

**LA CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES  
SEXUALES EN HECES DE LOBO IBÉRICO  
(CANIS LUPUS SIGNATUS): UN MÉTODO NO INVASIVO  
DE SEXADO COMO ALTERNATIVA A LOS ANÁLISIS  
MOLECULARES**

Isabel Barja

*Universidad SEK*

Gema Silván, Juan Carlos Illera

*Universidad Complutense de Madrid*

Stefano Rosellini, Aña Piñeiro

*CSIC*

isabel.barjanunez@sekmail.com

**Resumen**

*La determinación de sexo en animales silvestres tiene gran importancia en los estudios ecológicos, comportamentales y de conservación. Los objetivos del presente estudio fueron 1) determinar el sexo de pertenencia de muestras fecales de lobo ibérico a partir de las concentraciones diferenciales de hormonas esteroides sexuales (HES) y 2) describir los perfiles de HES en machos y hembras (considerando la asignación de sexo realizada previamente) durante el período reproductor y no reproductor de la especie. La cuantificación de andrógenos (Testosterona, T), progestágenos (Progesterona, P) y estrógenos (Estradiol, E) se realizó mediante enzimo inmunoensayo (EIA). El análisis de Conglomerados, usando el algoritmo de las k-medias, mostró que las 59 muestras fecales podían agruparse en tres grupos significativamente diferentes entre sí respecto a las concentraciones de HES. Los grupos 1 y 2 exhibieron concentraciones de T significativamente mayores que el grupo 3. Por tanto, las muestras fecales incluidas en los grupos 1 y 2 (17 muestras) parecen corresponder a machos y las del grupo 3 (42 muestras) a hembras. Las concentraciones de T+P+E y T/P fueron mayores en el grupo de los machos que en el de las hembras. Los resultados de este estudio también pusieron de manifiesto que los niveles de T en machos fueron mayores durante el periodo reproductor que durante la época no*

reproductora. Sin embargo, las concentraciones de P y E resultaron ser más elevadas durante la estación no reproductora. En hembras las concentraciones de las tres hormonas (T, P y E) fueron mayores durante el periodo reproductor.

**Palabras clave:** Análisis molecular, Enzimo inmunoensayo, Heces, Hormonas Esteroides sexuales, Lobo ibérico, Sexo.

### Summary

The determination of gender in wild animals is essential for the behavioural and ecological studies and also for the conservation. The objectives of this study were 1) determination of gender in faecal samples of Iberian wolf based on the differential concentrations of sexual steroid hormones (SSH) and 2) to analyse the profiles of SSH in males and females (considering the gender determination carried out previously) during the non-reproductive and reproductive periods. The quantification of androgens (Testosterone, T), progestins (Progesterone, P) and estrogens (Estradiol, E) was conducted by means of Enzymeimmunoassay (EIA). The Conglomerate analysis of k-means showed that the 59 faecal samples group in three different conglomerates, considering the SSH levels. The groups 1 and 2 showed higher levels of T than the group 3. Therefore, the faecal samples included in the groups 1 and 2 (17 samples) correspond to males and those of the group 3 (42 samples) to females. The levels of T+P+E and T/P were higher in the group of males than in the group of females. The results of this study also showed that the levels of T in males were higher during the reproductive period than in non-reproductive period. However, the concentrations of P and E turned out to be higher during the non-reproductive season. In females the levels of the three hormones (T, P and E) were higher during the reproductive period.

**Key Words:** Enzyme immunoassay, Faeces, Iberian wolf, Molecular analysis, Sexual steroid hormones, Sex.

\* \* \* \* \*

## Introducción<sup>1</sup>

Las hormonas actúan como intermediarios entre el medio exterior y los órganos internos del animal (Lincoln *et al.*, 1972; Crews, 1984; Moore, 1986). Las hormonas esteroides sexuales (andrógenos, progestágenos y estrógenos) son factores determinantes en los patrones del comportamiento reproductor. En mamíferos, entre sus funciones cabe destacar la regulación de aspectos conductuales como son la atracción de pareja, la receptividad y otros aspectos del patrón copulatorio en el macho y del estro en la hembra (Beach, 1976; Seal *et al.*, 1979; Velloso *et al.*, 1998; Valdespino *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2004). En el lobo (*Canis lupus*) las variaciones estacionales en el comportamiento reproductor están relacionadas con las variaciones en las concentraciones de hormonas esteroides sexuales (Seal *et al.*, 1979; Asa & Valdespino, 1998). Por tanto, el estudio de los ciclos y parámetros reproductivos, mediante la cuantificación de las hormonas esteroides sexuales, ayuda a conocer los períodos reproductivos de la especie y su comportamiento reproductor.

La cuantificación de hormonas esteroides sexuales en sangre y orina implica un aumento en los niveles de glucocorticoides (estrés), ya que la recolección de muestras requiere la captura y manejo de los animales objeto de estudio (Monfort *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2001; Möstl & Palme, 2002). Además, dicha manipulación de los animales parece modificar las concentraciones de determinadas hormonas, y concretamente las concentraciones de las hormonas esteroides sexuales (Plotka *et al.*, 1983). Sin embargo, actualmente la cuantificación de los niveles de hormonas esteroides sexuales se realiza frecuentemente en muestras fecales, un método no invasivo que no requiere la captura y manejo de los animales, habiéndose llevado a cabo estudios en diferentes especies: lobo (*Canis lupus*, Seal *et al.*, 1979, Soto *et al.*, 2004), lobo de crín (*Chrysocyon brachyurus*, Velloso *et al.*, 1998), fenec (*Vulpes zerda*, Valdespino *et al.*, 2002), hiena manchada (*Crocuta crocuta*, Dloniak *et al.*, 2004), ciervo (*Cervus elaphus*, Cook *et al.*, 2002), pudu (*Pudu puda*, Blanvillain *et al.*, 1997), chinchilla

---

<sup>1</sup> Agradecimientos. Nuestro agradecimiento a la Xunta de Galicia y muy especialmente al Servicio de Conservación de la Naturaleza de Ourense por las facilidades prestadas y por la concesión de los permisos oportunos para llevar a cabo el estudio en el Parque Natural Os Montes do Invernadeiro. A los guardas Ricardo Prieto, Tomás Pérez y Paco Barja por su inestimable ayuda durante el trabajo de campo. Este estudio fue financiado por los proyectos: USEK, n°-7-2004-05, Universidad SEK de Segovia y CAM-UCM n° 920694.

(*Chinchilla lanigera*, Busso *et al.*, 2005) y diferentes especies de primates (*Macaca fascicularis*, Shideler *et al.*, 1993, *Papio cynocephalus*, Wasser *et al.*, 1994).

La cuantificación de los niveles de hormonas esteroides sexuales en muestras fecales ha sido también utilizada en la determinación de sexo en algunas especies de aves (Cockrem & Rounce, 1994) y en mamíferos como el lobo de crin y el lobo mexicano (Velloso *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 2004). Sin embargo, el sexado molecular en los últimos años se está utilizando en un número cada vez mayor de estudios con mamíferos (Amstrup *et al.*, 1993; Bérubé & Palsbøll, 1996; García-Muro *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1997; Wilson & White, 1998).

El lobo es un carnívoro fisípedo perteneciente a la familia de los cánidos, que vive en grupos que constituyen unidades familiares (Mech, 1970). La organización social dentro del grupo es de las más complejas y desarrolladas entre los cánidos, existiendo una jerarquía lineal para cada sexo (Schenkel, 1947) y otra para los cachorros (Mech, 1974; Zimen, 1975). El macho alfa dirige las actividades de la manada (Mech, 1970; Packard, 2003), y junto con la hembra alfa son los únicos individuos que se reproducen dentro de la misma (Packard, 2003). Las hembras de lobo son monoéstricas anuales (Mech, 1970). El apareamiento en la especie ocurre entre los meses de enero y abril (Mech, 1974) y tras 62-65 días de gestación la hembra alfa pare una media de 5,33 cachorros/camada (Mech, 1970, 1974; Blanco, 1998). La loba pare a sus cachorros en una madriguera que puede excavar ella misma (Pimlott *et al.*, 1969). Los lobeznos permanecen en el cubil con la madre durante dos meses y después de este periodo los cachorros son trasladados a un área de unas 4 ha denominada lugar de reunión (*rendezvous site*), donde permanecen aproximadamente unas 6 semanas hasta que los cachorros pueden acompañar a sus padres en los desplazamientos (Pimlott *et al.*, 1969; Mech, 1970, 1974; Barja, 2001; Barja *et al.*, 2005).

Los objetivos del presente estudio fueron: 1) En función de las concentraciones de hormonas esteroides sexuales (andrógenos, progestágenos y estrógenos) asignar el sexo de pertenencia de las muestras fecales recolectadas. 2) Considerando la asignación de sexo realizada previamente, determinar los niveles de hormonas esteroides sexuales durante el periodo reproductor y fuera del mismo tanto en machos como en hembras.

## Material y métodos

### Área de estudio

El área de estudio se sitúa el Macizo Central Ourensano y ocupa una superficie de 12.000 ha dentro de la cual está el Parque Natural Os Montes do Invernadeiro. El paisaje se caracteriza por una topografía accidentada y la altitud oscila entre los 880 m y los 1.707 m (Barja, 2001). El clima tiene una tendencia a la continentalidad combinando influencias atlánticas y mediterráneas. Los montes del Invernadeiro cuentan con una flora variada, alternando comunidades vegetales mediterráneas con bosques relictos atlánticos (Castroviejo, 1977). La vegetación predominante está constituida por matorrales mixtos de brezo (*Erica australis*), carquesia (*Pterospartum tridentatum*) y jaguarzo (*Halimium lasianthum*). En los valles y vaguadas predomina el bosque caducifolio autóctono formado principalmente por asociaciones de roble (*Quercus robur*), abedul (*Betula celtiberica*), acebo (*Ilex aquifolium*) y serbal (*Sorbus aucuparia*). Extensas áreas del parque están ocupadas por bosques de repoblación de pino albar (*Pinus sylvestris*) (Barja, 2001).

### Recolección de muestras fecales en el campo

Las muestras fecales fueron recolectadas durante 15 meses, desde junio de 2004 hasta agosto de 2005. Los lobos, como otros carnívoros, usan los caminos para desplazarse (Robinson & Delibes, 1988; Barja, 2001) y depositan en ellos los excrementos como una forma de señalización olorosa y visual (Vilà *et al.*, 1994; Barja *et al.*, 2004, 2005). Por tanto, para aumentar las probabilidades de detección de heces de lobo ibérico se establecieron varios itinerarios por pistas y cortafuegos en el territorio de un grupo reproductor. Todos los itinerarios fueron recorridos mensualmente a pie.

Cada vez que se detectaba un excremento de lobo ibérico se anotaban los siguientes datos: fecha y hora de recolección, tiempo transcurrido entre la deposición y la recolección. Para evitar errores asociados con el tiempo transcurrido desde la deposición únicamente se recolectaron muestras procedentes de excrementos frescos (< 12 horas). La recolección de muestras frescas se vio favorecida debido a que el lobo ibérico es una especie de hábitos nocturnos y que las temperaturas nocturnas en el área de estudio son bajas todo el año. Los

excrementos frescos se caracterizaban por desprender un olor fuerte, presentar una capa mucosa que los recubría y no presentar síntomas de deshidratación. Los excrementos de lobo se diferenciaron de los de otros carnívoros que viven en la zona por sus características morfológicas (tamaño, forma y contenido). De cada excremento fresco detectado se recolectaba una muestra de aproximadamente 10 g. Todas las muestras recolectadas fueron etiquetadas y mantenidas a  $-20^{\circ}$  C hasta el posterior análisis hormonal en el laboratorio.

Desde el año 1999 hasta la actualidad se han estado realizando estudios sobre diferentes aspectos del lobo ibérico en el área de estudio. A lo largo de estos años se pudo constatar, usando diferentes metodologías (fototrampeo, estaciones de espera, seguimiento de rastros), la presencia de un grupo reproductor estable. Por tanto, las muestras fecales recolectadas corresponden a los individuos que constituyen este grupo reproductor.

#### Cuantificación de hormonas esteroides sexuales en heces

Las hormonas esteroides sexuales cuantificadas en las muestras fecales de lobo ibérico fueron: andrógenos (Testosterona, T), progestágenos (Progesterona, P) y estrógenos (Estradiol, E). La extracción de las hormonas esteroides sexuales de las muestras fecales fue realizada usando una metodología similar a la establecida para otras especies de carnívoros (Brown *et al.*, 1994, 1996; Young *et al.*, 2004). La cuantificación de las concentraciones de hormonas esteroides sexuales en los extractos fecales se realizó mediante ensayo inmunoensayo (EIA). Esta técnica fue desarrollada en el Laboratorio de Endocrinología de la Facultad de Veterinaria (Universidad Complutense de Madrid), donde fue previamente validada para la especie objeto de estudio, para los extractos fecales y para las hormonas analizadas. Las concentraciones hormonales fueron calculadas por medio de un software desarrollado para estas técnicas, ELISA-AID (Eurogenetic, Bélgica). Para cada muestra fecal las concentraciones de hormonas esteroides sexuales fueron expresadas en ng/g de excremento seco.

#### Análisis de los datos

Para determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal se usó el test de Kolmogorov-Smirnov y como éstos no estaban distribuidos nor-

malmente se usaron pruebas no paramétricas. Para asignar el sexo de pertenencia de las muestras fecales en función de las concentraciones de hormonas esteroides sexuales (Testosterona, Progesterona, Estradiol) se realizó un análisis de Conglomerados usando el algoritmo de las k-medias. Este análisis agrupa los elementos de una muestra en grupos o conglomerados, de manera que cada grupo sea lo más homogéneo posible y los grupos sean muy distintos entre sí. Estudios previos pusieron de manifiesto que las concentraciones de Testosterona+Progesterona+Estradiol y las concentraciones derivadas de la relación Testosterona/Progesterona fueron mayores en machos que en hembras (Velloso *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 2004). Por tanto, en el presente estudio una vez agrupadas las muestras fecales mediante el análisis de Conglomerados de k-medias se realizaron los cálculos anteriormente mencionados para las muestras incluidas en cada uno de los grupos y se estimaron las concentraciones medias de T+P+E y de la relación T/P para cada uno de los grupos obtenidos.

Las muestras fecales recolectadas se agruparon según la fecha de recolección en periodo reproductor (enero-agosto) y periodo no reproductor (septiembre-diciembre), considerando el ciclo reproductor del lobo ibérico. Para comparar las concentraciones de hormonas esteroides sexuales entre ambos periodos en machos y en hembras se usó el test de Wilcoxon para medidas repetidas. Como no se conoce a que individuo pertenece cada muestra fecal, los datos fueron considerados estadísticamente como unidades dependientes de análisis.

Los datos son presentados como la media  $\pm$  error estándar (SE). El nivel de significación usado para rechazar la hipótesis nula fue  $P < 0,05$ . Los análisis estadísticos fueron realizados con el software SPSS 11.5.

## Resultados

Durante el periodo de estudio se analizaron las hormonas esteroides sexuales en un total de 59 muestras fecales frescas de lobo ibérico. El análisis de Conglomerados de k-medias para las variables referentes a las concentraciones de hormonas esteroides sexuales (Testosterona, Progesterona y Estradiol) reveló la pertenencia de las muestras a tres grupos distintos entre sí (Tabla 1). El grupo 1 incluyó 16 muestras, todas ellas con altas concentraciones de

Testosterona (T), Progesterona (P) y Estradiol (E). El grupo 2 únicamente estaba formado por una muestra y las concentraciones de las tres hormonas fueron todavía más elevadas que en el grupo 1. El grupo 3, el que incluyó el mayor número de muestras fecales ( $n = 42$ ), mostraba unas concentraciones de hormonas esteroides sexuales más bajas que los otros dos grupos. Así, las concentraciones medias de hormonas esteroides sexuales fueron diferentes entre el grupo 1 (T:  $1.136,4 \pm 209,7$  ng/g; P:  $1.469,3 \pm 199,2$  ng/g; E:  $538,1 \pm 133,5$  ng/g;  $n = 16$ ), el grupo 2 (T:  $8.381,7$  ng/g; P:  $2.759,2$  ng/g; E:  $390,7$  ng/g;  $n = 1$ ) y el grupo 3 (T:  $226,6 \pm 44,4$  ng/g; P:  $335,7 \pm 35,5$  ng/g; E:  $164,8 \pm 65,9$  ng/g;  $n = 42$ ). Las diferencias entre los grupos 1, 2 y 3 respecto a las variables consideradas fueron significativas estadísticamente (T:  $F = 14,5$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0,001$ ; P:  $F = 46,1$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0,001$ ; E:  $F = 3,9$ ,  $gl = 2$ ,  $P < 0,05$ ).

Al sumar las concentraciones de las tres hormonas esteroides sexuales (T+P+E) el valor promedio fue mayor para el grupo 1 ( $3.143,8 \pm 235,6$  ng/g;  $n = 16$ ) que para el grupo 3 ( $727,1 \pm 99,4$  ng/g;  $n = 42$ ) (Fig. 1A), resultando las diferencias entre ambos grupos significativas estadísticamente ( $F = 62,9$ ,  $gl = 1$ ,  $P < 0,001$ ). Las concentraciones medias de Testosterona/Progesterona (T/P) difirieron entre el grupo 1 ( $1,7 \pm 0,8$  ng/g;  $n = 16$ ) y el grupo 3 ( $0,8 \pm 0,2$  ng/g;  $n = 42$ ) (Fig. 1B), aunque dichas diferencias no resultaron significativas ( $F = 1,6$ ,  $gl = 1$ ,  $P > 0,05$ ).

Los resultados del análisis de conglomerados de k-medias sugieren que las muestras fecales de lobo ibérico incluidas en los grupos 1 y 2 pertenecían a machos y las del grupo 3 a hembras. Así, al analizar las concentraciones de hormonas esteroides sexuales en machos durante el periodo reproductor y no reproductor se obtuvo que las concentraciones medias de andrógenos fueron significativamente mayores durante el periodo reproductor ( $1.724,1 \pm 561,3$  ng/g) que en la época no reproductora ( $809,2 \pm 303,1$  ng/g) (Fig. 2A) ( $P < 0,001$ ). Las concentraciones medias de progestágenos (periodo reproductor:  $1.535,0 \pm 231,3$  ng/g; periodo no reproductor:  $1.592,5 \pm 473,5$  ng/g) ( $P < 0,001$ ) y estrógenos (periodo reproductor:  $472,8 \pm 121,3$  ng/g; periodo no reproductor:  $793,8 \pm 477,0$  ng/g) ( $P < 0,001$ ) también variaron entre ambos periodos (Fig. 2A). En hembras las concentraciones medias de andrógenos, progestágenos y estrógenos resultaron significativamente mayores durante el periodo reproductor (T:  $238,0 \pm 56,4$  ng/g; P:  $354,6 \pm 40,9$  ng/g; E:  $180,0 \pm 84,8$  ng/g) que fuera de la época reproductora (T:  $190,2 \pm 49,6$  ng/g; P:  $274,9 \pm 72,4$  ng/g; E:  $116,2 \pm 58,6$  ng/g) (Fig. 2B) ( $P < 0,001$ ).



Si se consideran las muestras procedentes de machos y hembras, las concentraciones de T+P+E resultaron significativamente mayores durante el periodo reproductor ( $1.673,3 \pm 293,3$  ng/g) que en el periodo no reproductor ( $1.184,6 \pm 344,5$  ng/g) ( $P < 0,001$ ), al igual que las concentraciones de T/P que también resultaron ser más elevadas durante el periodo reproductor ( $1,2 \pm 0,3$  ng/g *vs*  $0,7 \pm 0,2$  ng/g) ( $P < 0,01$ ).

## Discusión

La determinación del sexo en poblaciones silvestres es esencial para conocer la dinámica y estructura poblacional, el uso del hábitat, el comportamiento, el sistema de apareamiento y para tomar decisiones de manejo de las especies (Brown *et al.*, 1991; Gompper *et al.*, 1998; Hughes 1998; Shaw *et al.*, 2003). Sin embargo, la observación directa de la región anogenital en condiciones naturales es muy difícil si no se capturan los animales (una práctica que resulta muy costosa e invasiva) y sólo ocurre en escasas ocasiones. Otra forma de asignar el sexo es asumir que existe dimorfismo sexual en la realización de determinados comportamientos, lo que conduce con frecuencia a errores en la asignación del sexo. Por último las diferencias de tamaño, tampoco no informan con fiabilidad acerca del sexo de la especie, pues están limitadas por la edad y también por las variaciones interindividuales (Shaw *et al.*, 2003).

Los resultados del presente estudio, realizado con lobo ibérico, indican que mediante la comparación diferencial de los niveles de hormonas esteroides sexuales (andrógenos, progestágenos y estrógenos) se puede realizar la asignación de sexo en muestras fecales de género desconocido, habiéndose clasificado el 100% de las muestras mediante un análisis de conglomerados de k-medias. Actualmente pocos estudios han utilizado métodos fisiológicos no invasivos para la determinación de sexo en vertebrados (Salame-Méndez y Villalpando-Fierro, 1998; Velloso *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 2004). Sin embargo, en un elevado número de estudios realizados con mamíferos se ha utilizado el sexado molecular, usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar fragmentos específicos del cromosoma Y o para amplificar fragmentos homólogos de los cromosomas X e Y (Griffiths & Tiwari, 1993; Prithiviraj & Don, 2001; Shaw *et al.*, 2003). Esta metodología ha sido usada en un elevado número de taxones: ungulados (Aasen & Medrano, 1990; Wilson &

White, 1998), cetáceos (Baker *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1991; Bérubé & Palsbøll, 1996; Reed *et al.*, 1997), úrsidos (Amstrup *et al.*, 1993) y cánidos (García-Muro *et al.*, 1997), entre otros.

En los estudios de genética molecular se usan distintas fuentes de ADN, como sangre (Amstrup *et al.*, 1993) y piel (Brown *et al.*, 1991). En los excrementos depositados por los animales se encuentran células de la mucosa intestinal, por lo que las heces también proporcionan una fuente más de ADN a estudiar. En los últimos años se realizaron algunos estudios utilizando las heces de diferentes especies como fuente de material genético (Reed *et al.*, 1997; Hasen & Jacobsen, 1999; Kohn *et al.*, 1999). La ventaja del uso de ADN fecal es que es un método no invasivo, pues no requiere de la presencia del animal (Gerloff *et al.*, 1999). Por el contrario, la extracción de ADN de tejidos y sangre requiere generalmente la manipulación previa de los animales para obtener las muestras. Sin embargo, cabe destacar que los análisis de ADN fecal son costosos y técnicamente puede resultar difíciles de llevar a cabo porque el ADN fecal se degrada rápidamente y el que se extrae de las heces está altamente degradado. Por tanto, pocas muestras de ADN fecal tienen la suficiente calidad para ser amplificadas mediante PCR (Murphy *et al.*, 2000).

En algunos estudios moleculares se menciona que la determinación de sexo mediante la cuantificación de Testosterona es poco factible en animales silvestres debido a la gran dificultad que entraña la obtención de muestras. Sin embargo, el desarrollo de técnicas no invasivas como la cuantificación de hormonas esteroideas sexuales en heces (Seal *et al.*, 1979; Velloso *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 2002; Valdespino *et al.*, 2002; Dloniak *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2004) supuso un gran avance para la utilización de esta metodología en la determinación de género en poblaciones silvestres.

Estudios previos pusieron de manifiesto que los machos muestran mayores niveles de Testosterona que las hembras y que la relación Testosterona/Progesterona es también mayor en machos que en hembras (Bishop & Hall, 1991; Salame-Méndez & Villalpando-Fierro, 1998; Velloso *et al.*, 1998). Basándonos en estos datos, los resultados del presente trabajo indican que las muestras fecales de lobo ibérico incluidas en los grupos 1 y 2, con elevadas concentraciones de Testosterona, corresponden a machos (28,8 % de las muestras). Mientras que las muestras del grupo 3, con unas concentraciones menores de Testosterona, corresponden a hembras (71,2 % de las muestras). La cuantificación de los niveles de hormonas esteroideas sexuales en

muestras fecales ha sido utilizada previamente en la determinación de sexo en aves (Cockrem & Rounce, 1994) y en mamíferos como el lobo de crin y el lobo mexicano (Velloso *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 2004). En el presente estudio el recolectar un mayor número de muestras fecales de hembras que de machos podría guardar relación con el hecho de que la mayoría de las muestras fecales fueron recogidas durante el periodo de cría y en el lugar de reunión (rendezvous site), donde las hembras pasan mucho tiempo, pues todas participan en la crianza de los cachorros. Además, si se comparan las concentraciones medias de hormonas esteroides sexuales con las obtenidas en otros trabajos realizados con la especie (Soto *et al.*, 2004) los valores son más elevados, posiblemente debido a que en su mayoría las muestras fueron recolectadas durante el periodo reproductor, cuando los valores hormonales son mayores tanto en machos como en hembras (Mech, 1970; Soto *et al.*, 2004).

El lobo es un animal esquivo y difícil de observar en el campo, por tanto los estudios fisiológicos usando muestras fecales constituyen un método no invasivo que aporta información muy valiosa sobre la especie. Sin embargo, hay que destacar que el sexado mediante la comparación diferencial de las concentraciones de hormonas esteroides sexuales debe ser realizado en otras especies de mamíferos y los resultados obtenidos deben ser testados en animales de sexo conocido como hicieron Soto *et al.* (2004) en su trabajo llevado a cabo en cautividad con lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*).

El lobo ibérico, como otros cánidos silvestres, está considerado un reproductor estacional, siendo las hembras monoestrosas anuales (Mech, 1970). En el presente estudio se incluyó dentro del periodo reproductor la época de celo, el apareamiento y la crianza (enero-agosto). Los resultados obtenidos mostraron que las concentraciones de Testosterona fecal en machos y las concentraciones de Testosterona, Progesterona y Estradiol en hembras fueron más elevadas durante el periodo reproductor que fuera del mismo. Asimismo, se pudo constatar que las concentraciones de hormonas esteroides sexuales fueron mayores en machos que en hembras durante todo el año. También en otros estudios realizados con cánidos, como el coyote (*Canis latrans*) (Stellflug *et al.*, 1981), el lobo de crin (Velloso *et al.*, 1998) y el lobo mexicano (Soto *et al.*, 2003), se pudo constatar un aumento en las concentraciones de hormonas esteroides sexuales durante la estación reproductora. Monfort *et al.* (1998) en un trabajo realizado con licaones en estado silvestre pusieron de manifiesto que las concentraciones fecales de estrógenos experimentan un pico durante el

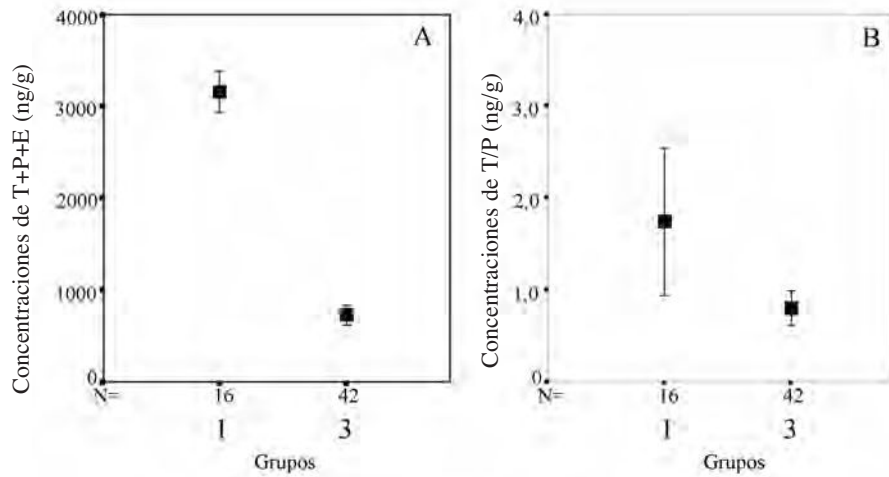
periodo de cópula. La Progesterona aumenta tras la cópula y durante la gestación y disminuye en el momento del parto, mientras que los niveles de testosterona fecal se mantienen elevados durante toda la estación reproductora.

De los resultados presentados en este estudio se puede concluir que las concentraciones fecales de andrógenos, progestágenos y estrógenos pueden ser usadas para diferenciar el periodo reproductor del no reproductor en machos y en hembras, lo que proporciona datos de gran interés sobre el periodo de fertilidad de las especies. Esta información resulta crucial en la conservación de especies amenazadas, siendo de gran ayuda para llevar a cabo con éxito estrategias de conservación *ex situ* como la cría en cautividad.

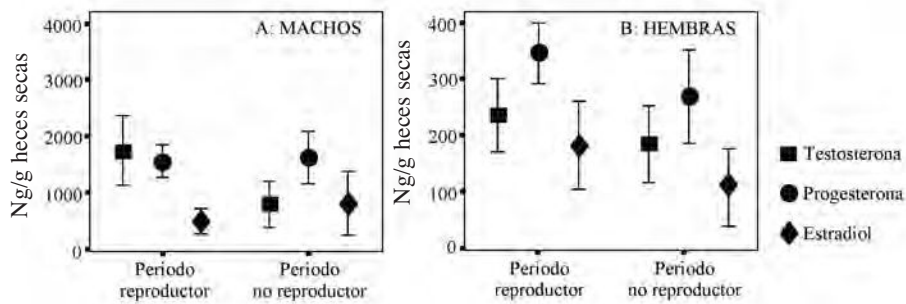
Muestras	Grupos de pertenencia	Distancia <sup>1</sup>	Muestras	Grupos de pertenencia	Distancia <sup>1</sup>
1	3	175,9	31	3	197,3
2	3	319,0	32	3	1.346,1
3	3	253,7	33	3	259,2
4	3	197,9	34	3	209,0
5	3	718,8	35	3	113,8
6	1	881,6	36	3	226,7
7	3	338,5	37	3	278,7
8	3	281,9	38	3	264,3
9	3	271,4	39	2	0,0
10	1	2.146,0	40	3	233,2
11	3	322,7	41	3	658,4
12	3	155,6	42	3	218,2
13	3	513,9	43	3	552,2
14	1	981,9	44	1	726,3
15	3	326,5	45	1	669,5
16	1	931,3	46	1	1.604,6
17	3	193,7	47	1	465,7
18	3	183,5	48	3	450,9
19	3	461,8	49	3	319,6
20	3	394,2	50	3	183,1
21	3	245,2	51	3	2.441,2
22	3	341,5	52	3	952,8
23	3	379,5	53	3	253,7
24	3	278,0	54	3	433,0
25	1	1.087,7	55	3	256,9
26	3	287,5	56	1	863,4
27	1	835,1	57	1	407,0
28	1	1.320,4	58	1	1.411,9
29	1	2.092,7	59	3	255,0
30	1	1.571,2			

**Tabla 1.** Clasificación de las 59 muestras fecales de lobo ibérico según el grupo de pertenencia (1, 2, 3) asignado mediante la realización de un análisis de Conglomerados de k-medias en función de las concentraciones de hormonas esteroides sexuales (Testosterona, Progesterona y Estradiol).

<sup>1</sup>La distancia representa la distancia al centro del grupo de pertenencia. Las distancias dentro de los grupos son pequeñas respecto a las distancias entre grupos.



**Figura 1.** Comparación de las concentraciones de hormonas esteroides sexuales (media  $\pm$  SE) para los grupos 1 y 3. A) Testosterona+Progesterona+Estradiol (T+P+E) y B) Relación entre Testosterona y Progesterona (T/P).



**Figura 2.** Comparación de las concentraciones medias de hormonas esteroides sexuales (media  $\pm$  SE) durante el periodo reproductor y fuera del mismo para A) machos y B) hembras.

## BIBLIOGRAFÍA

- AASEN, E. AND MEDRANO, J.F. (1990): "Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats". *Biotechnology* 8: 1279-1281.
- AMSTRUP, S.C., GARNER, G.W., CRONIN, M.A. AND PATTON, J.C. (1993): "Sex identification of polar bears from blood and tissue samples". *Canadian Journal of Zoology* 71: 2174-2177.
- ASA, C.S. AND VALDESPINO, C. (1998): "Canid reproductive biology: An integration of proximate mechanisms and ultimate causes". *Am Zool* 38: 251-259.
- BAKER, C.S., LAMBERTSEN, R.H., WEINRICH, M.T., CALAMBOKIDIS, J., EARLY, G. AND O'BRIEN, S.J. (1991): "Molecular genetic identification of the sex of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). Report of the Internacional Whaling Commision. Special Issue 13: 105-111.
- BARJA, I., MIGUEL, F.J. AND BÁRCENA, F. (2004): "Importance of the crossroads in faecal marking behaviour of the wolves (*Canis lupus*)". *Naturwissenschaften* 91 (10): 489-492.
- BARJA, I., MIGUEL, F.J. AND BÁRCENA, F. (2005): "Faecal marking behaviour of Iberian wolf in different zones of their territory". *Folia Zoologica* 54(1-2): 21-29.
- BARJA, I. (2001): *La señalización en el lobo ibérico (Canis lupus signatus). Comparación con dos especies de Hienas (Crocuta crocuta y Hyaena hyaena)*. Madrid. Ediciones de la Universidad Autónoma de Madrid.
- BEACH, F.A. (1976): "Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals". *Hormones and behaviour* 7: 105-138.
- BÉRUBÉ, M. AND PALSBOLL, P. (1996): "Identification of sex in cetaceans by multiplexing with three ZFX and ZFY specific primers". *Molecular Ecology* 5: 283-287.
- BISHOP, C.M. AND HALL, M.R. (1991): "Non-invasive monitoring of avian reproduction by simplified faecal steroid analysis. *Journal of Zoology* 224: 649-668.
- BLANCO, J.C. (1998): *Mamíferos de España*. Madrid. Geoplaneta.
- BLANVILLAIN, J.L., BERTHIER, J.L., BOMSEL-DMONTOY, M.C., SEMPÉRÉ, A.J., OLBRICHT, G. AND SCHWARZEMBERG, F. (1997): "Analysis of reproductive data and measurement of fecal progesterone metabolites to monitor the ovarian function in the Pudu *Pudu puda* (Artiodactyla Cervidae)". *Mammalia* 61: 589-602.
- BROWN, M.W., HELBIG, R., BOAG, P.T., GASKIN, D.E., AND WHITE, B.N. (1991): "Sexing beluga whales (*Delphinapterus leucas*) by means of DNA markers". *Canadian Journal of Zoology* 69: 1971-1976.
- BROWN, J.L., WASSER, S.K., WILDT, D.E., AND GRAHAM, L.H. (1994): "Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces". *Biol Reprod* 51: 776-786.
- BROWN, J.L., WILDT, D.E., WIELEBNOWSKI, N., GOODROWE, K.L., GRAHAM, L.H., WELLS, S. AND HOWARD, J.G. (1996): "Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids". *J Reprod Fertil* 106: 337-346.
- BUSSO, J.M., PONZIO, M.F., DABBENE, V., CUNEO, M.F., AND RUIZ, R.D. (2005): "Assessment of urine and fecal testosterone metabolite in *Chinchilla lanigera* males". *Animal Reproduction Science* 86: 339-351.



- CASTROVIEJO, S. (1977): *Estudio sobre la vegetación de la Sierra del Invernadeiro (Ourense)*. Madrid. ICONA.
- COCKREM, J.F. AND ROUNCE, J.R. (1994): "Fecal measurements of oestradiol and testosterone allow the non-invasive estimation of plasma steroid concentration in the domestic fowl". *Br Poultry Sci* 35: 433-443.
- COOK, R.C., COOK, J.G., GARROTT, R.A., IRWIN, L.L. AND MONFORT, S.L. (2002): "Effects of diet and body condition on fecal progesterone excretion in elk". *Journal of Wildlife Diseases* 38(3): 558-565.
- CREWS, D. (1984): "Gamete production, sex hormone secretion, and mating behavior uncoupled". *Hormones and behaviour* 18: 22-28.
- DLONIAK, S.M., FRENCH, J.A., PLACE, N.J., WELDELE, M.L., GRICKMAN, S.E. AND HOLEKAMP, K.E. (2004): "Non-invasive monitoring of fecal androgens in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*)". *General and Comparative Endocrinology* 135: 51-61.
- GARCÍA-MURO, E., AZNAR, M.P., RODELLAR, C. AND ZARAGOZA, P. (1997): "Sex specific PCR/RFLPs in the canine ZFY/ZFX loci". *Animal Genetic* 28: 150-158.
- GERLOFF, U., HARTUNG, B., FRUTH, B., HOHMANN, G. AND TAUTZ, D. (1999): "Intracommunity relationships, dispersal pattern and paternity success in a wild living community of bonobos (*Pan paniscus*) determined from DNA analysis of faecal samples". *Proc R Soc London B Biol Sci* 266: 1189-1195.
- GOMPPER, M.E., GITTLEMAN, J.L. AND WAYNE, R.K. (1998): "Dispersal, philopatry, and genetic relatedness in a social carnivore: comparing males and females". *Molecular Ecology* 7: 157-163.
- GRIFFITHS, R. AND TIWARI, B. (1993): "Sex of the last Spix's macaw". *Nature* 375: 454.
- HASEN, M.M. AND JACOBSEN, L. (1999): "Identification of mustelid species: otter (*Lutra lutra*), American mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*) by analysis of DNA from faecal samples". *Journal of Zoology* 247: 177-181.
- HUGHES, C. (1998): "Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: a revolution results". *ECOLOGY* 79: 383-399.
- KOHN, M.H., YORK, E.C., KAMRADT, D.A., HAUGT, G., SAUVAJOT, R.M. AND WAYNE, R.K. (1999): "Estimating population size by genotyping faeces". *Proc R Soc London B Biol Sci* 266: 657-663.
- LINCOLN, G.A., GUINNESS, F. AND SHORT, R.V. (1972): "The way in which testosterone controls the social and sexual behaviour of the red deer stag (*Cervus elaphus*)". *Hormones and behaviour* 3: 375-396.
- MECH, L.D. (1970): *The wolf: ecology and behaviour of an endangered species*. New York. Natural History Press.
- MECH, L.D. (1974): "*Canis lupus*". *Mammalian Species* 37: 1-6.
- MONFORT, S.L., MASHBURN, K.L., BREWER, B.A. AND CREEL, S.R. (1998): "Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycyon pictus*) by fecal corticosteroid analysis". *J Zoo Wildl Med* 29:129-133.
- MOORE, M.C. (1986): "Elevated testosterone levels during nonbreeding-season territoriality in fall-breeding lizard, *Sceloporus jarrovi*". *Journal of Comparative Physiology A* 158: 159-163.
- MÖSTL, E. AND PALME, R. (2002): "Hormones as indicators of stress". *Dom Anim Endocrinol*



- 23: 67-74.
- MURPHY, M.A., WAITS, L.P. AND KENDALL, C. (2000): "Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis. *Wildl Soc Bull* 28: 951-957.
- PACKARD, J.M. (2003): Wolf Behavior: Reproductive, Social, and Intelligent. Pp. 35-65. In: L.D. Mech and L. Boitani (Eds). *Wolves: Behaviour, Ecology, and Conservation*. London. Chicago Press.
- PIMLOTT, D.H., SHANNON, J.A. AND KOLENOSKY, G.B. (1969): *The ecology of the timber wolf in Algonquin Park*. Ontario. Dept. Lands and Forests.
- PLOTKA, E.D., SEAL, U.S. AND OZAGA, L.G. (1983): "The adrenal gland in white-tailed deer: a significant source of progesterone". *J Wildl Manage* 47: 38-44.
- PRITHIVIRAJ, F. AND DON, J.M. (2001): "Molecular sexing eutherian mammals". *Molecular Ecology Notes* 1: 350-353.
- REED, J.Z., TOLLIT, D.J., THOMPSON, P.M. AND AMOS, W. (1997): "Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces". *Molecular Ecology* 6: 225-234.
- ROBINSON, I.H., DELIBES, M. (1988): "The distribution of faeces by the Spanish lynx (*Felis pardina*)". *Journal of Zoology* 216: 577-582.
- SALAME-MÉNDEZ, A. Y VILLALPANDO-FIERRO, I. (1998): "La diferenciación sexual en vertebrados: hipótesis y teorías". *Acta Zoológica Mexicana* 73: 89-110.
- SCHENKEL, R. (1947): "Expression studies of wolves". *Behaviour* 1: 81-129.
- SEAL, U.S., PLOTKA, E.D., PACKARD, J.M. AND MECH, L.D. (1979): "Endocrine correlates of reproduction in the wolf. I. Serum progesterone, estradiol and LH during the estrous cycle". *Biol Reprod* 21: 1057-1066.
- SHAW, C.N., WILSON, P.J. AND WHITE, B.N. (2003): "A reliable molecular method of gender determination for mammals". *Journal of Mammalogy* 84(1): 123-128.
- SHIDELER, S.E., ORTUÑO, A.M., MORÁN, F.M., MOORMAN, F.M. AND LASLEY, B.L. (1993): "Simple extraction and enzyme immunoassay for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macaca fascicularis* during non-conceptive andceptive ovarian cycles". *Biol Reprod* 48: 1290-1298.
- SOTO, M.A., SALAME-MÉNDEZ, A., RAMÍREZ, A., RAMÍREZ-PULIDO, J., YAÑEZ, L. AND ARMELLA, M.A. (2004): "Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio". *Acta Zoológica Mexicana* 20(2): 187-196.
- STELLFLUG, J.N., MUSE, P.D., EVERSON, D.O. AND LOUIS, T.M. (1981): "Changes in serum progesterone and estrogen of the nonpregnant coyote during the breeding season". *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 167: 220-223.
- VALDESPINO, C., ASA, C.S. AND BAUMAN, J. (2002): "Estrous cycles, copulation and pregnancy in fennec fox (*Vulpes zerda*)". *Journal of Mammalogy* 83: 99-109.
- VELLOSO, A.L., MONFORT, S.K. AND DIETZ, J.M. (1998): "Longitudinal and fecal steroids excretion in Maned wolves (*Chrysocyon brachiurus*)". *General and Comparative Endocrinology* 112: 96-107.
- VILÀ, C., URIOS, V. AND CASTROVIEJO, J. (1994): "Use of faeces for marking in Iberian wolves (*Canis lupus*)". *Canadian Journal of Zoology* 72: 374-377.

- WASSER, S.K., MONFORT, S.L., SHOUTHERS, J. AND WILDT, D.E. (1994): "Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) feces". *J Reprod Fert* 101: 213-220.
- WILSON, P.J. AND WHITE, B.N. (1998): "Sex identification of elk (*Cervus elaphus canadensis*), moose (*Alces alces*) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) using the polymerase chain reaction". *Journal of Forensic Sciences* 43: 477-482.
- YOUNG, K.M., WALKER, S.L., LANTHIER, C., WADDELL, W.T., MONFORT, S.L. AND BROWN, J.L. (2004): "Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses". *Gen Comp Endocrinol* 137: 148-165.
- YOUNG, K.M., BROWN, J.L. AND GOODROWE, K.L. (2001): "Characterization of reproductive cycles and adrenal activity in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) by fecal hormone analysis". *Zoo Biology* 20: 517-536.
- ZIMEN, E. (1975): Social dynamics of the wolf pack. Pp. 336-362. In: M.W. Fox (ed). *The wild canids*. New York. Van Nostrand Reinhold.