jiménez-Ramírez, 2009).

Los valores de concentración fueron transformados a porcentajes en cada muestra para eliminar la variabilidad interindividual en la concentración de todas las hormonas, y poder distinguir un patrón entre los niveles de cada una en las muestras. Se consideró como 100% la suma de la concentración de las cuatro hormonas y se despejó la contribución de cada una, de manera que resultara posible distinguir tendencias en la secreción hormonal de acuerdo con la temporada del ciclo reproductivo. Todas las muestras fueron transformadas, pues a pesar de que algunos valores resultaran ser datos atípicos, representan los requerimientos fisiológicos específicos del animal al que pertenecen.

6. 8. Identificación del sexo

La testosterona y el estradiol son hormonas asociadas con los caracteres sexuales secundarios de machos y hembras, respectivamente (Goymann y Wingfield, 2014); la progesterona incrementa durante el embarazo. Mientras que el cortisol está involucrado en la respuesta inmune, metabolismo de lípidos (Peck et al., 2016) y forma parte de la respuesta al estrés (Beaulieu-McCoy et al., 2017), se desconoce la tendencia que puede tener esta hormona en cada sexo. Es por ello que, para conocer el sexo y la condición de los individuos, se analizaron los datos en los que únicamente se consideraron las concentraciones de testosterona, estradiol y progesterona en cada muestra.

Para lo anterior, se transformaron los valores de concentración de las hormonas a porcentajes en cada muestra, se asignó como 100% a la suma de la concentración de las tres hormonas para identificar patrones en el requerimiento hormonal en cada muestreo y eliminar la variabilidad interindividual.

Adicionalmente, con los valores de concentración hormonal de cada muestra sin transformar, se llevó a cabo un análisis estadístico exploratorio multivariado no-paramétrico por medio del análisis de componentes principales (ACP), se consideraron los valores de las cargas o *factor loadings*, es decir, el peso de cada variable en el componente con la finalidad de distinguir qué hormona ejerce más influencia en cada muestra. Además, se aplicó un análisis de agrupamientos o *cluster* en el que se consideraron las concentraciones de las cuatro hormonas en cada muestra, para distinguir las muestras que más se separan entre sí y relacionarlas al sexo, como a la condición de las hembras. Para ello, se utilizó el método de vínculo de Ward con la medida de disimilitud de Bray-Curtis. Para los cálculos de ambos análisis se utilizó el paquete Vegan (Oksanen et al., 2014) de la plataforma R (R Development Core Team, 2015). En el análisis de agrupamientos se identificó el número de grupos óptimos para interpretarlos con base en los descriptores utilizados y el contexto del problema analizado. Con el fin de incorporar objetividad a las posibles agrupaciones, se implementaron 24 índices por medio de la aplicación del paquete *Nbclust* (Charrad et al., 2014) del programa R (R Development Core Team, 2015).

También se sumó la concentración de las tres hormonas en todas las muestras y se agruparon por mes, para comparar si la secreción de todas incrementa en la temporada reproductiva como se ha indicado para el lobo de iberia (*Canis lupus signatus*; Barja et al., 2008). También se obtuvo la relación testosterona:estradiol (T:E) a partir de la división de la concentración de las parejas de hormonas para evidenciar la magnitud con la que varía la concentración de una hormona con respecto a la otra y posteriormente, encontrar un patrón que permitiera discriminar muestras de hembras y machos (Lanyon et al., 2005).

6. 9. Análisis de cosinor

Para describir la oscilación anual que puede presentar cada hormona en esta colonia, se realizó un análisis de cosinor. Este análisis, utiliza el método de mínimos cuadrados para establecer la representación de la oscilación en la curva coseno que mejor se ajusta a los datos en un período determinado. El análisis asume que el proceso de estudio es un ciclo determinístico sinusoidal cuyos parámetros son: periodo, tiempo que toma un ciclo, acrofase, momento en que ocurre el valor máximo en el ciclo y amplitud, la medida del alcance del cambio predecible dentro de un ciclo (equivale a la mitad de la altura que separa un valor máximo del mínimo a lo largo del ciclo; Lentz, 1990). Para que se considere que existe oscilación la amplitud debe ser diferente de cero (Cornelissen, 2014).

El análisis se realizó en la plataforma R (R Development Core Team, 2015). Se consideró que el valor de un ciclo es 12, pues el ciclo reproductivo se completa en doce meses y cada mes de muestreo representa un punto temporal dentro del ciclo. Con este análisis se puede predecir el mes en el que se espera la mayor concentración para cada hormona a partir de la acrofase en el ciclo, la amplitud presenta relación directa con el ajuste del modelo, el ajuste perfecto tiene valor 1 y no se incluyeron los datos atípicos del total de muestras por hormona.

Para identificar un relación entre el fotoperiodo y el ciclo reproductivo similar a la ya descrita por (Temte y Temte, 1993) en lobo marino de California a partir de la concentración de hormonas esteroideas en heces, donde la implantación retardada se asocia con el decremento del fotoperiodo y el incremento en los niveles de

progesterona (Temte y Temte, 1993). Se compararon los resultados de las acrofases predichas con el análisis de cosinor y el fotoperiodo a lo largo del año en la región de La Paz, B.C.S. Los datos de salida y puesta del sol para obtener la duración del día se obtuvieron de la página https://salidaypuestadelosol.com/mexico/la_paz_14438.html.

7. RESULTADOS

Se realizaron cuatro salidas de campo a la lobera, en cada una se recolectaron 15 heces recién depositadas de lobo marino para un total de 60 muestras del estudio. Los viajes de campo a la colonia para la colecta de muestras se realizaron en 2018, los días 14 de julio y 14 de octubre; en 2019 se llevaron a cabo el 1 de febrero y el 14 de abril cerca de medio día.

7. 1. Validación del inmunoensayo para cuantificación de hormonas esteroideas en heces de lobo marino de California

Se validaron los ensayos inmunoenzimáticos para proceder con la cuantificación de las hormonas testosterona, estradiol, progesterona y cortisol por medio de las pruebas de paralelismo y precisión.

7. 1. 1. Prueba de paralelismo

Los resultados de las pruebas de paralelismo entre la ME y la CE para cada hormona evaluada se presentan en la figura 5. La comparación estadística de las pendientes de los modelos para ME y CE por medio de un ANCOVA generó las siguientes probabilidades para cada hormona: testosterona $p = 0.202$, estradiol $p = 0.185$, progesterona $p = 0.0001$ y cortisol $p = 0.006$ (Tabla 2). Por lo que la testosterona y el estradiol si presentaron paralelismo. En el caso de la progesterona, el modelo lineal de la ME mostró pendiente poco evidente -0.02 y la pendiente para CE fue -0.35 , esto puede deberse a que el ensayo es sensible a otros progestágenos además de la progesterona. Finalmente, las pendientes que corresponden al cortisol interceptaron en los puntos de menor concentración y las pendientes fueron -0.6 y -0.3 para la ME y CE, respectivamente.

Tabla 2. Comparación de las pendientes de los modelos lineales para la ME y la Ce.

Hormona	Pendiente ME	Pendiente CE	ANCOVA p =
Testosterona	-0.49	-0.59	0.202
Estradiol	-0.15	-0.20	0.185
Progesterona	-0.02	-0.35	0.0001
Cortisol	-0.64	-0.36	0.006

7. 1. 2. Prueba de precisión

Los resultados de la prueba de precisión para cada hormona analizada se presentan en la figura 6. La afinidad del anticuerpo por el analito de interés es perceptible, pues la concentración del analito incrementó conforme aumentó la concentración del estándar añadido para todas las hormonas, excepto para progesterona ya que, su coeficiente de determinación fue menor de 0.9.

La testosterona y el estradiol mostraron resultados aceptables para ambas pruebas de validación, el cortisol presentó exactitud aceptable y la progesterona no cumplió las características para aprobar la validación. Sin embargo, debido a que la señal de absorbancia de la ME para todas las hormonas mostró incremento al ser diluida de manera serial, y a que los resultados de precisión para cuantificación de testosterona, estradiol y cortisol presentaron un ajuste elevado, se consideró que el uso de estos kits es válido para la cuantificación de testosterona, estradiol, progesterona y cortisol en extractos de heces de lobo marino de California.

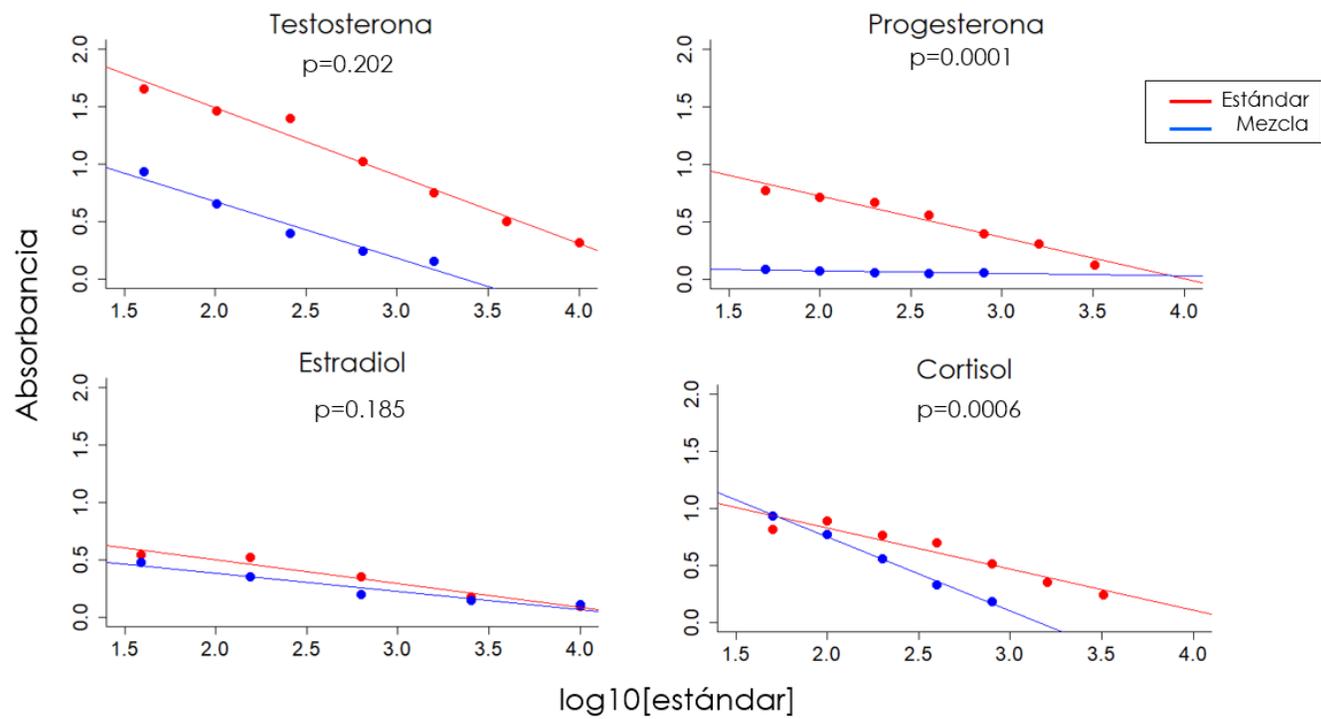


Figura 5. Prueba de paralelismo con los modelos de regresión lineal para la ME y CE de cada hormona.

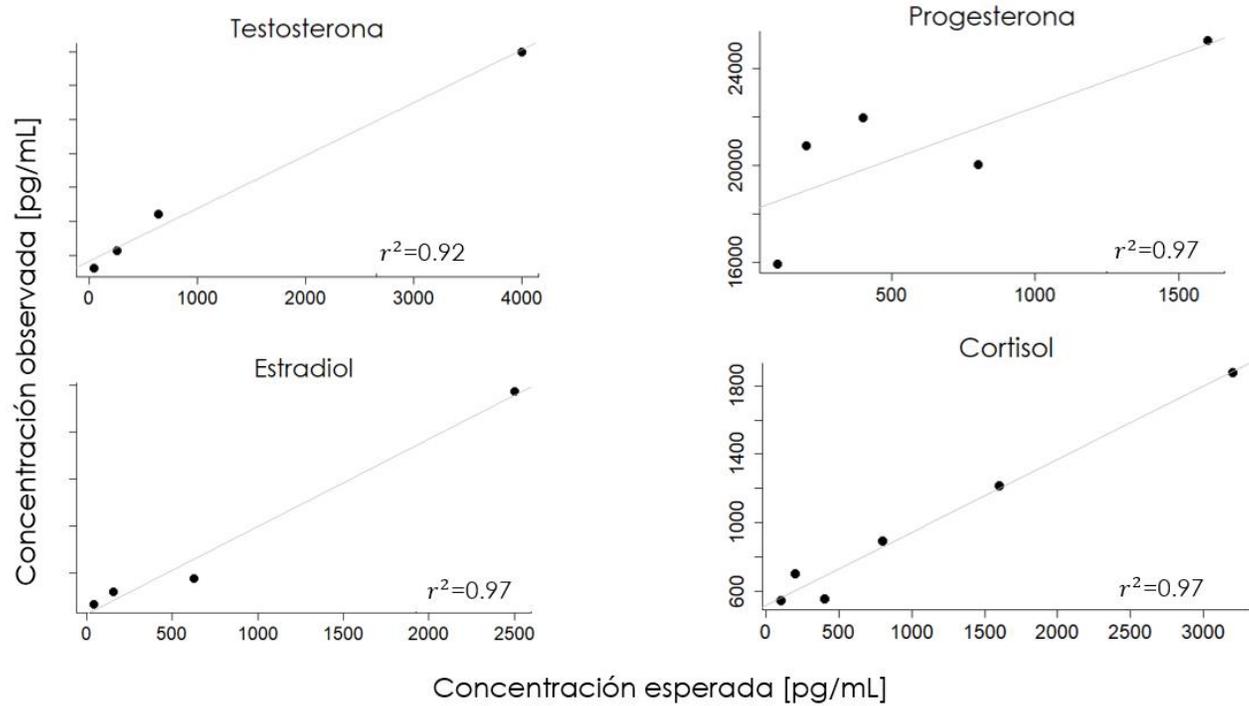
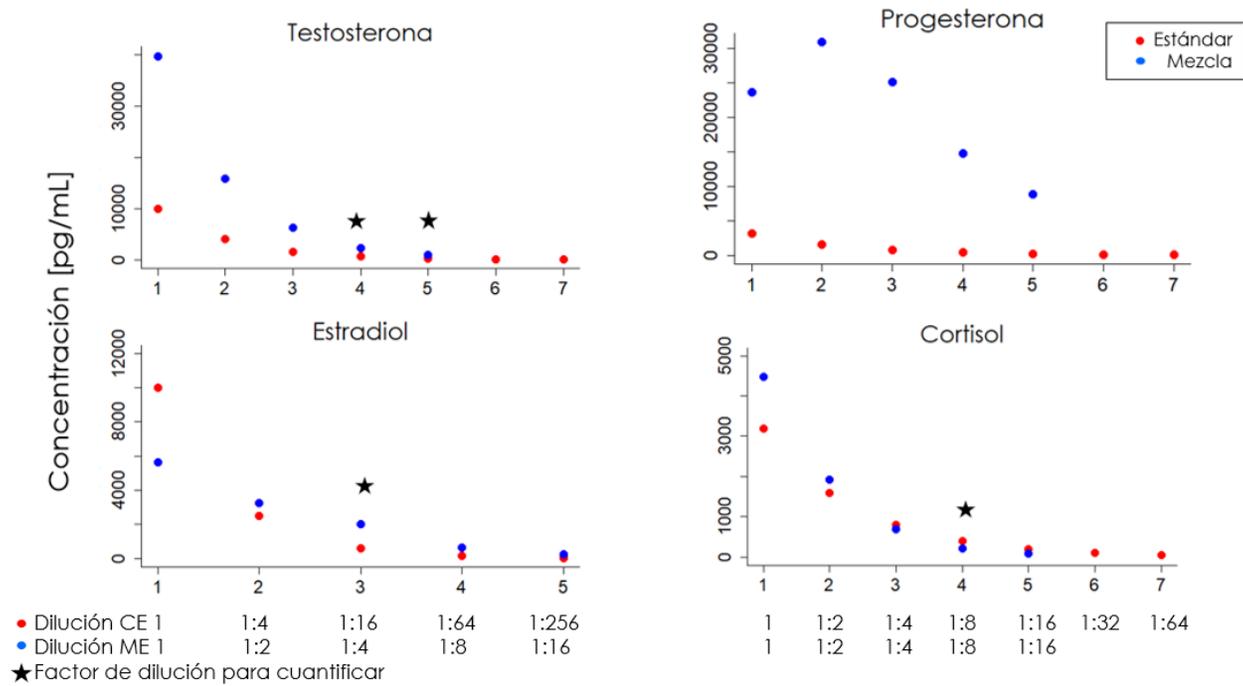


Figura 6. Modelos de regresión lineal entre las concentraciones esperadas de acuerdo con la CE y las observadas de la ME más las diferentes concentraciones de CE de cada hormona analizada.

7. 2. Factor de dilución para la cuantificación hormonal de las muestras

Los resultados de las diluciones seriales de la ME se presentan en la figura 7. La dilución de la mezcla de extractos que se aproximó a la concentración de los puntos 3 y 4 de la curva estándar de calibración (el punto intermedio de concentración de dicha curva) fue diferente para cada hormona.

En el caso de la testosterona, las diluciones que corresponden a la dilución serial 1:8 y 1:16 se aproximaron a la concentración intermedia de la CE. Por ello, se decidió diluir las muestras 1:10 para la cuantificación de esta hormona. Para el estradiol, la ME sin diluir presentó una concentración más baja que el límite superior de la CE y el resto de las diluciones presentaron valores de concentración similares a los de la CE, por lo que se decidió diluir las muestras 1:4 para su cuantificación. Mientras que, se observa que la concentración de la dilución 1:16 para progesterona fue notablemente elevada comparada con el punto de mayor concentración de CE; se decidió utilizar la dilución 1:60 en las muestras para que entraran en el rango al que es sensible el ensayo. El cortisol presentó valores similares en las diluciones seriales de la ME y la CE. Se decidió utilizar el factor de dilución 1:8 para cuantificar esta hormona en las muestras.



Diluciones seriales

Figura 7. Concentración hormonal cuantificada por factor de dilución de la curva estándar (CE) y mezcla de extractos (ME). Los asteriscos señalan la dilución de ME que tiene la una concentración cercana a los estándares 3 y 4 de CE.

7. 3. Concentración hormonal

Los resultados de la concentración promedio de testosterona, estradiol progesterona y cortisol en heces de lobo marino de California se presentan en la tabla 3. Las concentraciones promedio de testosterona ($1,1502 \pm 1410.3 \text{ pg mL}^{-1}$), estradiol ($4,685.8 \pm 514.3 \text{ pg mL}^{-1}$) y cortisol ($1817.2 \pm 256.8 \text{ pg mL}^{-1}$) en heces de lobo marino de California en Los Islotes fueron menores que la concentración promedio de progesterona ($105,195 \pm 19539.3 \text{ pg mL}^{-1}$; Fig. 8).

Las curvas estándar y los valores de los coeficientes inter e intraensayo se muestran en la tabla 4. De las 60 muestras que se colectaron para este estudio, seis (10%) quedaron por encima del límite superior de detección de la curva estándar del ensayo de cortisol y una más (1.7%) quedó fuera del espectro para el ensayo de progesterona, a pesar de que todas fueron diluidas.

Tabla 3. Rangos y promedios de la concentración de hormonas esteroideas en heces de lobo marino de California en Los Islotes, sin considerar los datos atípicos extremos.

Hormona	Rango pg mL^{-1}	Promedio pg mL^{-1}	Error estándar	n	Sin cuantificar	Datos atípicos
Testosterona	745.6-51360	11502	1410.3	57	0	3
Estradiol	456.4-18900	4685.8	514.3	59	0	1
Progesterona	1223-535300	105195	19539.3	56	1	3
Cortisol	240.3-9699	1817.2	256.8	45	6	9

Tabla 4. Rango de la curva estándar de cada kit comercial y coeficientes de variación estimados para los ensayos EIA realizados.

Hormona	Rango de la CE pg mL^{-1}	CV intraensayo %	CV interensayo %	Muestras no cuantificadas	
				concentrada	diluida
Testosterona	40.96-10000	8.9-18.7	12.9	0	0
Estradiol	39.06-10000	9.8-13.5	12.26	0	0
Progesterona	50-3200	11.4-21.5	16.1	0	1
Cortisol	50-3200	18.9-31.6	27.16	2	4

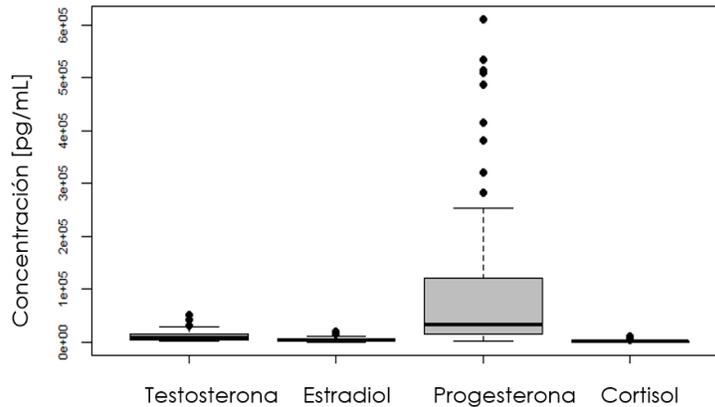


Ilustración 8. Concentración promedio de hormonas esteroideas cuantificadas en heces de lobo marino de California en Los Islotes, B.C.S., México. Los datos atípicos extremos no fueron incluidos en esta gráfica.

En la prueba de Kolmogorov-Smirnov con ajuste de Lillefors, el valor de probabilidad de la concentración de todas las hormonas siempre fue menor de 0.05, lo que indica que la distribución de los datos no es normal (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de probabilidad de la prueba Klmogorov-Smirnov con ajuste de Lillefors.

Hormona	Valor de p	Tipo de distribución
Testosterona	0.000207	No normal
Estradiol	0.000397	No normal
Progesterona	3.863e-13	No normal
Cortisol	8.308e-11	No normal

De acuerdo con la prueba de Kruskall-Wallys, el valor promedio de todas las hormonas, excepto cortisol, difirió significativamente entre los meses de muestreo (Fig. 9). Los resultados de la prueba post-hoc de Dunn con nivel de significancia de 0.05 señalaron, que la testosterona presentó diferencias entre julio ($6374 \pm 917.67 \text{ pg mL}^{-1}$) y octubre ($14860 \pm 334.30 \text{ pg mL}^{-1}$; $p= 0.04$). Para el estradiol, la concentración de febrero ($2285.32 \pm 581 \text{ pg mL}^{-1}$) fue diferente de la de abril ($6724 \pm 1382.26 \text{ pg mL}^{-1}$) y octubre ($6291 \pm 997 \text{ pg mL}^{-1}$; $p = 0.001$). La concentración promedio de progesterona en octubre ($228192 \pm 547272 \text{ pg mL}^{-1}$) fue diferente de

la medida en abril (29746 ± 8971 pg mL⁻¹) y julio (34835 ± 7336.782 pg mL⁻¹, $p = 0.002$).

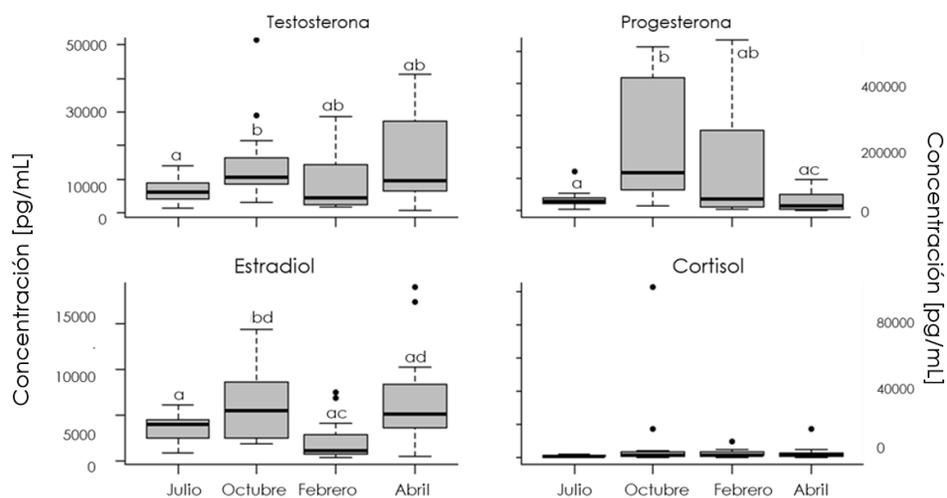


Figura 9. Concentraciones hormonales promedio en heces de lobo marino de California durante los meses de muestreo en Los Islotes, B.C.S., México.

En la figura se observan los valores de concentración transformados a porcentajes en cada muestra (Tabla 6, Fig. 10). En la tabla 4, se observa que la cuantificación de cortisol fue imposible de detectar en 6 muestras y en una más no se pudo cuantificar progesterona, por lo que 7 muestras no fueron consideradas en esta parte, pues no se tenían los porcentajes de las 4 hormonas. Por lo anterior, los datos presentados corresponden a la información de 53 muestras, de las 60 que fueron colectadas (Tabla 6).

Tabla 6. Rangos de la proporción de hormonas detectada en las muestras de heces de lobo marino de California en Los Islotes. (ee, error estándar).

Hormona	Rango %		Promedio	ee	n	Datos atípicos
	Mínimo	Máximo				
Testosterona	0.28	97.87	19.37	2.77	53	0
Estradiol	0.01	35.26	7.34	1.07	53	0
Progesterona	2.15	89.64	62.72	4.02	53	0
Cortisol	0.02	84.46	10.57	2.86	53	0

La proporción de testosterona fue mayor que la de estradiol en 50 de las 53 muestras consideradas, con promedios de 19% y 7%, respectivamente. El mayor promedio en la proporción de ambas hormonas se presentó en abril con 37% para testosterona y 15% para estradiol y el menor promedio en la proporción se observó en octubre con 8% para testosterona y en febrero con 2% para estradiol. El cortisol se presentó en proporciones menores a 7% en todos los muestreos excepto en julio, cuando la proporción promedio alcanzó el 24%. El mes en el que se observó mayor proporción de progesterona fue octubre con 83% y el mes con menor proporción fue abril con 43% (Fig. 10).

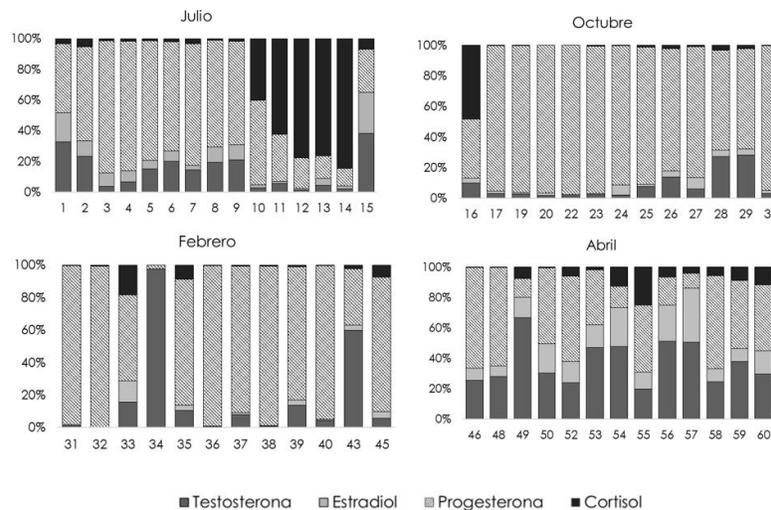


Figura 10. Proporción de hormonas esteroideas en cada muestra, agrupadas por mes de muestreo.

7. 4. Identificación del sexo del animal al que pertenecen las muestras

La transformación a proporciones de las cuatro hormonas cuantificadas en heces no arrojó información suficiente por sí sola para identificar el sexo de los lobos marinos, pues la concentración de progesterona siempre fue mayor que el resto de las hormonas. Al transformar a porcentajes la concentración únicamente de testosterona, estradiol y progesterona tampoco fue posible identificar con certeza las muestras de hembras y de machos (Fig. 11).

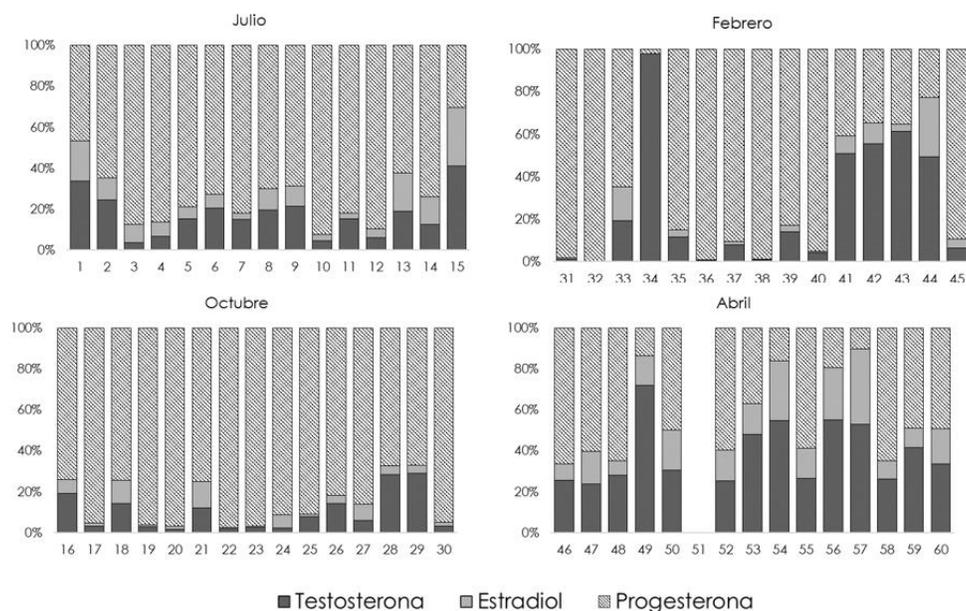


Figura 11. Proporción de hormonas sexuales en cada muestra, agrupadas por mes de muestreo. La información para la muestra 51 no se presenta, pues la progesterona en dicha muestra no pudo ser cuantificada.

Cuando se consideraron únicamente la testosterona, estradiol y progesterona, el rango de valor porcentual que exhibió cada hormona fue diferente; el estradiol es la hormona que se presentó en menor proporción y la progesterona se encontró en una mayor proporción en las muestras (Tabla 7).

Tabla 7. Rangos de la proporción de hormonas detectada en heces de lobo marino de California en Los Islotes (ee, error estándar).

Hormona	Rango %		Promedio	ee	n	Sin cuantificar	Datos atípicos
	Mínimo	Máximo					
Testosterona	0.29	97.84	23.26	2.730	60	0	0
Estradiol	0.01	39.97256	9.579	1.19	60	0	0
Progesterona	2.15	99.63	68.30	3.404	59	1	0

El ACP, generó tres componentes principales, de los cuales, el primero explicó 42% de la variabilidad de los datos y el segundo explicó 34%. Los valores de carga para el primer componente principal fueron: progesterona 1.71, estradiol 1.59 y

testosterona 0.42, para el segundo componente principal los valores de carga fueron: testosterona -1.97, estradiol 0.75, progesterona -0.21. No se distinguieron patrones en el agrupamiento de los datos. Sin embargo, se observó un grupo de muestras asociado hacia la progesterona y en menor medida, al estradiol. Únicamente una muestra se separó del grupo, se encuentra asociada a la testosterona y se caracteriza por presentar la mayor concentración de dicha hormona en comparación con el resto de las muestras (Fig. 12).

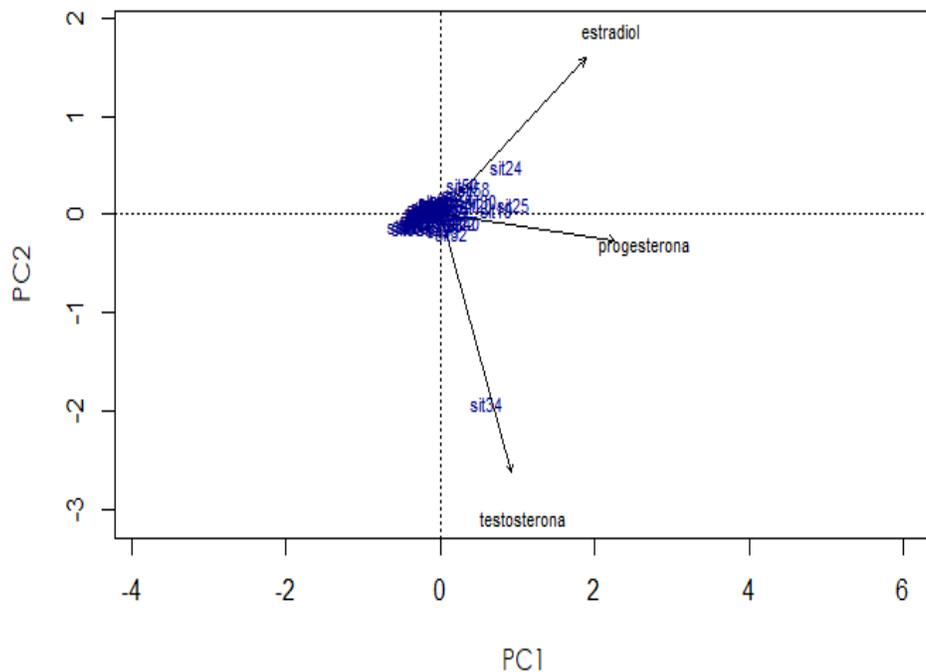


Figura 12. Representación biespacial de los dos primeros componentes principales generados por el ACP. Las claves representan a cada muestra y las líneas los vectores generados para cada hormona.

De acuerdo con el análisis de *cluster* con distancias de Bray Curtis, se identificaron cinco grupos con 13 de los 24 índices utilizados para definir el número de grupos (Fig. 13). No se observó en el dendrograma un patrón que permitiera distinguir las muestras que podrían pertenecer a hembras o machos, sin embargo, fue posible hacer inferencias de acuerdo con la dinámica de la población en la lobera. El grupo 1 contiene las muestras 34 y 49, las cuales presentaron las concentraciones más elevadas de testosterona de todos los muestreos y podrían pertenecer a muestras de machos, el número tan bajo de muestras en este grupo tiene sentido, pues es la

categoría menos abundante en la lobera. El grupo 2 se conforma por las muestras que presentaron los valores más elevados de estradiol, esos valores no superaron los de la testosterona y la concentración de progesterona no fue elevada como las muestras que conforman el grupo 5, por lo que podría tratarse de hembras en la condición de estro o simplemente hembras. El grupo 3 caracterizó porque las muestras presentaron mayor concentración de testosterona que de estradiol y, la progesterona, no es elevada como en el grupo 5, por lo que definitivamente se puede inferir que se trata de hembras que no se encuentran en estro y probablemente se encuentran en alguna fase de la gestación. Para el grupo 4 la concentración de testosterona y estradiol fue similar y la progesterona es menor que en el grupo 5 por lo que puede tratarse de hembras en la fase final de la gestación. Finalmente, el grupo 5 se conformó por las muestras con mayor progesterona de todo el estudio, y en este grupo no se presentaron muestras del mes de abril, cuando la gestación está por culminar, por lo que es probable que se trate de muestras de hembras preñadas en los primeros meses de gestación.

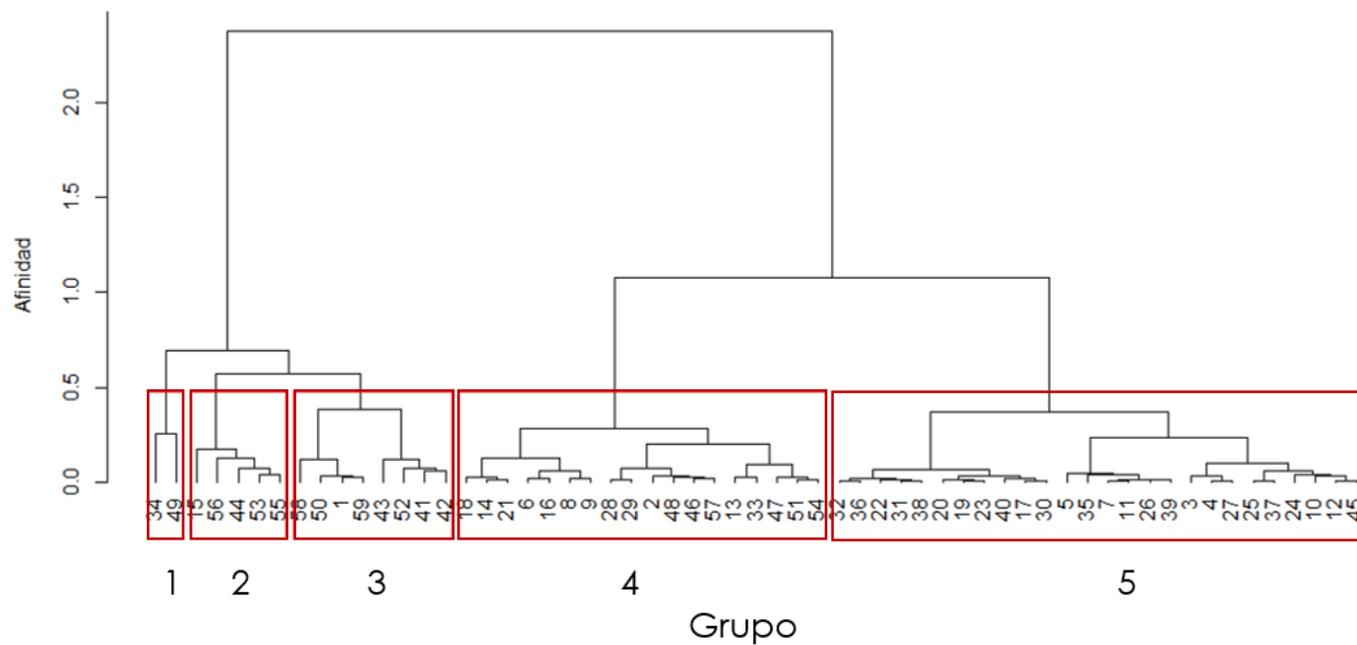


Figura 13. Análisis de cluster para los valores hormonales en heces de lobo marino de California. Se distinguen 5 grupos, grupo 1 muestras con mayor concentración de testosterona respecto a las horas hormonales. Grupo 5 muestras con mayor proporción de progesterona de todo el estudio. Los grupos intermedios presentan mayor asociación con estradiol y menor con progesterona.

7. 5. Razón testosterona estradiol (T:E)

Para la razón testosterona:estradiol (T:E; Fig. 14), se observa que únicamente 7% de las muestras de julio y 7% de octubre presentan valores casi cuatro veces más elevados de estradiol que de testosterona. Mientras que 13% de las muestras de febrero presentan valores de estradiol casi imperceptibles, comparados con los de testosterona. En el resto del total de muestras la concentración de estradiol no dobla la de testosterona y no es posible establecer un patrón o tendencia asociada con el mes de muestreo.

7. 6. Oscilación anual

La oscilación anual, así como los parámetros amplitud y acrofase fueron diferentes para cada hormona (Tabla 8, Fig. 15). Los análisis para testosterona y estradiol presentaron las acrofases más bajas, esto sugiere que a lo largo del ciclo la concentración de estas hormonas en heces no varía tanto como en el caso del cortisol y la progesterona. Las acrofases se presentaron en enero y septiembre, para testosterona y estradiol, respectivamente. La progesterona y el cortisol mostraron amplitudes más elevadas que la testosterona y el estradiol, pues sus valores máximos y mínimos están lo suficientemente separados para definir una amplitud cercana a 1 (Tabla 8). De acuerdo con el modelo, una oscilación es similar para progesterona y cortisol, con acrofases en octubre y en noviembre, respectivamente. La amplitud en el análisis de todas las hormonas siempre fue diferente de cero, es decir, que si existe un cambio en la variable a través del tiempo y por lo tanto, es un ritmo (Cornelissen, 2014).

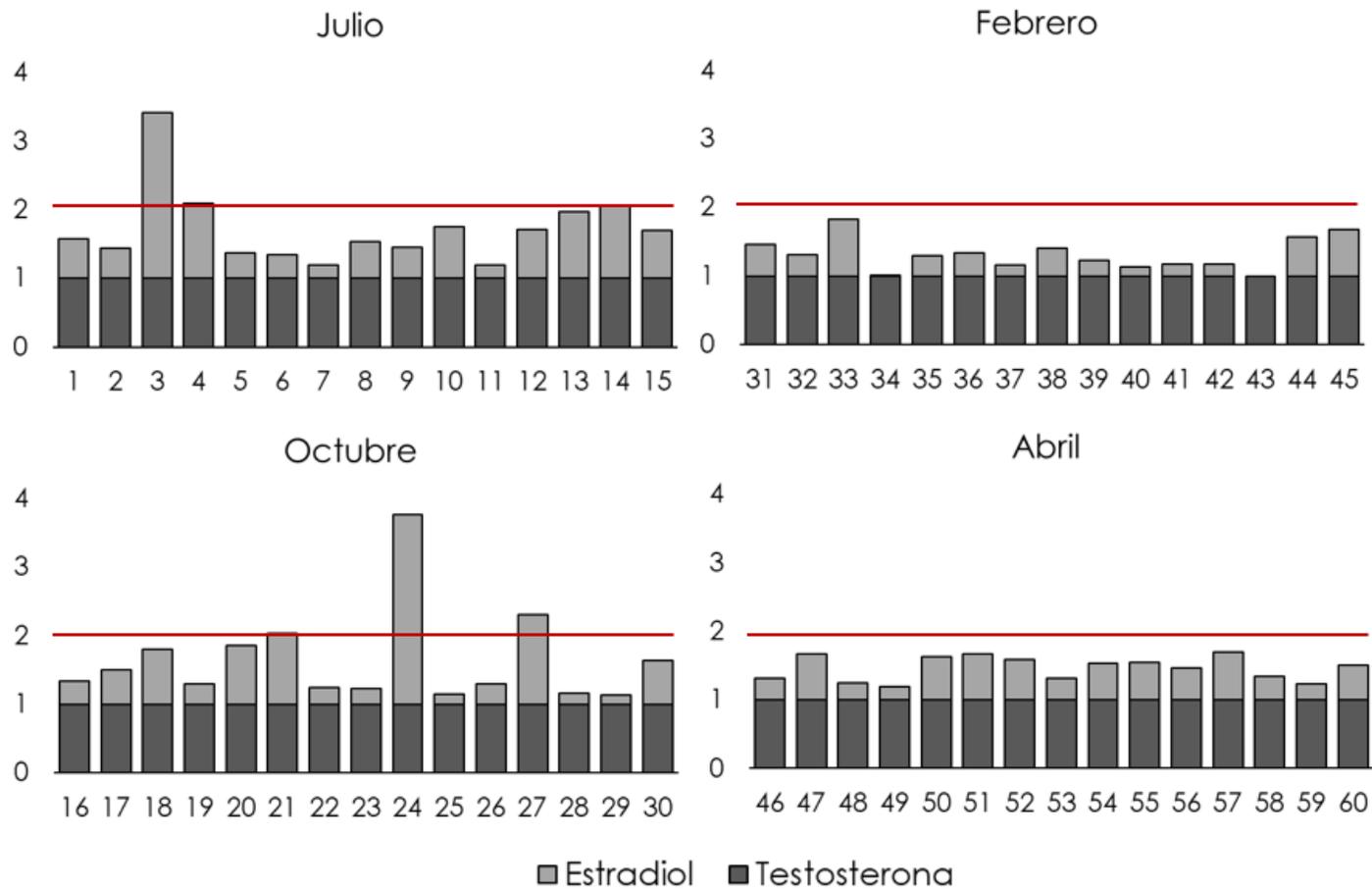


Figura 14. Razón testosterona:estradiol por muestra, agrupados por mes.

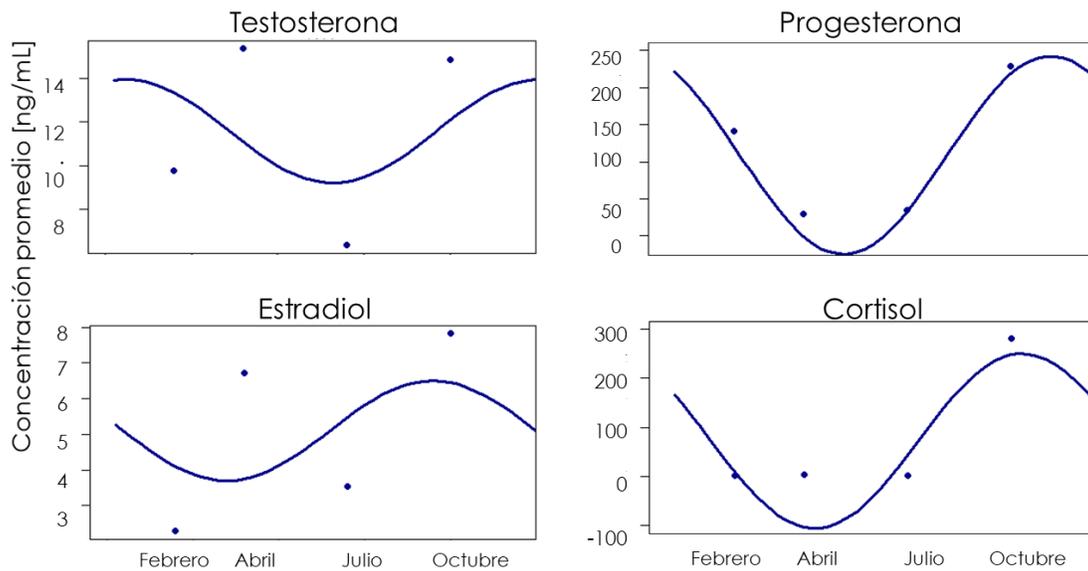


Figura 15. Oscilación anual de cada hormona.

Tabla 8. Parámetros del análisis de cosinor para cada hormona

	Testosterona	Estradiol	Progesterona	Cortisol
Amplitud	0.38	0.38	1	0.9
Ajuste	0.38	0.38	0.99	0.91
Acrofase	0.59	9.48	11.16	10.35
Mayor valor	Enero	Septiembre	Noviembre	Octubre

Las horas de luz y oscuridad del fotoperiodo, obtenidas en las fechas exactas de cada muestreo, se muestran en la figura 16. Se observa que el fotoperiodo es menor en octubre y febrero, meses en los que se presentan los mayores valores para progesterona.

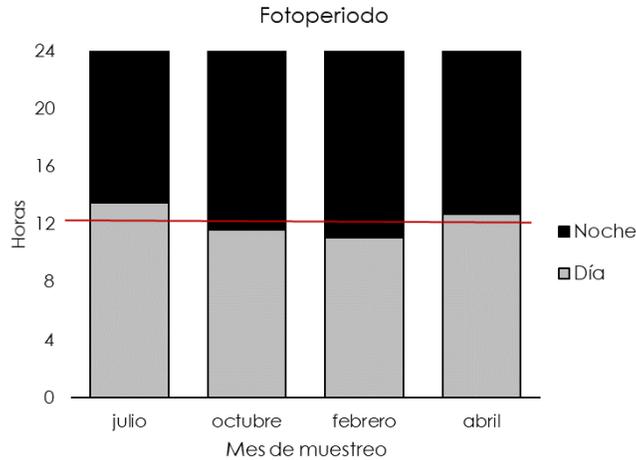


Figura 16. Fotoperiodo en la ciudad de La Paz por mes de muestreo.

8. Discusión

8. 1. Validación del inmunoensayo para la cuantificación de hormonas esteroideas en heces de lobo marino de California

La validación presentó resultados aprobatorios para testosterona y estradiol en las pruebas de paralelismo y precisión. En el caso de la progesterona, el paralelismo no fue evidente debido a la elevada concentración de la hormona en la mezcla de extractos y también posiblemente a que el ensayo presenta elevada reactividad cruzada (reacción entre un antígeno y un anticuerpo que fue generado contra un antígeno con estructura similar) con otros progestágenos como 3β -hidroxy-progesterona (172%) y 3α -hidroxy-progesterona (188%). Sin embargo, sólo una muestra quedó fuera del rango de sensibilidad del ensayo durante la cuantificación, por lo que se consideró que éste es apto para la cuantificación de progesterona en heces de *Z. californianus*. Cabe señalar que, el ensayo es multiespecífico y ha sido utilizado con éxito en vapor de respiración de cetáceos (Burgess et al., 2016) y en barbas de ballena boreal (Hunt et al., 2014). El cortisol, aprobó la precisión con un coeficiente de determinación del modelo de regresión de 0.97, mayor al resto de las hormonas.

Debido a que los kits utilizados para los ensayos inmunoenzimáticos son sensibles a concentraciones $\sim 50 \text{ pg mL}^{-1}$ de cada hormona, es posible utilizar factores de

dilución que aseguren la cuantificación de las hormonas de interés a pesar de tener una concentración mayor de lo que es sensible la curva estándar. Una vez seleccionado el factor de dilución apropiado para cada hormona, fue posible cuantificar su concentración en todas las muestras. En el ensayo de progesterona se utilizó un factor de dilución 60, y la cuantificación se llevó a cabo con éxito en 98% de las muestras. La elevada concentración de progesterona cuantificada en este estudio pudiera deberse a la sensibilidad del ensayo a los progestágenos antes mencionados y a que el anticuerpo es policlonal, es decir que es probable que además de la progesterona otros metabolitos reaccionen con el anticuerpo del ensayo. Con respecto a la cuantificación del cortisol, el 10% de las muestras quedaron fuera del límite de detección del ensayo, dos por su alta concentración y las cuatro restantes presentaron baja concentración, es decir, estaban demasiado diluidas. Por lo tanto, es recomendable utilizar un factor de dilución menor para asegurar la cuantificación de la mayoría de las muestras.

La variabilidad interindividual en la concentración de cortisol es mayor que la del resto, pues de los 54 datos disponibles para cortisol, nueve resultaron ser datos atípicos. Esta variabilidad puede ser consecuencia de que la hormona está involucrada en diversos aspectos distintos a la reproducción. Por ejemplo, encabeza la respuesta al estrés en mamíferos marinos (Romero y Butler, 2007) y regula la gluconeogénesis al promover la movilización de los ácidos grasos de los tejidos adiposos periféricos (Atkinson et al., 2015). El sexo de los animales también influye en los niveles de cortisol registrados (revisado en Atkinson, 2004).

Cabe mencionar que cinco de los datos atípicos corresponden a muestras con elevada concentración de cortisol en julio, y se sabe que esta hormona es necesaria para la movilización de lípidos y, por lo tanto, favorece la producción de leche rica en grasa, en consecuencia, las concentraciones circulantes de cortisol pueden estar asociadas con la producción de leche. Por ejemplo, las hembras lactantes de foca de Gronelandia (*Phoca groenlandica*) presentan el doble de concentración de cortisol que las hembras que no se encuentran en tal condición (Gardiner y Hall, 1997). Por lo tanto, es posible que la elevada concentración de cortisol observada en el lobo marino de California durante julio se deba a hembras acabaran de parir y

se encontraban amamantando. El amamantamiento en el lobo marino de California es intenso durante los primeros días de nacidas las crías y el destete es gradual (García-Aguilar y Aurióles-Gamboa, 2003b).

La afinidad de cada ensayo por la hormona de interés en este estudio es confiable. Gracias al proceso de validación de los kits comerciales empleados se ha establecido el factor de dilución adecuado para la cuantificación de testosterona, estradiol, progesterona y cortisol a partir de heces en el lobo marino de California.

8. 2. Cuantificación hormonal

Al comparar los promedios de concentración de cada hormona, se observa que la concentración de progesterona y cortisol fue mucho más elevada que la de testosterona y estradiol. Además de los requerimientos fisiológicos de los animales, el metabolismo de excreción para cada hormona puede afectar su concentración en diferentes matrices, como se ha demostrado para otros mamíferos, donde las hormonas pueden excretarse principalmente en orina o heces, con diferencias específicas para cada especie. Por ejemplo, en hembras de mono ardilla (*Saimiri sciureus*) se ha reportado que la progesterona y el estradiol se excretan principalmente en heces con porcentajes de 67% y 75%, respectivamente, y el resto se excreta por medio de la orina (Moorman et al., 2002). En hembras de babuino (*Papio cynocephalus*) la proporción de esteroides excretados en heces, en comparación con orina, es de 40% para progesterona y 10% para estradiol (Wasser et al., 1994). En hembras de lobo de crin (*Chrysocyon brachyurus*) 67% de la progesterona y 95% del estradiol se excreta en heces (Velloso et al., 1998). Para la chinchilla (*Chinchilla lanígera*), la testosterona se excreta 85% en orina y 15% en heces (Busso et al., 2005). La testosterona en machos de lobo de crin se excreta 97% en heces (Velloso et al., 1998). La información sobre las tasas de excreción se desconoce para el lobo marino de California.

Además, es posible que los valores de las hormonas en suero se vean reflejados en heces con diferente ventana de tiempo para cada hormona como demostraron Moorman y colaboradores (2002), quienes compararon la excreción de estradiol y progesterona de hembras de mono ardilla en heces después de la inyección de

estas hormonas, se observó un pico de excreción para estradiol a las 16 horas y para progesterona a las 8 horas.

Los valores máximos reportados por (Greig et al., 2007) en el lobo marino de California para progesterona se presentaron en los meses que corresponden al inicio de la gestación con $76.51 \pm 7.04 \text{ ng mL}^{-1}$ en hembras no preñadas y $7.42 \pm 1.51 \text{ ng mL}^{-1}$ en hembras preñadas, los valores mínimos se presentaron al final de la gestación con $0.34 \pm 0.01 \text{ ng mL}^{-1}$ en no preñadas y $2.14 \pm 0.16 \text{ ng mL}^{-1}$ en hembras preñadas. Para estradiol, los valores máximos se obtuvieron a la mitad de la gestación en las hembras preñadas con $2.35 \pm 0.61 \text{ ng mL}^{-1}$ y los mínimos también en hembras preñadas en la gestación tardía $0.92 \pm 0.06 \text{ ng mL}^{-1}$.

Pedernera-Romano y colaboradores en 2010 reportaron para crías de Los Islotes, valores de cortisol en suero de 74.18 ± 25.73 después de ser capturados y de $80.10 \pm 0.17 \text{ ng mL}^{-1}$ en una muestra posterior de los mismos sujetos. Los rangos de los valores obtenidos para todas las hormonas en este estudio: testosterona ($0.7456 - 5.136 \text{ ng mL}^{-1}$); estradiol ($.4564 - 18.900 \text{ ng mL}^{-1}$); progesterona ($1.223 - 535.3 \text{ ng mL}^{-1}$) y cortisol ($0.240 - 9.699 \text{ ng mL}^{-1}$) superan los ya reportados en suero para esta especie, posiblemente porque las hormonas esteroideas excretadas por medio de las heces son una señal integrada de la hormona circulante en el individuo (Hunt et al., 2019).

8. 3. Variación hormonal con relación al ciclo reproductivo

La concentración promedio de cada hormona presentó variaciones en los muestreos que se llevaron a cabo a lo largo del año y se presentaron diferencias significativas entre meses para todas las hormonas, excepto para cortisol. Se observaron los mayores valores de testosterona y estradiol en el muestreo de abril y de progesterona en octubre. Es posible que estas diferencias en la concentración de las hormonas esteroideas a lo largo del año reflejen los requerimientos específicos de los animales en las diferentes fases del ciclo reproductivo.

La testosterona y el estradiol, además de desencadenar la expresión de caracteres sexuales secundarios en machos y hembras, respectivamente (Goymann y Wingfield, 2014), están relacionadas con la búsqueda de pareja y la cópula (Sattler

y Polasek, 2017). Los valores más elevados para estas hormonas en heces de lobo marino de California se *presentaron* en abril y no durante la temporada reproductiva, es probable que el incremento en la secreción de estas hormonas desencadene modificaciones en la conducta, como el incremento en las vocalizaciones del lobo marino Australiano durante la temporada reproductiva (Tripovich et al., 2009) y fisiología de los animales, como el incremento en la espermatogénesis en el elefante marino del sur (*Mirounga leonina*), que son evidentes hasta la temporada reproductiva.

El muestreo de julio, se realizó cuando recién habían nacido las crías de la temporada de 2018 y las hembras aún no se encontraban receptivas a los machos, debido a que entran en estro 21 días después del parto (García-Aguilar y Auriolles-Gamboa, 2003a), por lo que posiblemente los copros muestreados eran de hembras no receptivas y por ello no se encontró la elevación de estradiol. Lo mismo ocurre en la foca de puerto (*Phoca vitulina*), cuyas hembras receptivas presentan un incremento de estradiol en suero, 25 días después de haber dado a luz (Reijnders, 1990).

En el presente trabajo la mayor concentración de testosterona se presentó en abril y la de cortisol en julio. El incremento de testosterona previo a la temporada reproductiva ha sido identificado en otras especies de pinnípedos como la foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*), en la que después de un incremento en la testosterona, se presenta un incremento en el cortisol, lo que sugiere que la conducta territorial durante la temporada reproductiva es mediada por el cortisol (revisado en Atkinson, 2004). Únicamente las muestras identificadas con el número 34 y 49 (concentraciones de $11520000 \text{ pg mL}^{-1}$ y 27370 pg mL^{-1}), correspondientes al muestreo de febrero y abril, respectivamente, presentaron concentraciones de testosterona tan elevadas como para segregarse en el análisis de *cluster* y sugerir que pertenecen a machos. Lo cual es coincidente con la dinámica poblacional descrita para la lobera, donde se señala que en invierno están presentes machos subadultos provenientes de otras colonias y antes de iniciar la temporada reproductiva los machos adultos arriban para establecer territorios (Auriolles et al., 1983; Elorriaga-Verplancken et al., 2018).

Es poco probable que el incremento en el promedio de la concentración de testosterona en heces en abril corresponda a valores de machos, ya que, durante la temporada reproductiva en Los Islotes, los machos patrullan constantemente su territorio acuático y defecan en el agua (Heath, 1989). También se sabe que durante la temporada reproductiva los machos de otras especies, como el lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaki*) no defecan, ya que se mantienen en ayuno para defender su territorio y maximizar su éxito reproductivo (Pörschmann et al., 2010). Además las hembras adultas son la categoría de edad más abundante en la lopera, representan el 50% de la población en primavera (Maravilla-Chávez et al., 2006), seguidas de las crías con 2% y el resto son juveniles, por lo que se considera que los copros colectados en la colonia corresponden a hembras adultas. Los copros de las crías son pequeños y de color mostaza (Hernández-Camacho, obs pers). Metabólicamente, en mamíferos la testosterona es un precursor del estradiol (Gesquiere et al., 2014), existen receptores de andrógenos en los tejidos periféricos y neurales de las hembras, lo cual sugiere que el efecto de la testosterona en su conducta va más allá de la conversión de testosterona a estradiol. La testosterona también actúa en la formación de hueso y la densidad mineral ósea de las hembras de mamíferos (Gesquiere et al., 2014).

La temporada reproductiva en Los Islotes culmina en agosto, con las cópulas (Nieto-García, 2014). En consecuencia, la diapausa embrionaria termina en octubre e inicia la gestación. Esto puede contribuir a que en los muestreos de octubre, febrero y abril se observaran los mayores valores promedio de progesterona en comparación con aquellos en julio. Los resultados del presente estudio sugieren que la concentración de progesterona a lo largo del ciclo reproductivo no se mantiene constante y disminuye cuando la gestación está por llegar a su fin, como se ha reportado para la foca de puerto (Sattler y Polasek, 2017).

El mayor valor promedio de progesterona en el presente estudio se registró en el muestro de octubre, mes en que termina la implantación retardada debido a que las cópulas se observan al final de la temporada de nacimientos y terminan a mediados de agosto (García-Aguilar y Auriol-Gamboa, 2003a). Estos resultados coinciden con lo descrito anteriormente para muestras de suero de esta especie y en el lobo

fino del norte (*Callorhinus ursinus*), donde existe incremento de progesterona al final de la implantación retardada (Greig et al., 2007). La implantación del blastocito en el lobo fino del norte es coincidente con el acortamiento del fotoperiodo (Temte y Temte, 1993), como se observó en los resultados de este estudio. Se ha propuesto que el fin de la implantación retardada está influenciado por la melatonina (Temte y Temte, 1993), hormona cuya secreción presenta cambios estacionales e incrementa durante los días cortos. Otra especie cuya reproducción es influenciada por el fotoperiodo es la foca de puerto, pues los días cortos retrasan y los días largos adelantan el estro (Boyd, 1991). La melatonina se secreta durante la oscuridad, por lo que su secreción disminuye durante los días largos (Atkinson, 2014). La temporada de nacimientos en Los Islotes reportada por (García-Aguilar y Auriol-Gamboa, 2003a) es coincidente con los días largos, cuyo fotoperiodo puede consultarse en la figura 15.

Los resultados del presente estudio son comparables con la información disponible sobre los niveles hormonales en el ciclo reproductivo en pinnípedos, donde se señala un incremento de testosterona en plasma previo a la temporada reproductiva para: foca capuchina; revisado en Atkinson y Gilmartin, 1992; elefante marino del sur; revisado en Boyd, 1991. Incremento de estradiol en suero durante el estro y después de la implantación del blastocito en la foca de puerto (Reijnders, 1990), lobo marino de California (Greig et al., 2007) e incremento de progesterona en suero sin diferencias entre las preñadas y no preñadas al final de la diapausa embrionaria también en el lobo marino de California (Greig et al., 2007).

8. 4. Proporción de cada hormona en las muestras

En la mayoría de las muestras fecales de lobo marino de California se encontraron proporciones más bajas de estradiol, testosterona y cortisol, comparados con las de progesterona. El lobo marino de California es una especie con dimorfismo sexual y los niveles elevados de testosterona en estas especies son característicos de los machos, aunque en las hembras se reportan niveles detectables de esta hormona (Goymann y Wingfield, 2014). La similitud entre las bajas proporciones de estradiol,

testosterona y cortisol comparados con las proporciones de progesterona sugiere que su principal vía de excreción es la orina, como se ha reportado para otros mamíferos como el mono ardilla (*Saimiri sciureus*; Moorman et al., 2002) y la chinchilla (*Chinchilla lanigera*; Busso et al., 2005).

En el presente estudio, la proporción de progesterona en heces de lobo marino de California presentó un aporte superior al 62% en tres de los muestreos, en el muestreo de julio el aporte fue de 53%. Además, la progesterona siempre fue mayor comparada con la proporción de estradiol, que presentó promedios de 2 a 14%. Debido a que los individuos de la colonia principalmente son hembras reproductivas, es muy probable que la mayoría de las muestras pertenezcan a hembras adultas. Sin embargo, no se puede asegurar que estén preñadas, pues se ha reportado incremento en los valores séricos de esta hormona en hembras sin distinción entre las preñadas y las no preñadas, y a lo largo de la gestación, con los valores máximos durante el segundo trimestre (Greig et al., 2007; Sattler y Polasek, 2017). Además, en el lobo amelenado (*Chrysocyon brachyurus*), todas las hembras, aunque no estén preñadas presentan más progesterona que estradiol en heces (Velloso et al., 1998).

El cortisol presentó una proporción superior al 20% en 33% de las muestras de julio y 7% de las muestras de octubre. Esta hormona participa en diferentes eventos fisiológicos en pinnípedos como respuesta a eventos de demanda energética consecuencia del ayuno estacional (Kershaw y Hall, 2016), al desafío con inyección de hormona adrenocorticotrópica, la cual promueve su secreción (Hunt et al., 2004) y a eventos estresantes (Beaulieu-McCoy et al., 2017) que en crías de *Z. californianus* pueden ser causados por la manipulación (Pedernera-Romano et al., 2010) o por el limitado cuidado materno (Labrada-Martagón et al., 2007). Por ello, es posible que la elevada proporción de esta hormona en varias muestras en el presente estudio se deba a la temporada reproductiva en las muestras de julio, como se ha reportado para lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*; Hunt et al., 2004) o una variable diferente de la reproducción, como estrés a causa de la densidad poblacional o la disponibilidad de alimento (Hunt et al., 2004). Cabe

destacar que las muestras con elevado cortisol no coinciden con las muestras con testosterona elevada en el ACP y posiblemente no pertenecen a machos.

8. 5. Oscilación anual de las hormonas

Hasta ahora se ha identificado una tendencia a la variación en la concentración y proporción de cada hormona varía o a lo largo del año. A partir de esta información fue posible aplicar un método numérico que ayudó a establecer un posible patrón de concentración para testosterona, estradiol, progesterona y cortisol a lo largo de un ciclo reproductivo. La oscilación anual de las hormonas determinada a partir del análisis de cosinor sugiere la organización endógena requerida por los individuos para participar en eventos regulares, como la reproducción; además se ha reportado que la dinámica hormonal se ajusta a las señales ambientales cíclicas, que incluyen fotoperiodo, temperatura y disponibilidad de alimento (Helm et al., 2013).

La mayor amplitud en el análisis de cosinor se presentó para progesterona y cortisol, con valores de 0.9. Mientras que, la testosterona y estradiol presentaron valores de 0.38. Se asume que existe un ritmo cuando la amplitud es diferente de cero (Lentz, 1990) ya que refleja la magnitud con la que se presentan los cambios dentro del ciclo. Es decir que la oscilación de progesterona y cortisol a lo largo del año es más evidente que la de testosterona y estradiol.

La baja amplitud del modelo para testosterona y estradiol probablemente se debe a que los muestreos no coincidieron con los puntos anuales de mayor concentración de esas hormonas. Por ejemplo, en el elefante marino del sur (*Mirounga leonina*) la espermatogénesis inicia en agosto, un mes antes de la temporada reproductiva y termina en noviembre. Las concentraciones testiculares de testosterona son elevadas de julio a septiembre y la concentración plasmática de testosterona es alta sólo en septiembre (Griffiths, 1984). Debido a que la testosterona en heces es una señal integrada de su secreción en el organismo (Hunt et al., 2019), y se presenta antes de la temporada reproductiva para permitir los cambios que preparan a los machos como la espermatogénesis (Pomeroy, 2011), es probable que en el lobo marino de California el incremento estacional en la secreción de esta hormona sea previo a la temporada reproductiva, desde que establecen los territorios (García-

Aguilar y Auriolles-Gamboa, 2003a) como ocurre en el elefante marino del sur y como se ha reportado para el lobo marino de Nueva Zelanda, donde la testosterona se asocia con la conducta agresiva y territorial la cual es mayor en machos territoriales (Negro et al., 2010).

Se ha documentado en el elefante marino del sur el aumento en el diámetro de los tubos seminíferos asociado con la elevación en la concentración de testosterona, y como consecuencia, entre uno y tres meses después, se presenta un incremento en la espermatogénesis (Pomeroy, 2011). La acrofase para la testosterona se presentó, de acuerdo con el ajuste del modelo, en enero. Resultado similar a lo reportado en el ciclo anual del desarrollo y regresión testicular en el elefante marino del sur, en el que se ha observado un incremento en la actividad gonadal entre siete y ocho meses antes de la temporada reproductiva, y la testosterona en plasma incrementa cuatro meses antes de esta (revisado en Boyd, 1991). El incremento de testosterona en plasma también es evidente en Las focas monje de Hawái (*Monachus schauinslandi*) en cautiverio un mes antes de presentar comportamiento reproductivo (Atkinson y Gilmartin, 1992).

Se ha reportado que el estradiol en suero incrementa durante el estro y al momento de la implantación en el lobo marino de California (Greig et al., 2007), esto también se reportado para el lobo fino de Alaska (revisado en Greig et al., 2007). Es posible que en las hembras de lobo marino de California en Los Islotes aún no estaban receptivas, pues acababan de ocurrir los partos, y por ello no se presentó el incremento de estradiol, como se ha reportado pinnípedos (Boyd, 1991) y mamíferos en general (Asdell, 1946). La acrofase, es decir, el punto del ciclo en el que se espera el mayor valor, de estradiol se predijo en septiembre. Esto apoya la información disponible para la colonia, en la cual se señala que las hembras se encuentran receptivas 21 días después del parto (García-Aguilar y Auriolles-Gamboa, 2003).

Para cortisol, la acrofase se predijo en octubre, en el muestreo posterior a la temporada reproductiva. Existe evidencia de que los niveles de cortisol circulante incrementan después del incremento de testosterona en temporada reproductiva en

la foca de Weddell (revisado en Atkinson, 2004) y los niveles elevados de esta hormona afectan negativamente, el crecimiento, la reproducción y la respuesta del sistema inmune (revisado en Beaulieu-McCoy et al., 2017). Al ser una hormona con diferentes funciones, se desconoce la causa de la concentración elevada de cortisol en 33% de las muestras de julio y 7% muestras de octubre. A pesar de que en la colonia Los Islotes, la mayoría de los lobos marinos de California residentes son hembras en edad reproductiva y fieles al sitio de nacimiento (Maravilla-Chávez et al., 2006; Rayas-Estrada y Hernández-Camacho, 2019; Szteren et al., 2006; Szteren y Auriolles-Gamboa, 2011), existe una segregación por categorías de edad dentro del sitio (Adame et al., 2017). Por lo tanto, las muestras de este estudio pueden pertenecer a hembras y machos de diferentes categorías de edad.

La cuantificación de las hormonas por medio de las heces elimina la variación circadiana pues es la integración de la hormona secretada en las horas o días previos a la deposición (Hunt et al., 2019). Por lo que reflejan la tasa de producción de hormonas esteroideas, es decir, la secreción acumulativa y su excreción durante varias horas (Touma y Palme, 2005). A diferencia de las muestras de sangre, las muestras fecales se ven menos afectadas por fluctuaciones pulsátiles de la secreción hormonal (Touma y Palme, 2005) y pueden representar el estado hormonal de un animal con mayor precisión que una muestra de plasma (Touma y Palme, 2005). De esta manera, los valores las concentraciones hormonales promedio en cada muestreo resultan útiles para evaluar la variación en una escala anual en la colonia, a pesar de que no fue posible distinguir valores de cada hormona específicos para cada sexo.

Gracias a que todas las muestras presentaron cantidades detectables de las hormonas de interés y a la distribución temporal de los muestreos, se logró evidenciar variación endócrina durante del ciclo reproductivo del lobo marino de California a partir de heces. A pesar de las limitaciones para conocer el sexo y categoría de edad de los individuos, se sabe que la categoría de edad con mayor proporción de individuos durante todo el año son las hembras adultas, aunque la proporción de machos subadultos incrementa en invierno (Auriolles et al., 1983) y que las cópulas ocurren a mediados de agosto (García-Aguilar y Auriolles-Gamboa,

2003a), por lo que la diapausa embrionaria inicia en octubre. El patrón aquí descrito para la progesterona coincide con el patrón ya reportado para lobo marino de California en suero de hembras varadas y en cautiverio (Greig et al., 2007).

Los valores de progesterona registrados en heces podrían reflejar la concentración de la hormona circulante, como se reportó para el cortisol en el lobo marino de Steller en el desafío de ACTH, donde la elevación y decaimiento en la concentración de cortisol en suero presentó un patrón similar en suero y heces con un desfase temporal de varias horas (Hunt et al., 2004; Mashburn y Atkinson, 2004). Por ser ambos otáridos poligínicos y sexualmente dimórficos, se espera una tendencia en el lobo marino de California similar a la reportada para el lobo marino de Steller (Petrauskas et al., 2008)

Los valores de concentración hormonal para estradiol y testosterona, y la predicción del mes en el que se espera el valor máximo para estas hormonas, coinciden también con lo reportado anteriormente para otras especies de pinnípedos. Es probable que sus valores máximos se presenten en un momento diferente del que fueron muestreados. Como se mencionó anteriormente, la testosterona es un precursor metabólico del estradiol (Gesquiere et al., 2014), de manera que es probable que la testosterona cuantificada en las heces represente el metabolito antes de ser convertido a estradiol, y no necesariamente es la hormona con un papel sobre la fisiología del individuo y por esa razón, a pesar de que en la colonia la mayoría de los individuos son hembras, la mayoría de las muestras presentaron mayor proporción de testosterona que de estradiol.

Se ha propuesto que el fotoperiodo necesario para el inicio de la implantación retardada en el lobo marino de California es de 11.48 h luz a partir del monitoreo de las fechas de nacimiento de las crías (Temte y Temte, 1993). El fotoperiodo de octubre en La Paz es de menos de 12 horas, por lo que las concentraciones elevadas obtenidas para la progesterona en este proyecto se adecúan con lo reportado anteriormente para esta especie (Temte y Temte, 1993). La colonia de lobos marinos de California de Los Islotes (24° 58'N) es la más sureña en la distribución de lobo marino de California, a pesar de encontrarse en bajas latitudes

la reproducción de la colonia es sincronizada, aunque en menor medida comparada con la colonia Los Cantiles (29°53'N) ubicada al norte del golfo de California (García-Aguilar y Auriol-Gamboa, 2003a). Este patrón es similar a lo ya reportado para las especies que habitan zonas tropicales, donde las variaciones estacionales en el medio son menos predecibles que en altas latitudes y como consecuencia la temporada de nacimientos es prolongada (Boyd, 1991; Costa, 1991). Como la foca monje del Mediterráneo (*Monachus monachus*) cuya población más sureña habita a las orillas del Sahara (21° N; Aguilar et al., 2007) los partos ocurren entre mayo y noviembre con un pico en septiembre (Sergeant et al., 1978) mientras que las especies de altas latitudes la madre se mantiene con sus crías la primera semana después del parto e intercala los viajes de alimentación con el amamantamiento durante al menos cuatro meses como en el lobo marino antártico (*Arctocephalus gazella*; Costa, 1991b).

Las heces pueden representar una matriz efectiva para la cuantificación hormonal, y podrían utilizarse en el monitoreo endócrino con muestras seriales. Se asume que la variación particular en la concentración de testosterona, estradiol, progesterona y cortisol observada en las heces muestreadas en este estudio corresponde con los eventos descritos para esta especie dentro del ciclo reproductivo en la colonia. La colonia de Los Islotes ha sido la única colonia reproductora sin disminución en el crecimiento poblacional del golfo de California en las últimas décadas (Szteren et al., 2006). Se recomienda continuar con el monitoreo endócrino en el sitio, ya que los datos de densidad poblacional sugieren que la colonia ha llegado a su capacidad de carga (Hernández-Camacho, datos no publicados). La densidad poblacional está identificada como una causa de estrés (Meise et al., 2016), y el estrés crónico a largo plazo tiene efectos desfavorables en la fisiología de los animales pues inhibe la reproducción y suprime el sistema inmune (revisado en Beaulieu-McCoy et al., 2017).

8. 6. Identificación de sexo

En 54 de las 60 muestras se encontraron concentraciones más elevadas de testosterona comparada con el estradiol, similar a lo reportado por Lanyon y

colaboradores (2005) en heces de dugongo (*Dugon dugon*) de ambos sexos. Sin embargo, se esperaba observar muestras con concentraciones aún más elevadas de testosterona para la identificación de machos, ya que se ha propuesto que el dimorfismo sexual es un indicador del grado de competencia intrasexual, de manera que, el sexo superior en tamaño y en agresividad territorial experimenta mayor competencia intrasexual, que es reflejada en las concentraciones de testosterona (Goymann y Wingfield, 2014). Como ocurre con el lobo marino de California, especie con dimorfismo sexual, la agresividad entre machos incrementa durante la temporada reproductiva (Bartholomew, 1970).

En ausencia de valores hormonales para heces de individuos de sexo conocido, es poco confiable discriminar el sexo de los individuos en esta colonia a partir de la concentración hormonal. En el análisis de componentes principales únicamente se distinguen agrupaciones influenciadas por progesterona; hormona que presentó mayor concentración y proporción que el resto y posiblemente sesga la tendencia observada en el análisis.

El análisis de *cluster* señala grupos que por la cantidad de progesterona que presentan pueden tratarse de hembras preñadas con diferente tiempo de gestación, sin embargo, la variación de las otras hormonas a lo largo del año no brinda información suficiente para identificar cuáles muestras pertenecen a machos o hembras.

El aporte porcentual de testosterona y estradiol fue similar para la mayoría de las muestras. Se desconoce el porcentaje de excreción en heces de las hormonas evaluadas, ya que la excreción fecal de hormonas esteroides varía entre sexos y es específica para cada especie (Gesquiere et al., 2014). La asociación entre las muestras y las hormonas arroja información sobre la posible condición de embarazo a partir de las muestras con elevada progesterona en el muestreo de febrero, cuando las hembras preñadas han iniciado el segundo trimestre de gestación trimestre (Greig et al., 2007; Sattler y Polasek, 2017). En el lobo marino de Steller, los niveles elevados de estradiol se asocian con la receptividad (Sattler y Polasek, 2017). En el ACP se observaron pocas muestras asociadas con el estradiol, la

mayoría se asociaron con la progesterona. Esto apoya la idea de que las muestras con elevada progesterona pueden pertenecer a hembras preñadas y por lo tanto no receptivas (Asdell, 1946; Das Chagas et al., 2014; Pietraszek y Atkinson, 1994).

La progesterona al ser una hormona característica de la gestación (Atkinson, 2004) se presentó en mayor concentración en tres de los cuatro muestreos, que corresponden al final de la implantación retardada, inicio del segundo trimestre de gestación, y último trimestre de gestación del ciclo reproductivo descrito para el lobo marino de California en Los Islotes. Si la proporción de progesterona excretada en heces es mayor que la del resto de las hormonas evaluadas, como parece ser en los resultados de este estudio. Se dificulta la identificación de muestras asociadas con la testosterona o el estradiol y se limita la información que puede obtenerse a partir del análisis hormonal de las heces. No es posible identificar las muestras que pertenecen a machos a partir únicamente de la influencia de la testosterona.

En cuanto a la tasa de los valores de testosterona y estradiol en cada muestra, no se obtuvo información suficiente para discriminar entre sexos. Se requiere de la información de la concentración de otras hormonas como en el caso de los lobos terrestres (*Chrysocyon brachyurus*) en los que se cuantificaron testosterona, progesterona y estradiol en heces. Para identificar el sexo y detectar hembras preñadas, no se consideraron los valores de estradiol, utilizaron la relación de los valores de progesterona con los de testosterona (P:T) para diferenciar el sexo y detectar hembras preñadas, a partir de muestras de individuos de sexo conocido (Velloso et al., 1998).

Otra especie para la cual existe información endócrina a partir de excretas es el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*). A pesar de las diferencias en los valores de hormonas reproductivas en heces entre época reproductiva y no reproductiva en el venado, existe la posibilidad de no identificar correctamente el sexo de un individuo a pesar de que la tasa de cada metabolito establecida brinde resultados acertados la mayoría de las veces (López-Cobá y Montes-Pérez, 2016). Es decir que la evaluación de la condición y sexo de un animal a partir de valores puntuales de hormonas reproductivas en heces no es efectiva. Es necesario

identificar al animal o tomar muestras seriadas para conocer variaciones endocrinas representativas del ciclo reproductivo.

A pesar de que la identificación del sexo de los animales no fue posible a partir de los valores de concentración hormonal en las heces, la oscilación de cada hormona es congruente con los requerimientos de las hembras adultas en el ciclo reproductivo, además es la categoría de edad más abundante en la lobera. Excepto para cortisol, debido a que la información disponible para esta hormona sobre su variación en torno a eventos reproductivos es escasa. No obstante, la información sobre la dinámica poblacional en la lobera y el incremento de testosterona previo a la temporada reproductiva sustenta la aseveración de aquellas muestras consideradas de machos en este estudio.

9. Conclusiones

- La variación anual observada en estradiol y progesterona en heces presenta similitud con lo ya reportado para *Z. californianus* en muestras de suero y los rangos de concentración registrados en heces son más amplios que los reportados anteriormente para suero,
- Las heces son una matriz adecuada para la cuantificación de hormonas esteroideas en la especie *Z. californianus*.
- La concentración de testosterona, estradiol y progesterona presentó una oscilación anual particular que en conjunto sugieren respuestas fisiológicas ante modificaciones anatómicas y conductuales necesarias para la reproducción del lobo marino de California en los Islotes.
- La concentración de progesterona en heces de *Z. californianus* incrementa cuando el fotoperiodo se acorta en octubre y febrero.
- El estradiol y la testosterona se presentaron en mayor concentración previo a la temporada reproductiva, lo que sugiere anticipación fisiológica para la reproducción.
- El cortisol presentó variabilidad interindividual y su mayor concentración se presentó después de la temporada reproductiva. Por lo que es imposible asociarlo únicamente a eventos de estrés por la temporada reproductiva.

- El sexo y la condición de los individuos de *Zalophus californianus* no pudo ser establecido a partir de la cuantificación de testosterona, estradiol y progesterona por sí solas o a partir de la tasa de testosterona:estradiol, se requiere una validación de los niveles a partir de muestras de individuos de sexo conocido.

10. Recomendaciones

- Se recomienda contar con más muestreos a lo largo del año para obtener un mejor ajuste en los modelos del análisis de cosinor y tener una aproximación más certera de la variación anual de cada hormona, así como aumentar el tamaño de muestra.
- Se recomienda realizar la cuantificación y validación de hormonas esteroideas en suero y heces de individuos de sexo conocido para determinar los rangos esperados por sexo y la tasa de excreción de cada hormona.
- Para el futuro monitoreo de la colonia se recomienda utilizar kits con menor reactividad cruzada en la cuantificación de progesterona, para evitar la confusión de las posibles causas de los valores elevados.
- Con la finalidad de hacer inferencias más acertadas sobre la dinámica endócrina en la colonia es relevante la identificación del sexo de los animales para poder determinar los patrones específicos para hembras y machos.

11. Referencias

- Adame, K., Pardo, M. A., Salvadeo, C., Beier, E., & Elorriaga-Verplancken, F. R. (2017). Detectability and categorization of California sea lions using an unmanned aerial vehicle. *Marine Mammal Science*, 33(3), 913–925. <https://doi.org/10.1111/mms.12403>
- Aguilar, A., Cappozzo, L. H., Gazo, M., Pastor, T., Forcada, J., & Grau, E. (2007). Lactation and mother-pup behaviour in the Mediterranean monk seal *Monachus monachus*: An unusual pattern for a phocid. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(1), 93–99. <https://doi.org/10.1017/S0025315407056147>
- Amón-Urbe, I., & Jiménez-Ramírez, C. (2009). Hacia una metodología para la selección de técnicas de depuración de datos. *Revista Avances En Sistemas e Informática*, 6(1), 185–190.
- Andreasson, U., Perret-Liaudet, A., van Waalwijk van Doorn, L. J. C., Blennow, K., Chiasserini, D., Engelborghs, S., ... Teunissen, C. E. (2015). A practical guide to immunoassay method validation. *Frontiers in Neurology*, 6(Aug), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00179>
- Arkin, M. R., Glicksman, M. A., Fu, H., Havel, J., & Du, Y. (2012). Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats. In G. Sittampalam, A. Grossman, & K. Brimacombe (Eds.), *Assay Guidance Manual* (pp. 1–23). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
- Asdell, S. A. (1946). *Patterns of Mammalian Reproduction*. *Journal of Mammalogy* (Vol. 46). Comstock Publishing Co., Inc. <https://doi.org/10.2307/1377881>
- Atkinson, S. (2004). Reproductive biology of seals. *Reviews of Reproduction*, 2(3), 175–194. <https://doi.org/10.1530/revreprod/2.3.175>
- Atkinson, S., Crocker, D., Houser, D., & Mashburn, K. (2015). Stress physiology in marine mammals: how well do they fit the terrestrial model? *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 185(5), 463–486. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0901-0>
- Atkinson, S., & Gilmartin, W. G. (1992). Seasonal testosterone pattern in Hawaiian monk seals (*Monachus schauinslandi*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 96(1), 35–39. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960035>
- Atkinson, Shannon. (2014). *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, Second Edition*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* (Vol. 33). [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2002\)033\[0178:br\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2002)033[0178:br]2.0.co;2)
- Atkinson, Shannon, & Robbeck, T. (2001). *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine, Second Edition*. (L. A. Dierauf & F. Gulland, Eds.), *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* (2nd ed., Vol. 33). [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2002\)033\[0178:br\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2002)033[0178:br]2.0.co;2)

- Aurioles-Gamboa, D., & Zavala-González, A. (1994). Algunos factores ecológicos que determinan la distribución y abundancia del lobo marino *Zalophus californianus*, en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*, *20*, 535–553. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v20i4.976>
- Aurioles, D., Sinsel, F., Fox, C., Alvarado, E., & Maravilla, O. (1983). Winter Migration of Subadult Male California Sea Lions (*Zalophus californianus*) in the Southern Part of Baja California. *Journal of Mammalogy*, *64*(3), 513–518.
- Barja, I., Silván, G., Rosellini, S., Piñeiro, A., Illera, M. J., & Illera, J. C. (2008). Quantification of sexual steroid hormones in faeces of Iberian wolf (*Canis lupus signatus*): A non-invasive sex typing method. *Reproduction in Domestic Animals*, *43*(6), 701–707. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00974.x>
- Bartholomew, G. A. (1970). A model for the evolution of pinniped polygyny. *Evolution*, *24*(1), 546–559.
- Beaulieu-McCoy, N. E., Sherman, K. K., Trego, M. L., Crocker, D. E., & Kellar, N. M. (2017). Initial validation of blubber cortisol and progesterone as indicators of stress response and maturity in an otariid; the California sea lion (*Zalophus californianus*). *General and Comparative Endocrinology*, *252*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.003>
- Bohórquez-Herrera, J., Hernández-Camacho, C. J., Aurioles-Gamboa, D., & Cruz-Escalona, V. H. (2014). Plasticity in the agonistic behaviour of male California sea lions, *Zalophus californianus*. *Animal Behaviour*, *89*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.12.008>
- Boyd, I. (1991). Environmental and physiological factors controlling the reproductive cycles of pinnipeds. *Canadian Journal of Zoology*, *69*(5), 1135–1148. <https://doi.org/10.1139/z91-162>
- Boyd, I. ., Lockyer, C., & Marsh, H. D. (1993). *Cap. 6. Reproduction in Marine Mammals. Reproduction in marine mammals.*
- Burgess, E. A., Hunt, K. E., Kraus, S. D., & Rolland, R. M. (2016). Get the most out of blow hormones: Validation of sampling materials, field storage and extraction techniques for whale respiratory vapour samples. *Conservation Physiology*, *4*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/conphys/cow024>
- Busso, J. M., Ponzio, M. F., Dabbene, V., De Cuneo, M. F., & Ruiz, R. D. (2005). Assessment of urine and fecal testosterone metabolite excretion in Chinchilla lanigera males. *Animal Reproduction Science*, *86*(3–4), 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.08.001>
- Cassini, M. H. (1999). The evolution of reproductive systems in pinnipeds. *Behavioral Ecology*, *10*(5), 612–616.
- Champagne, C. D., Kellar, N. M., Crocker, D. E., Wasser, S. K., Booth, R. K., Trego, M. L., & Houser, D. S. (2016). Blubber cortisol qualitatively reflects circulating cortisol concentrations in bottlenose dolphins. *Marine Mammal*

- Science*, 33(1), 134–153. <https://doi.org/10.1111/mms.12352>
- Champagne, C. D., Kellar, N. M., Trego, M. L., Delehanty, B., Boonstra, R., Wasser, S. K., ... Houser, D. S. (2018). Comprehensive endocrine response to acute stress in the bottlenose dolphin from serum, blubber, and feces. *General and Comparative Endocrinology*, 266(May), 178–193. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.015>
- Charrad, M., Ghazzali, N., Boiteau, V., & Niknafs, A. (2014). Nbclust: An R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *Journal of Statistical Software*, 61(6), 1–36. <https://doi.org/10.18637/jss.v061.i06>
- Chen, H., Yao, H., Xiang, Z., Fan, P., Yang, W., Fan, P., & Xiang, Z. (2017). Assessing the utility of urinary and fecal cortisol as an indicator of stress in golden snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*). *PeerJ*, 5, 5:e3648. <https://doi.org/10.7717/peerj.3648>
- Cornelissen, G. (2014). Cosinor-based rhythmometry. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 11(16), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-11-16>
- Costa, D. P. (1991a). Reproductive and Foraging Energetics of High Latitude Penguins, Albatrosses and Pinnipeds : Implications for Life History Patterns 1, 130, 111–130.
- Costa, D. P. (1991b). Reproductive and foraging energetics of pinnipeds: Implications for life history patterns. In D. Renouf (Ed.), *The Behaviour of Pinnipeds* (pp. 300–344). Springer Science + Business Media Dordrecht.
- Dardente, H. (2015). Circannual Biology: The Double Life of the Seasonal Thyrotroph. *Current Biology*, 25(20), R988–R991. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.002>
- Darwish, I. A. (2006). Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science*, 2(3), 217–235.
- Das Chagas, F., Mendes Tenorio, A., Simões, M., Teixeira, V. W., & Coelho Teixeira, A. (2014). Effects of melatonin and prolactin in reproduction: review of literature. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 61(3), 269–274. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.61.03.269>
- Elorriaga-Verplancken, F. R., Sandoval-Sierra, J., Paniagua-Mendoza, A., & Robles-Hernández, R. (2018). Seasonality and potential foraging grounds of migratory California sea lions from La Paz Bay, Southern Gulf of California, Mexico. *Aquatic Mammals*, 44(1), 56–61. <https://doi.org/10.1578/AM.44.1.2018.56>
- Gales, N. J., Williamson, P., Higgins, L. V., Blackberry, M. A., & James, I. (1997). Evidence for a prolonged postimplantation period in the Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 111, 159–163.
- García-Aguilar, M., & Aurióles-Gamboa, D. (2003a). Breeding season of the

- California sea lion (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Aquatic Mammals*, 29(1), 67–76.
<https://doi.org/10.1578/016754203101024086>
- García-Aguilar, M., & Aurióles-Gamboa, D. (2003b). Cuidado materno en el lobo marino de California de Los Islotes, Golfo de California, México. *Ciencias Marinas*, 29(4B), 573–583.
- Gardiner, K. J., & Hall, A. J. (1997). Diel and annual variation in plasma cortisol concentrations among wild and captive harbor seals (*Phoca vitulina*). *Canadian Journal of Zoology*, 75(11), 1773–1780. <https://doi.org/10.1139/z97-806>
- Gesquiere, L., Ziegler, T., Chen, P., Epstein, K., Alberts, S., & Altamann, J. (2014). Measuring fecal testosterone in females and fecal estrogens in males: comparison of RIA and LC/MS/MS methods for wild baboons (*Papio cynocephalus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 204(919), 141–149.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.021>.
- Goymann, W., & Wingfield, J. C. (2014). Male-to-female testosterone ratios, dimorphism, and life history - What does it really tell us? *Behavioral Ecology*, 25(4), 685–699. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru019>
- Greig, D. J., Mashburn, K. L., Rutishauser, M., Gulland, F. M. D., Williams, T. M., & Atkinson, S. (2007). Seasonal Changes in Circulating Progesterone and Estrogen Concentrations in the California Sea Lion (*Zalophus californianus*). *Journal of Mammalogy*, 88(1), 67–72. <https://doi.org/10.1644/06-mamm-a-060r2.1>
- Griffiths, D. J. (1984). The annual cycle of the testis of the elephant seal (*Mirounga leonina*) at Macquarie Island. *Journal of Zoology*, 203(2), 193–204.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1984.tb02326.x>
- Helm, B., Ben-Shlomo, R., Sheriff, M. J., Hut, R. A., Foster, R., Barnes, B. M., & Dominoni, D. (2013). Annual rhythms that underlie phenology: biological time-keeping meets environmental change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1765), 20130016–20130016.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0016>
- Hernández-Camacho, C. J., Aurióles-Gamboa, D., & Gerber, L. R. (2008). Age-specific birth rates of California sea lions (*Zalophus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Marine Mammal Science*, 24(3), 664–676.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2008.00199.x>
- Heath, C.B. 1989. The behavioral ecology of the California sea lion. Ph.D. thesis, University of California, Santa Cruz.
- Hunt, K. E., Lysiak, N. S., Robbins, J., Moore, M. J., Seton, R. E., Torres, L., & Buck, C. L. (2017). Multiple steroid and thyroid hormones detected in baleen from eight whale species. *Conservation Physiology*, 5(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1093/conphys/cox061>

- Hunt, K. E., Robbins, J., Loren Buck, C., Bérubé, M., & Rolland, R. M. (2019). Evaluation of Fecal Hormones for Noninvasive Research on Reproduction and Stress in Humpback Whales (*Megaptera novaeangliae*). *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.04.004>
- Hunt, K. E., Stimmelmayer, R., George, C., Hanns, C., Suydam, R., Brower, H., & Rolland, R. M. (2014). Baleen hormones: A novel tool for retrospective assessment of stress and reproduction in bowhead whales (*Balaena mysticetus*). *Conservation Physiology*, *2*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou030>
- Hunt, K. E., Trites, A. W., & Wasser, S. K. (2004). Validation of a fecal glucocorticoid assay for Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Physiology and Behavior*, *80*(5), 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2003.10.017>
- Jiménez, R., Burgos, M., & Barrionuevo, F. J. (2015). Circannual testis changes in seasonally breeding mammals. *Sexual Development*, *9*(4), 205–215. <https://doi.org/10.1159/000439039>
- Karatsoreos, I. N., Bhagat, S., Bloss, E. B., Morrison, J. H., & McEwen, B. S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(4), 1657–1662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018375108>
- Kershaw, J. L., & Hall, A. J. (2016). Seasonal variation in harbour seal (*Phoca vitulina*) blubber cortisol - A novel indicator of physiological state? *Scientific Reports*, *6*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep21889>
- Labrada-Martagón, V., Arias del Razo, A., Valdez, R. A., Romano, M. C., & Keith, E. O. (2007). Serum and saliva cortisol levels of California sea lion pups (*Zalophus californianus californianus*) born in a tourism rookery, *4*(1).
- Labrada-Martagón, V., Aurióles-Gamboa, D., & Martínez-Díaz, S. F. (2005). Natural and human disturbance in a rookery of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, *4*(2), 175–185. <https://doi.org/10.5597/lajam00080>
- Lanyon, J. M., Smith, K. M., & Carrick, F. N. (2005). Reproductive steroids are detectable in the faeces of dugongs. *Australian Zoologist*, *33*(2), 247–250.
- Larson, S., & Casson, C. J. (2007). Reproductive Hormone Levels within Captive Female Northern Fur Seals (*Callorhinus ursinus*) with and without Chemical Contraceptives. *Aquatic Mammals*, *33*(2), 195–201. <https://doi.org/10.1578/AM.33.2.2007.195>
- Lentz, M. J. (1990). Time-Series Analysis--Cosinor Analysis: A special case. *Western Journal of Nursing Research*, *12*(3), 408–412. Retrieved from <http://hjb.sagepub.com.proxy.lib.umich.edu/content/9/2/183.full.pdf+html>
- López-Cobá, H. E., & Montes-Pérez, C. R. (2016). Valoración de metabolitos de

testosterona, progesterona y estrógeno en excretas de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) como método para determinar el sexo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, 180–186.

- Maravilla-Chávez, M. O., Zavala-González, A., & Ortega-Rubio, A. (2006). Four seasons abundance changes of *Zalophus californianus californianus* (Lesson 1828), Allen, 1880, in the Gulf of California, Mexico. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(1), 111–116. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000100013>
- Mashburn, K. L., & Atkinson, S. (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. *General and Comparative Endocrinology*, 136(3), 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.01.016>
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation and disease: allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, 33–44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x>
- Meise, K., Von Engelhardt, N., Forcada, J., & Hoffman, J. I. (2016). Offspring hormones reflect the maternal prenatal social environment: Potential for foetal programming? *PLoS ONE*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145352>
- Melin, S., DeLong, R., & Thomason, J. (2000). Attendance Patterns of California Non-Breeding Season At San Miguel Island. *Most*, 16(January), 169–185.
- Moorman, E. A., Mendoza, S. P., Shideler, S. E., & Lasley, B. L. (2002). Excretion and measurement of estradiol and progesterone metabolites in the feces and urine of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *American Journal of Primatology*, 57(2), 79–90. <https://doi.org/10.1002/ajp.10036>
- Negro, S. S., Caudron, A. K., Dubois, M., Delahaut, P., & Gemmell, N. J. (2010). Correlation between male social status, testosterone levels, and parasitism in a dimorphic polygynous mammal. *PLoS ONE*, 5(9), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012507>
- Nieto-García, S. (2014). *Factores determinantes de las interacciones agosnísticas entre machos de lobo marino de California (Zalophus californianus)*. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., ... Wagner, H. (2014). Package 'vegan.'
- Peck, H. E., Costa, D. P., & Crocker, D. E. (2016). Body reserves influence allocation to immune responses in capital breeding female northern elephant seals. *Functional Ecology*, 30(3), 389–397. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12504>
- Pedernera-Romano, C., Aurióles-Gamboa, D., Valdez, R., Brousset, D., Romano,

- M., & Galindo, F. (2010). Serum cortisol in California sea lion pups (*Zalophus californianus californianus*). *Animal Welfare*, 19, 275–280.
- Pelayo González, L. (2018). *Efecto de variables ambientales en el número de nacimientos de lobo marino de California (Zalophus californianus) en el Golfo de California*. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN.
- Petrauskas, L., Atkinson, S., Gulland, F., Mellish, J. A., & Horning, M. (2008). Monitoring glucocorticoid response to rehabilitation and research procedures in California and Steller sea lions. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 309(2), 73–82. <https://doi.org/10.1002/jez.435>
- Pietraszek, J., & Atkinson, S. (1994). Concentrations of Estrone Sulfate and Progesterone in Plasma and Saliva, Vaginal Cytology, and Bioelectric Impedance During the Estrous Cycle of the Hawaiian Monk Seal (*Monachus schauinslandi*), (October), 430–441.
- Pomeroy, P. (2011). Reproductive cycles of marine mammals. *Animal Reproduction Science*, 124, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.021>
- Pörschmann, U., Trillmich, F., Mueller, B., Wolf, J. (2010). Male reproductive success and its behavioural correlates in a polygynous mammal, the Galápagos sea lion (*Zalophus wollebaeki*). *Molecular Ecology*, (19), 2574–2586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04665.x>
- R Development Core Team. (2015). *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. <http://www.R-project.org/>.
- Rayas-Estrada, A., & Hernández-Camacho, C. J. (2019). Fine-scale site fidelity in California sea lions, *Zalophus californianus*, in the colony at Los Islotes, La Paz Bay, Mexico. *Ciencias Marinas*, 45(4), 163–174. <https://doi.org/10.7773/cm.v45i4.3019>
- Reijnders, P. J. H. (1990). Progesterone and oestradiol-17 concentration profiles throughout the reproductive cycle in harbour seals (*Phoca vitulina*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 90(2), 403–409. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900403>
- Romero, L. M., & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of Stress. *International Journal of Comparative Psychology*, 20, 89–95.
- Romero, L. M., Dickens, M. J., & Cyr, N. E. (2009). The reactive scope model - A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Hormones and Behavior*, 55(3), 375–389. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.12.009>
- Romero Saldaña, M. (2016). Pruebas de bondad de ajuste a una distribución normal. *Revista Enfermería Del Trabajo*, 6(3), 105–114.
- Rosen, D. A. S., & Kumagai, S. (2008). Hormone changes indicate that winter is a critical period for food shortages in Steller sea lions. *Journal of Comparative*

- Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178(5), 573–583. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0247-3>
- Sattler, R., & Polasek, L. (2017). Serum estradiol and progesterone profiles during estrus, pseudopregnancy, and active gestation in Steller sea lions. *Zoo Biology*, 36(5), 323–331. <https://doi.org/10.1002/zoo.21381>
- Sergeant, D., Roland, K., Boulva, J., & Berkes, F. (1978). The recent status of *Monachus monachus*, the Mediterranean monk seal. *Biological Conservation*, 14(4), 259–287.
- Sherie, S. B., Johnston, D., & Siniff, D. B. (1992). Territorial behavior and breeding frequency of male Weddell seals (*Leptonychotes weddelli*) in relation to age, size, and concentrations of serum testosterone and cortisol. *Canadian Journal of Zoology*, 70(4), 680–692.
- Szteren, D., & Aurioles-Gamboa, D. (2011). Ecological regionalization of *Zalophus californianus* rookeries, as a tool for conservation in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 37(3), 349–368.
- Szteren, D., Aurioles, D., & Gerber, L. R. (2006). Population status and trends of the California sea lion (*Zalophus californianus californianus*) in the Gulf of California, Mexico. <https://doi.org/10.4027/slw.2006.25>
- Temte, J. L. (1985). Photoperiod and delayed implantation in the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 73, 127–131.
- Temte, Jonathan L. (1991). Precise birth timing in captive harbor seals (*Phoca vitulina*) and California sea lions (*Zalophus californianus*). *Marine Mammal Science*, 7(2), 145–156.
- Temte, Jonathan L., & Temte, J. (1993). Photoperiod defines the phenology of birth in captive California sea lions. *Marine Mammal Science*, 9(3), 301–308.
- Touma, C., & Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 54–74. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.006>
- Tripovich, J. S., Rogers, T. L., & Dutton, G. (2009). Faecal testosterone concentrations and the acoustic behaviour of two captive male Australian fur seals. *Australian Mammalogy*, 31, 117–122. <https://doi.org/10.1071/am09009>
- Tu, J., & Bennett, P. (2017). Parallelism experiments to evaluate matrix effects, selectivity and sensitivity in ligand-binding assay method development: pros and cons. *Bioanalysis*, 9(14), 1107–1122. <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0084>
- Velloso, A., Wasser, S. K., Monfort, S. L., & Dietz, J. M. (1998). Longitudinal fecal steroid excretion in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *General and Comparative Endocrinology*, 112, 96–107.

- Wartzok, D. (1991). Physiology of behaviour in pinnipeds. In *The physiology of reproductive behaviour* (pp. 237–298).
- Wasser, S. K., Monfort, S. L., Southers, J., & Wildt, D. E. (1994). Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesteron in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. *Journal of Reproduction and Fertility*, (101), 213–220.
- Whirledge, S., & Cidlowski, J. (2010). Glucocorticoids, Stres, and Fertiligy. *Minerva Endocrinol. Author Manuscript.*, 35(2), 109–125. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4002.BONE>
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis*. (L. Deirdre, Ed.) (5th.). Pearson. https://doi.org/10.1142/9789814566780_0009
- Zubeldia-Brenner, L., Roselli, C. E., Recabarren, S. E., Gonzalez Deniselle, M. C., & Lara, H. E. (2016). Developmental and Functional Effects of Steroid Hormones on the Neuroendocrine Axis and Spinal Cord. *Journal of Neuroendocrinology*, 28(7), 1–28. <https://doi.org/10.1111/jne.12401>

Anexo I. Protocolo para la colecta de muestras fecales de lobo marino de California *Zalophus californianus*

1. Antes de colectar las muestras, colocarse guantes y tener listo el siguiente material:
 - Espátula de metal
 - Piseta con alcohol
 - Piseta con jabón libre de fosfatos
 - Bolsas de plástico
 - Plumón
 - Tubos crioviales, uno por cada muestra a colectar.
 - Libreta de campo

2. Hacer un recorrido por el área de interés de la lobera (Fig. 1) para encontrar las heces de los lobos marinos.
3. Colectar únicamente copros frescos en bolsas de plástico individuales. Preferentemente conocer a qué categoría de edad pertenecen.
4. Después de colectar todas las heces disponibles (máximo 15), las muestras se transfieren a los tubos crioviales en un sitio seguro de la isla.
5. Tomar la muestra de la parte central interna del copro con la espátula de metal. Tapar y etiquetar inmediatamente con el mes de colecta y número de muestra.
6. Lavar la espátula con alcohol, seguido del jabón contenido en la piseta, y nuevamente con alcohol cada vez que se transfiera una muestra nueva.
7. Depositar en una bolsa con cierre hermético el líquido de deshecho.
8. Se recomienda realizar la colecta en el menor tiempo posible y evitar complicaciones durante este procedimiento a causa de la interacción con los animales o que suba la marea.
9. Colocar los crioviales, etiquetados y con muestra en el tanque con nitrógeno líquido inmediatamente después de la sesión de colecta y mantenerlos en él hasta su transporte al laboratorio.
10. Al terminar cada día, elaborar un breve reporte en la libreta de campo de las actividades de colecta, número de muestras obtenidas y cualquier información que se considere relevante.

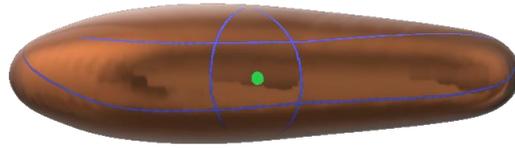


Figura 17. Ejemplificación de heces de lobo marino, el punto verde señala el área del copro de la que se obtuvo la muestra.

Anexo II. Protocolo para la extracción de esteroides a partir de una fase orgánica sólida

Traducción del protocolo de "DetectXTM Steroid Solid Extracton Protocol" Arbor Assays, 2010.

Para extraer los esteroides de matrices no líquidas, tales como sólidos secos u otra materia orgánica, se recomienda una extracción de la fase orgánica. A continuación, se describe la modificación que Arbor assays implementó a los protocolos estándar. Se recomienda el uso de etanol como un medio para solubilizar por completo el esteroide seco, ya que ciertos esteroides tienen limitada solubilidad acuosa. El protocolo utiliza etanol o etil acetato para extraer los esteroides solubles orgánicos.

Materiales requeridos:

Un estándar del esteroide (contenido en el kit de la hormona a cuantificar) para determinar la eficiencia de la extracción

Etanol de grado ACS

Microtubos para centrifuga de 2 mL.

Procedimiento

Asegúrese de que toda la muestra está completamente seca y pulverizada. Remueva cualquier partícula grande como pasto o restos de animales si es posible. Evaluar la eficiencia de la extracción por medio de la preparación de una dilución del esteroide de concentración conocida en la solución Buffer de trabajo (AB). SPIKE una alícuota de la muestra experimental con un volumen de solución de esteroides en AB (Control spike) y una alícuota de la muestra con el mismo volumen de AB (control sample). Extraer las muestras y ambos controles con etanol como se describe a continuación.

Control spike: alícuota de la muestra experimental + esteroides de concentración conocida disueltos en AB.

Control sample: alícuota de la muestra experimental + AB

1. Pesar 0.2 g de la muestra fecal seca en un tubo.
2. Añadir 1 mL de etanol por cada 0.1 g de solido

3. Agitar vigorosamente por al menos 30 minutos
4. Centrifugar las muestras a 5,000 rpm durante 15 minutos. Transferir el volumen medido de sobrenadante a un tubo limpio para la evaporación.
5. Evaporar la solución sobrenadante hasta que esté seca en un SpeedVac o en nitrógeno.

Mantener los extractos secos congelados a -20°C en un DESICCATOR.

6. Disolver el extracto con 100 uL de etanol, seguido de al menos 400 uL AB. Agitar con el vórtex bien y permitir que se asiente 5 minutos a temperatura ambiente. Agitar y dejar reposar por 5 minutos dos veces más para asegurarse de la completa solubilidad de los esteroides. **Para inmunoensayos, el contenido de etanol en el pozo deberá ser por debajo de 5%. Diluir la mezcla etanol:AB >1:10 con AB, o como se indica en el manual del kit.**
7. Correr las muestras diluidas reconstituidas en el ensayo inmediatamente de acuerdo con las instrucciones del inserto.
8. Determinar la eficiencia de extracción por medio de la comparación de la concentración de esteroide medido en el control extraído (control spike, control sample) con la concentración de esteroide antes de la extracción.

Nota: en el paso 5 si solo una fracción del solvente orgánico se evapora, asegúrese de que las cantidades finales de esteroide medido por g sólido sean el volumen de la solución evaporada.