



POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Contenido de hormonas esteroides en grasa de ballena azul  
*Balaenoptera musculus* del Golfo de California

## TESIS

que para obtener el grado académico de  
Maestra en Ciencias  
(Biología Marina)

Presenta:

Isis Gabriela Martínez López

Director de Tesis:  
Dra. Diane Gendron

Comité Tutoral:

Dr. Isaías Salgado Ugarte

Dr. Jorge Urbán Ramírez

Dr. Juan Pablo Gallo Reynoso

Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Dr. Arturo Salame Méndez (asesor externo)

*Enero 2009*



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## DEDICATORIA

Para mis papás y hermano por apoyarme de manera incondicional y estar a mi lado en todos mis proyectos. Esta tesis es también de ustedes. ¡Nunca olviden que los quiero mucho!

Para mi sobrino que quiero tanto y que siempre me saca una sonrisa con todas sus ocurrencias.

Rogelio gracias por hacerme reír tanto, por todo tu apoyo y cariño.

Gracias a mis amigos que estuvieron al pendiente de mí y apoyándome a pesar de la distancia.

A aquellas personas que estuvieron y estarán conmigo siempre.



## AGRADECIMIENTOS

Al posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por mi formación académica y apoyo en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Coordinación de Estudios de Posgrado de la UNAM por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Diane Gendron por su entusiasmo y apoyo en todo momento. Muchas gracias por sus aportaciones, sus consejos y su comprensión. Ha sido un privilegio conocerla y poder compartir este logro con usted.

Al Dr. Arturo Salame Méndez por que sin usted este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por su apoyo incondicional, así como permitirme hacer uso de sus instalaciones durante la realización de la tesis. ¡Muchas gracias por su paciencia e invaluable ayuda!

Al Dr. Isaías Salgado y al Dr. Roberto Arreguín por enriquecer este proyecto con sus valiosas aportaciones y por haber estado conmigo este último año. Gracias por todas sus enseñanzas.

Al Dr. Juan Pablo Gallo y al Dr. Jorge Urbán por su colaboración en la revisión de esta tesis.



# Índice de contenidos

CONTENIDO.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ANEXOS.....	VI
ACRÓNIMOS.....	VII
GLOSARIO.....	VIII
RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Distribución, migración y abundancia de la Ballena azul.....	3
La biología reproductiva de la Ballena azul.....	4
Las hormonas esteroides.....	4
Estudios sobre hormonas en mamíferos marinos.....	6
JUSTIFICACIÓN.....	10
HIPÓTESIS GENERAL.....	11
Hipótesis particulares.....	11
OBJETIVOS.....	12
General.....	12
Particulares.....	12
ÁREA DE ESTUDIO.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
Obtención de biopsias.....	16
Selección de biopsias.....	16
Cuantificación de hormonas esteroides.....	17
Extracción total de esteroides.....	17
Inmunoensayo enzimático.....	18
Cromatografía de Gases- Masas.....	19
Resonancia magnética nuclear.....	20
Análisis estadísticos.....	21
RESULTADOS.....	23
Cromatografía de Gases-Masas.....	23
Análisis de densidad por Kernel.....	25
Correlación entre hormonas.....	26
Historial de avistamientos.....	30
Concentración de hormonas esteroides en hembras de ballena azul y su relación con el estado reproductivo.....	34
Concentración de hormonas esteroides en machos de ballena azul y su relación con el estado reproductivo.....	41
Variación de las hormonas esteroides en las ballenas azules.....	46
DISCUSIÓN.....	52
Concentraciones de hormonas esteroides en ballenas azules.....	54
CONCLUSIONES.....	61
RECOMENDACIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXOS.....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla I. Correlación entre las hormonas esteroides (ng/gr tejido) en grasa de ballenas azules en el Golfo de California. Datos en Log <sub>10</sub> .	27
Tabla II y III. Concentración promedio de las hormonas esteroides (ng/gr tejido) en grasa de una hembra lactante y hembra madura de ballenas azules foto-identificadas en el Golfo de California avistadas en dos ocasiones.	31
Tabla IV y V. Concentración promedio de las hormonas esteroides (ng/gr tejido) en grasa de un macho cría y después como inmaduro, así como de un macho puberto y después como maduro.	32
Tabla VI. Historial de avistamiento de las ballenas azules del Golfo de California, con información sobre sexo, número de biopsia y edad mínima basada en el año de primer avistamiento. M= madura o maduro, In= inmaduro, P= puberto, L= lactante, C=cría. Cuadros gris claro = año avistado; gris oscuro = año de la toma de biopsia.	33
Tabla VII. Concentración promedio de las hormonas esteroides (ng/gr tejido) en grasa de hembras de ballenas azules foto-identificadas en el Golfo de California referentes al estado reproductivo.	34
Tabla VIII. Mediana y media de las concentraciones de hormonas esteroides en hembras de ballenas azules por categoría y la diferencia entre ambas.	36
Tabla IX. Concentración promedio de las hormonas esteroides (ng/gr tejido) referentes al estado reproductivo en machos de ballenas azules foto-identificadas en el Golfo de California.	42
Tabla X. Mediana y media de las concentraciones de hormonas esteroides en hembras de ballenas azules por categoría y la diferencia entre ambas.	44
Tabla XI. Eigenvalores y porcentaje de variación total en los componentes del ACP.	47
Tabla XII y XIII Análisis discriminante: sexo contra andrógenos, progestágenos, estrógenos y glucocorticoides.	48

Tabla XIV, XV y XVI. Análisis discriminante: estado reproductivo en hembras contra andrógenos, progestágenos, estrógenos y glucocorticoides.	49
Tabla XVII. Observaciones de hembras asignadas incorrectamente por el análisis discriminante.	50
Tabla XVIII, XIX y XX. Análisis discriminante: estado reproductivo en machos contra andrógenos, progestágenos, estrógenos y glucocorticoides.	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Regiones, cuencas y plataforma continental del Golfo de California. Las zonas sombreadas indican la isobata del umbral mas profundo. Tomado de Lavín, M.F., Beber, E. y Badan, A.. 1997. Estructura hidrográfica y circulación del Golfo de California. Escalas estacional e interanual, en: M.F. Lavín, editor. <i>Contribuciones a la Oceanografía Física en México</i> . Monografía No. 3. Unión Geofísica Mexicana. p. 142.	15
Figura 2. Espectro de masas de progesterona (Pregn-4-ene-3, 20 dione) utilizado como referencia para la identificación de los picos.	23
Figura 3. Espectro de masas a partir de grasa de hembra lactante de ballena azul (ID 0451; Biopsia 456).	23
Figuras 4 y 5. Comparación entre las concentraciones de progestágenos y andrógenos obtenidas por el método de EIA y cromatografía Gases-Masas en grasa de ballenas azules, hembras maduras (Ma), lactantes (L), crías (CH), machos maduros (Mo), pubertos (P) y crías (CM).	24
Figuras 6 y 7. Análisis de densidad por Kernel para la sumatoria de las hormonas cuantificadas ( $\Sigma$ PAEG; progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides) sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con amplitud de banda óptima de Silverman (a) y con amplitud óptima Gaussiana de Scott (b). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración ng/gr de tejido.	25
Figuras 8 y 9. Análisis de densidad por Kernel para la sumatoria de las hormonas cuantificadas ( $\Sigma$ PAEG, progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides) sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con amplitud de banda óptima de Silverman (a) y con amplitud óptima Gaussiana de Scott (b). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración ng/gr de tejido transformada a Log 10.	26
Figura 10. Relación entre las hormonas esteroideas cuantificadas en grasa de ballenas azules del Golfo de California.	27
Figura 11. Relación entre los andrógenos y estrógenos con respecto al sexo en grasa de ballenas azules del Golfo de California.	29

Figura 12. Concentración de andrógenos y estrógenos en hembras y machos de ballenas azules del Golfo de California.	30
Figuras 13, 14, 15 y 16. Concentraciones de hormas esteroides en grasa de hembras lactantes, maduras y de las que se desconoce su estado, de ballenas azules en el Golfo de California. La línea dentro de la caja representa el 50% de los datos y la caja abarca el 25-75%, mientras que los bigotes representan los valores mínimos y máximos. Los puntos representan datos extraordinarios (outliers).	33
Figura 17 y 18. Mediana y media de la concentración de andrógenos por categoría en hembras. Cría (C), lactante (L), madura (Ma) y sin categoría (SinH).	37
Figura 19. Gráfica de las concentraciones de a) glucocorticoides b) progestágenos c) estrógenos y d) andrógenos en grasa de hembras maduras y desconocidas de ballenas azules, en el Golfo de California en relación a los meses de muestreo.	38
Figuras 20, 21, 22 y 23. Concentración de a) estrógenos b) andrógenos y c) glucocorticoides y d) progestágenos en grasa de hembras maduras y desconocidas de ballena azul en el Golfo de California. El día uno se considera el 29 de enero.	40
Figura 24. Concentraciones de esteroides en grasa de una hembra lactante y su cría.	41
Figuras 25, 26, 27 y 28. Concentraciones de hormonas esteroides en grasa de machos maduros, inmaduros, pubertos y de los que se desconoce su estado, de ballenas azules en el Golfo de California. La línea dentro de la caja representa el 50% de los datos y la caja abarca el 25-75%, mientras que los bigotes representan los valores mínimos y máximos. Los puntos representan datos extraordinarios (outliers).	43
Figuras 29 y 30. Mediana y media de la concentración de andrógenos por categoría en machos. Cría (C), inmaduro (In), maduro (Mo) y sin categoría (SinM).	45
Figura 31. Gráfica de las concentraciones de a) glucocorticoides b) progestágenos c) estrógenos y d) andrógenos en grasa de machos de ballena azul en el Golfo de California en relación a los meses de muestreo.	46
Figura 32. Ordenación de los individuos de ballena azul en función de las variables activas (H= Hembra, M= Macho).	47

## ANEXOS

	Páginas
ANEXO I. Resultados para el análisis por densidad de Kernel para las hormonas cuantificadas (ng/gr tejido) y después de su transformación a Log 10, sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California.	72
ANEXO II. Análisis de regresión robusta para progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides en ballenas azules del Golfo de California.	77
ANEXO III. Concentración de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides en grasa de hembras y machos de ballenas azules <i>Balaenoptera musculus</i> del Golfo de California (concentraciones en ng/gr de tejido).	80
ANEXO IV. Gráficas de violín que representan las medianas de las concentraciones de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides (Log 10) en hembras de ballena azul.	82
ANEXO V. Gráficas de violín que representan las medianas de las concentraciones de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides (Log 10) en machos de ballena azul.	84
ANEXO VI. Espectros de masas utilizados como referencia para la identificación de los picos de las hormonas esteroides.	86
ANEXO VII. Espectros de masa para la identificación de hormonas esteroides en 6 biopsias de grasa de ballenas azules del presente estudio.	88
ANEXO VIII. Comparación de las concentraciones obtenidas por el método de Inmunoensayo enzimático y de Cromatografía Gases-Masas.	91



## ACRÓNIMOS

ACP: Análisis de componentes principales.

CV: Coeficiente de variación.

EIA: Inmunoensayo enzimático.

ETE: Extracto total de esteroides.

E<sub>2</sub>: Estradiol.

FSH: Hormona folículo estimulante.

GC-MS.: Cromatografía de Gases Masas.

GC: Glucocorticoides.

GnRH: Factor liberador de gonadotropinas.

HES: Hormonas esteroides sexuales.

LH: Hormona luteinizante.

Log<sub>10</sub>: Logaritmo base 10.

P<sub>4</sub>: Progesterona.

T: Testosterona.



## GLOSARIO

**Análisis de densidad por Kernel:** Son un método de estimación de densidad que permite solucionar las limitantes de otros análisis de distribución de datos como los histogramas y los polígonos de frecuencia. Las limitantes de dichos métodos incluyen el punto de origen, la discontinuidad y el ancho de banda/intervalo fija/o.

**Ballena madura:** Individuo foto-identificado con una edad mínima de 5 años, edad considerada a partir de una hembra conocida desde cría, y que a la edad real de 5 años fue vista con su propia cría (Gendron, Com. Pers).

**Ballena lactante:** Ballena en periodo de lactancia caracterizada por estar acompañada de una cría.

**Cría:** Ballena recién nacida o con una edad menor a 7 meses, se encuentra acompañada de un adulto, que suponemos es su madre.

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

**EIA:** Es un método que utiliza una enzima unida covalentemente a un anticuerpo como marcador, se utiliza para la determinación cuantitativa de sustancias químicas a partir de las propiedades específicas de la unión entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo.

**Espectro de masas:** Es un gráfico de barras, en el que cada una de las barras corresponde a un ión. La información proporcionada incluye la relación masa/carga ( $m/z$ ) y la intensidad relativa de cada señal.

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



Gónadas: Son los órganos reproductores, los cuales producen los gametos, o células sexuales. También desempeñan una función hormonal, por lo cual también se les llama glándulas genitales.

Hormonas esteroideas: Son hormonas lipofílicas derivadas del núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno y son sintetizadas a partir del colesterol. En los mamíferos cumplen importantes funciones como de regulación, estructurales y hormonales.

Hormonas de referencia: Hormonas esteroideas utilizadas para contrastar sus espectros con los espectros obtenidos para muestras de ballena azul y de esta forma identificar los picos de cada una de las hormonas esteroideas.

Rango de sensibilidad: Es el límite mínimo de detección de un sistema, en este caso del inmunoensayo enzimático.

## RESUMEN

El presente trabajo evalúa el potencial de la cuantificación de las hormonas esteroides como indicadores del estado reproductivo de las ballenas azules del Golfo de California. Se cuantificaron los contenidos hormonales de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides por medio de la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) en 71 biopsias de grasa de ballenas azules foto-identificadas a lo largo del Golfo de California entre enero y abril de las temporadas 2002 a 2008, y de las cuales se tienen datos de sexo, edad mínima y en algunos casos el estado reproductivo. Los resultados mostraron asociaciones entre las hormonas esteroides, así como diferencias en las concentraciones con respecto al sexo. Se encontró una proporción andrógenos/estrógenos mayor en hembras con respecto a los machos. También se presentó una diferencia significativa en la concentración de glucocorticoides ( $n=77$ ;  $H=10.79$   $P=0.0010$ ), siendo los machos quienes presentaron las mayores concentraciones. Con respecto al estado reproductivo, las crías tuvieron las mayores concentraciones y variaciones para todas las hormonas esteroides, mientras las hembras lactantes, formaron el grupo más homogéneo con las menores variaciones intra grupo, siendo más evidente en los progestágenos y los estrógenos. Las relativamente bajas concentraciones de progestágenos cuantificadas en las hembras sugieren que ninguna de las 34 hembras analizadas pudiera estar preñada. En los machos se observó una tendencia hacia una menor concentración de los andrógenos en relación al estado reproductivo, donde las crías mostraron la mayor concentración y los machos maduros las menores concentraciones. Dentro de las muestras analizadas, se encuentra la de una madre y su cría, las cuales presentaron concentraciones muy similares para todas las hormonas cuantificadas, indicando la transferencia de hormonas vía lactancia. Finalmente, los resultados obtenidos fueron validados mediante análisis por Cromatografía Gases-Masas en muestras representativas para cada estado reproductivo, verificando así la presencia de las hormonas esteroides en la grasa de la ballena azul. El contenido de hormonas esteroides en este trabajo es similar al reportado para la ballena franca (*Eubalaena glacialis*) y representa el primer trabajo sobre valoración de hormonas esteroides para la ballena azul.



## SUMMARY

The present study assesses the potential of steroids hormones quantification as indicators of the reproductive status of blue whales in the Gulf of California. Progestins, androgens, estrogens and glucocorticoids were quantified using enzyme immunoassay kits (EIA) in 71 biopsies of fat of photo-identified blue whales obtained along the Gulf of California between January and April 2002 to 2008 and from which we have data of sex, minimum age and in some cases their reproductive status. The results showed associations between steroids hormones as well as differences in the concentrations with respect to sex. The ratio of androgen to estrogen concentration was higher in females compared to males. A significant difference in the concentration of glucocorticoids ( $n=77$ ;  $H = 10.79$   $P= 0.0010$ ) was found with males having the highest concentrations. With regard to reproductive status, calves had the highest concentrations and variations for all steroids hormones, while lactating females formed the most homogeneous group with the lowest intra-group variation, being more evident in the estrogens and progestins. The relative low progestins' concentrations in the females, suggest that none of the 34 females analyzed were pregnant. In the males, there was a trend towards lower concentrations of androgens with respect to reproductive status with the calves showing the highest concentrations, and the mature males the lowest concentrations. Among the samples, there were samples from a female and her calf that showed very similar concentrations for all quantified hormones, indicating the transfer of these hormones via milk fat. Finally, the results were validated by the analysis Gas Chromatography-Mass Spectrometry on representative samples of each reproductive category verifying in that way the presence of steroid hormones in the fat of the blue whale. The content of steroids hormones in blue whale fat biopsies is also similar to that reported in the right whale (*Eubalaena glacialis*) and it represents the first study on the content of steroids hormones in the blue whale.



## INTRODUCCIÓN

La ballena azul (*Balaenoptera musculus*), la más grande de las ballenas barbadas (Familia Balaenopteridae), es una especie con una distribución cosmopolita. Realiza una migración anual que va de zonas de alimentación en latitudes altas durante el verano, hacia zonas de alta productividad en latitudes bajas durante el invierno (Reeves *et al.*, 1998). Al igual que ocurre con otros balenopteridos, los hábitos migratorios de la ballena azul, gran velocidad de nado, y agregaciones en grupo poco frecuentes, han limitado su estudio, por lo que existe poca información sobre su historia de vida (Gendron, 2002).

El Golfo de California (GC) representa una zona de gran importancia para la ballena azul ya que es una zona de congregación durante el invierno, donde la especie se alimenta y lleva a cabo actividades reproductivas como crianza y posiblemente apareamiento (Yohem y Leatherwood, 1985; Gendron, 2002). Lo anterior ha permitido obtener información así como inferir algunos parámetros poblacionales de la especie mediante la técnica de foto-identificación, sin embargo, su distribución oceánica y hábitos poco gregarios, limitan el alcance de esta técnica (Gendron, 2002).

Con respecto a la biología reproductiva de la ballena azul mucho de lo que se conoce actualmente se debe a parámetros reproductivos que fueron obtenidos durante el periodo de la caza moderna, hasta su protección por la Comisión Internacional Ballenera (IWC) en 1965 (Reeves *et al.*, 1998). Información más reciente, es la obtenida por Gendron (2002) para las ballenas azules del GC, donde se obtuvieron algunos parámetros poblacionales como la tasa reproductiva anual, la proporción entre sexos y el intervalo de crianza. Pero como ocurre con gran parte de las especies en vida libre y en particular con los cetáceos, la obtención de datos para la ballena azul que permitan responder cuestiones relacionada con su reproducción es aún escasa.

En la actualidad, una alternativa para describir procesos endocrinos, mismos que reflejan respuestas fisiológicas y conductuales como aquellas que ocurren durante la reproducción, es la cuantificación de hormonas esteroides como por ejemplo en excretas de animales de vida silvestre (Pietraszek y Atkinson, 1994; Voigt *et al.*, 2004) y grasa



(Tsujioka, 1992), por mencionar algunos ejemplos. Sin embargo, esta técnica ha sido poco utilizada en estudios de cetáceos, ya que sus hábitos acuáticos y su comportamiento, restringen la toma de muestras para valoración hormonal (Rolland *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2006).

Otra forma de obtener muestras en cetáceos, es la toma de biopsias de piel y tejido graso. El tejido adiposo en la ballena azul, como en otros mamíferos, acumula sustancias lipofílicas, contaminantes plaguicidas organoclorados y bifenil policlorados (Metcalf *et al.*, 2004; Valdez-Márquez *et al.*, 2004; Flores-Lozano, 2006), así como hormonas (Mansour *et al.*, 2002; Kellar *et al.*, 2006). Estos últimos estudios mostraron una relación entre altas concentraciones de progesterona y la gravidez en cetáceos.

El presente trabajo explora el uso de biopsias para la descripción del contenido de hormonas esteroides en grasa de ballena azul del Golfo de California, lugar de importancia por ser reconocido como una zona de crianza para la población del Pacífico Noreste y donde se observan hembras lactantes con sus crías, hembras y machos adultos e inmaduros (Gendron, 2002). Este trabajo evalúa los contenidos hormonales en muestras de grasa de 71 ballenas azules que visitaron el GC durante las temporadas 2002-2008. Con base en los historiales de vida de los individuos foto-identificados por un monitoreo continuo realizado por el CICIMAR-IPN desde 1993, se consideran además aspectos biológicos de edad mínima, sexo y en el caso de las hembras, lactancia por la presencia de crías.

## ANTECEDENTES

### Distribución, migración y abundancia de la Ballena Azul

La ballena azul presenta una distribución cosmopolita. En el Pacífico Nororiental se distribuye desde la región sur de las Islas Aleutianas y el Golfo de Alaska hasta la región del Domo de Costa Rica (Reilly y Thayer, 1990; Reeves *et al.*, 1998).

Las ballenas azules que visitan aguas mexicanas durante el invierno, se distribuyen principalmente en la costa occidental de la Península de Baja California (BC) y el Golfo de California (GC) (Gendron, 2002). Éstos movimientos dentro y fuera del Golfo están claramente relacionados con un cambio en la productividad del océano en la región (Gendron, 2002). En contraste, las mayores concentraciones durante el verano se registran en la costa central de California donde se alimentan (Fiedler *et al.* 1998).

El Golfo de California es reconocido como una zona de crianza y probablemente de nacimiento para la ballena azul, idea que se ve fortalecida por el hecho de que se cuenta con el registro fotográfico de una ballena azul que nació durante el invierno de 2006 en el Golfo de California (GC) (Gendron, Com. Pers. \*). Las madres lactantes y sus crías se encuentran dentro del Golfo de California entre diciembre y mayo, prefiriendo las zonas cercanas a la costa; al igual que otras ballenas barbadas (Gendron, 2002).

El comportamiento reproductivo de la Ballena Azul ha sido poco estudiado hasta el momento, sobretodo en lo que respecta al comportamiento de cortejo (*i. e.*, parejas o tríos). Sin embargo, con base en lo que se sabe sobre el tiempo de gestación, el intervalo de crianza y la alta ocurrencia de pares de individuos en la costa oeste de la Península de Baja California en comparación con el GC, se sugiere que el periodo de cortejo y apareamiento ocurre en los meses de marzo y abril, cuando las ballenas salen del GC y se dirigen hacia la costa occidental de la península (Gendron, 2002).

\*Diane Gendron, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, Apdo. Postal 592, La Paz, Baja California Sur, México. C. p. 23096.

## La Biología reproductiva de la Ballena Azul

Su periodo de reproducción es aproximadamente de seis meses sin que se presenten periodos intermedios, aunque, basado en el tamaño de los fetos y temporada de capturas, se ha sugerido también que las ballenas azules quizás no tuvieran un periodo de reproducción marcado, sino que pudiera ocurrir durante todo el año (Tomilin, 1967). Las hembras paren una cría cada dos o tres años tras un periodo de gestación de 10 a 12 meses (Lockyer, 1984), al cabo del cual las crías nacen entre 6 y 7m de longitud y son destetadas cuando miden aproximadamente 16m; longitud que corresponde a individuos de aproximadamente 6-7 meses de edad (Lockyer, 1984). El destete ocurre probablemente durante la migración hacia las zonas de alimentación (Yochem y Leatherwood, 1985).

La edad de madurez sexual no ha sido establecida con precisión, sin embargo se estima entre los 5-15 años; aunque se piensa que lo más común es que alcancen la madurez sexual entre los 8 y los 10 años para ambos sexos (Sears, 2002). Esto se corroboró cuando se registró por primera vez a una hembra foto-identificada como cría en el Golfo de California, la cual fue foto-recapturada 5 años después con su propia cría (Gendron, *et al.*, 2006). La longitud a la cual las ballenas azules alcanzan la madurez sexual varía entre ambos hemisferios. En el Hemisferio Norte, las ballenas que han alcanzado la madurez presentan una longitud que va de los 21-23m para hembras y 20m en los machos. En contraste, en el Hemisferio Sur la longitud que alcanzan las ballenas sexualmente maduras varía entre los 23-24m para las hembras y los 22m para los machos (Sears, 2002).

## Las hormonas esteroides

Las hormonas esteroides son compuestos de naturaleza lipídica, se caracterizan por una estructura básica de cuatro anillos fusionados llamados ciclopentanoperhidrofenantreno, la diferencia entre cada una de las hormonas esteroides radica en la estructura de sus cadenas laterales (Senger, 2003). Tienen como precursor al



colesterol (molécula de 27 átomos de carbono), y son sintetizadas a partir de éste vía acción enzimática (Senger, 2003).

La progesterona ( $P_4$ ) se biosintetiza a partir de la pregnenolona en las células esteroidogénicas, la cual además de tener funciones biológicas, actúa como prohormona para la formación de otras hormonas esteroides como los corticosteroides en las glándulas adrenales, y los andrógenos en las gónadas (Yen *et al.*, 2001; Senger, 2003). A su vez, el andrógeno testosterona (T), actúa como metabolito intermediario para la formación de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), principal hormona sexual femenina, por medio de un proceso de síntesis llamado aromatización (Yen *et al.*, 2001).

Las hormonas esteroides cumplen la función de un regulador biológico ya sea estimulando o inhibiendo procesos bioquímicos en el organismo; son sintetizadas y secretadas en las glándulas adrenales, las gónadas, la placenta, y el cerebro (Kardong, 1999). Son transportadas por medio del torrente sanguíneo para ejercer un efecto específico en otro tejido u órgano blanco, ya sea de forma libre, o bien, unidas a una proteína plasmática (Yen *et al.*, 2001).

Los glucocorticoides son hormonas esteroides sintetizados por las glándulas adrenales, dentro de estos se encuentra el cortisol, hormona cuya producción es estimulada por el estrés físico, emocional o psicológico, así como por la hipoglucemia (Turner *et al.*, 2003; Okeudo y Moss, 2005). Dentro de sus funciones biológicas se encuentra el metabolismo de los hidratos de carbono y mantenimiento de la lactancia (Stelwagen *et al.*, 1998; Kardong, 1999).

Las hormonas esteroides sexuales (HES), por otro lado, son las encargadas de regular la actividad reproductiva, ya que producen cambios en diversos tejidos, así como en el comportamiento de los individuos (Salame-Méndez *et al.*, 2003(a)). La  $P_4$  es un esteroide producido en las gónadas, glándulas suprarrenales y la placenta. Cuando es producida por el cuerpo lúteo, y durante el embarazo por la placenta, tiene como funciones biológicas permitir la implantación del ovocito fecundado, y el mantenimiento del embarazo (Senger, 2003; Salame-Méndez *et al.*, 2004). Entre sus otras funciones se



encuentra la estimulación de la glándula mamaria durante la lactancia, la estimulación de la temperatura corporal basal; junto con los estrógenos induce el comportamiento sexual, y en concentraciones elevadas inhibe el estro (Senger, 2003).

El  $E_2$  promueve el desarrollo folicular y actúa como un factor luteotrópico, luteolítico, o ambos. El  $E_2$  y la  $P_4$ , coordinadamente con las gonadotropinas (hormona estimulante del folículo, FSH y hormona luteinizante LH, por sus siglas en inglés respectivamente) regulan el ciclo estral o menstrual que consta de foliculogénesis y ovulación. Además, el  $E_2$  junto con la  $P_4$  facilitan la migración del embrión por el endometrio (Salame-Méndez *et al.*, 2003(b)).

La testosterona al igual que otras hormonas esteroides, regula diversos procesos biológicos; su producción se coordina con el sistema nervioso central por medio del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Andrógenos como la T provocan en el hipotálamo la secreción del factor liberador de gonadotropinas (GnRH), que en la hipófisis regula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La FSH y la T coordinan la espermatogénesis en las células de Sertoli y la LH la producción de T en las células de Leydig (Salame-Méndez *et al.*, 2003(b)). La T además, actúa en el establecimiento de los órganos accesorios y estimula el crecimiento corporal modulando el desarrollo muscular y óseo. Asimismo esta hormona regula, junto con otras hormonas, el despliegue de la conducta sexual (Salame-Méndez *et al.*, 2003(a)).

#### Estudios sobre hormonas en mamíferos marinos

La mayor parte de los estudios que existen sobre hormonas en mamíferos marinos han sido realizados en pinnípedos mediante análisis sanguíneos (Boyd 1984; Reijnders 1990; Atkinson y Gilmartin, 1992). Además de estos estudios se han utilizado otras técnicas en muestras de orina, saliva, citologías vaginales y conductividad eléctrica; las cuales reflejan cambios fisiológicos asociados con los ciclos estrales (Robeck *et al.*, 1993; Pietraszek y Atkinson, 1994). Sin embargo, aunque estos métodos son exactos para determinar el estado reproductivo, no todos se pueden utilizar fácilmente en el estudio de animales en vida libre (Pietraszek y Atkinson, 1994).



En lo que respecta a la reproducción en cetáceos la mayor parte de la información disponible proviene de estudios realizados a partir de cortes histológicos de gónadas, mediciones de la masa gonadal o información sobre órganos sexuales de individuos varados o capturados por actividades de pesquería (Slijper, 1979; Martin *et al.*, 1987). Por ello la determinación de las concentraciones de hormonas sexuales para caracterizar y especificar la función reproductiva apenas han sido desarrolladas debido a la dificultad que representa la toma de biopsias (Desportes *et al.*, 1994).

Pese a esta dificultad inherente a la toma de biopsias en cetáceos que se encuentran en vida libre, la reciente aplicación de nuevas técnicas, como el radioinmunoensayo para la detección en sangre de hormonas gonadales y de la pituitaria, ha favorecido el incremento en el conocimiento disponible sobre la fisiología de la reproducción de cetáceos. Por ejemplo, el estudio semanal de muestras de sangre tomadas en delfines mantenidos en condiciones de cautiverio, ha probado ser de gran utilidad para describir las concentraciones hormonales en eventos tales como la ovulación y la gravidez (Sawyer-Steffan *et al.*, 1983). Asimismo, otras técnicas como la aplicada por Robeck *et al.* (1993), han servido para determinar algunos parámetros reproductivos a partir del monitoreo diario de metabolitos esteroides y gonadotropinas en orina, obtenidas de orcas (*Orcinus orca*) mantenidas en condiciones de cautiverio, donde gracias a un análisis diario de las muestras de orina, llevado a cabo durante varios ciclos estrales, se determinó que la duración promedio del ciclo estral para esta especie es de  $41.6 \pm 6.72$  días.

En otro estudio, dado que los cambios en la masa testicular y la concentración de hormonas se relacionan con el estado gonadal desde el nacimiento hasta la adultez, Desportes *et al.* (1994) determinaron las concentraciones de testosterona en plasma en machos de ballenas piloto (*Globicephala melas*), y las relacionaron con el peso de la masa testicular; encontrando que en individuos jóvenes, las concentraciones de testosterona fueron indetectables (menos de  $1\text{ ng ml}^{-1}$ ), mientras que para individuos adultos las concentraciones fueron muy variables (desde  $1\text{ ng ml}^{-1}$  a  $22\text{ ng ml}^{-1}$ ).



Entre los estudios realizados en misticetos, se encuentra el realizado por Olafsson y Kjeld (1986), quienes determinaron por medio de la técnica de Radioinmunoensayo (RIA) niveles hormonales en ballenas de aleta (*Balaenoptera physalus*). A partir de muestras de sangre en individuos obtenidos por la caza comercial, se determinó la utilidad de la cuantificación hormonal en la evaluación del desarrollo sexual, y la gravidez en esta especie. Encontraron que las concentraciones de testosterona en el suero (0.1 – 24.2 nmol/L) reflejan la actividad gonadal en los machos, mientras que las concentraciones de progesterona (0.1 - 135 nmol/L) reflejan la actividad de cuerpos lúteos en los ovarios, y de la placenta, mismas que fueron utilizadas para dividir a las hembras en tres grupos: hembras de todas tallas, inmaduras y algunas que pudieron ser maduras (0.1 – 1.0 nmol/L); hembras de tallas más grandes, maduras pero no grávidas (1.1 – 10.0 nmol/L); y hembras con fetos (> 10.1 nmol/L).

La determinación de hormonas sexuales para esta especie fue nuevamente realizada por Kjeld *et al.* (1992), los cuales permitieron concluir que las concentraciones de estas hormonas pueden ser valiosas en la estimación de parámetros reproductivos para ballena de aleta. Entre los resultados que obtuvieron, altas concentraciones de progesterona (10 nmol/L) fueron indicativos de gravidez, mientras que valores inferiores a 0.1 (nmol/L) correspondieron probablemente a hembras jóvenes sexualmente inmaduras.

La evaluación de hormonas por medio de técnicas no invasivas ha sido ampliamente utilizada (Wasser *et al.*, 1996; Dloniak *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2004; Sanson *et al.*, 2005) sin embargo, su aplicación en mamíferos acuáticos ha sido muy limitada.

Mediante la misma técnica utilizada por Kjeld *et al.* (1992), pero aplicada en excretas de cetáceos Rolland *et al.* (2005) realizaron la cuantificación de metabolitos de hormonas sexuales (progestágenos, andrógenos y estrógenos) en heces fecales de ballena franca (*Eubalaena glacialis*). Comparando los resultados con aquellos obtenidos por foto-identificación, encontraron que la cuantificación de estas hormonas puede ser utilizada en la evaluación de su estatus reproductivo. Hunt *et al.* (2006) evaluaron para la misma especie la confiabilidad de utilizar la cuantificación de metabolitos de glucocorticoides (corticosterona y cortisol) en heces fecales, así como la relación entre la concentración de



estos metabolitos con el género, edad, y estatus reproductivo de individuos con historias de vida conocidas. Los resultados demostraron que esta cuantificación es de utilidad para diferenciar entre edades, sexos y categorías, además de que estos metabolitos presentan una alta asociación con las hormonas sexuales.

El tejido adiposo es un tejido dinámico que puede reflejar el estado nutricional y la historia de vida de los individuos. Se conoce además que este tejido acumula hormonas esteroides (Hamudikuwanda *et al.*, 1996). Lo anterior ha llevado a que recientemente se considere la cuantificación de algunas hormonas como la progesterona en la grasa obtenida a partir de biopsias como una alternativa práctica en la determinación del estado de gravidez en cetáceos de vida libre. Mansour *et al.* (2002) evaluaron la concentración de progesterona en grasa a partir de organismos capturados de ballenas minke (*Balaenoptera acutorostrata*). Determinaron que altas concentraciones de progesterona permiten diferenciar entre hembras grávidas y aquellas que no lo están. Posteriormente, Kellar *et al.* (a)(2006) utilizaron igualmente grasa para determinar por medio de la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) los niveles de progesterona en tres especies de delfines. Encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de hembras grávidas y aquellas que no lo estaban; además, encontraron que la concentración de dicha hormona no depende de la zona del cuerpo de la cual se obtiene la biopsia. Posteriormente, estos mismo autores (Kellar *et al.*, 2006 (b)) evaluaron las concentraciones de testosterona para delfines machos, encontrando una relación de esta hormona con el estado reproductivo.



## JUSTIFICACIÓN

La biología reproductiva de los cetáceos, así como los procesos endocrinos involucrados en ello han sido poco estudiados, siendo que esta información es parte básica de la historia de vida de las especies, y por lo tanto, su estudio es crítico para la conservación y manejo de poblaciones de vida silvestre. Gran parte de la información sobre la endocrinología de los cetáceos provienen de estudios realizados en organismos en cautiverio o bien de aquellos varados u obtenidos por la pesca incidental. En lo que respecta al grupo de los balenopteridos, los estudios al respecto son aún más escasos debido a sus hábitos migratorios y poco gregarios. El reciente desarrollo de técnicas no invasivas para la cuantificación hormonal, ha permitido obtener algunos datos sobre la endocrinología de este grupo, sin embargo no existen aún datos para la ballena azul. Por tal motivo, este trabajo presenta los primeros datos sobre valoración de hormonas esteroides en ballena azul *Balaenoptera musculus*. Los datos corresponden al Golfo de California que representa una zona de crianza, y donde se cuenta con registros de individuos de los cuales se conoce su historia de vida y en algunos casos su estatus reproductivo, por lo que ofrecen la valiosa oportunidad de unir estos datos con datos fisiológicos, y en consecuencia, evaluar la utilidad y eficiencia de métodos no invasivos (como la cuantificación de hormonas por inmunoanálisis enzimático en grasa) como una herramienta práctica en el estudio de poblaciones de esta especie. De esta forma, este trabajo contribuirá al conocimiento de la biología reproductiva de la ballena azul.



## HIPÓTESIS GENERAL

En las ballenas azules (*Balaenoptera musculus*) presentes en el Golfo de California durante su temporada invernal (enero a abril), se encontrarán diferencias en el contenido de progestágenos, andrógenos y estrógenos en grasa, de acuerdo al género, edad y estatus reproductivo.

## PARTICULARES

- En las hembras maduras de ballena azul durante su temporada invernal (enero a abril), se encontrarán concentraciones mayores de estrógenos y progestágenos en comparación con hembras inmaduras sexualmente.
- En los machos maduros de ballena azul durante la temporada invernal (enero a abril) se encontrará una mayor concentración de andrógenos que en los machos sexualmente inmaduros.



## OBJETIVOS

### GENERAL

Valorar los contenidos de hormonas esteroides en biopsias de grasa de ballenas azules (*Balaenoptera musculus*) del Golfo de California durante la temporada de crianza (enero-abril) mediante un ensayo inmunoenzimático.

### PARTICULARES

- Valorar el contenido de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides en hembras lactantes, no lactantes y crías hembras.
- Discernir entre las hembras no lactantes aquellas que pudieran estar grávidas por medio del contenido diferencial de progestágenos y estrógenos, así tener un método para determinar la gravidez.
- Valorar el contenido de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides en machos adultos, pubertos, inmaduros y crías.
- Discernir entre los machos maduros y aquellos que no lo están por el contenido diferencial de andrógenos.

## ÁREA DE ESTUDIO

El Golfo de California (GC) se localiza entre las latitudes 23° norte hasta 32° norte, limitado al oeste por la Península de Baja California, y al este por los estados de Sonora y Sinaloa, con una orientación noroeste-sureste. El Golfo se extiende desde la boca hasta la desembocadura del río Colorado en una distancia aproximada de 1000Km, separándose en dos provincias fisiográficas y oceanográficas por las islas Ángel de la Guarda y Tiburón (Álvarez- Borrego, 1983; Álvarez- Borrego y Schwartzlose, 1979). El Alto Golfo, situado al norte de estas grandes islas, representa un cuerpo de agua somero de 300 Km de largo y 125 Km de ancho, con un 75% del área con profundidades menores a los 200 m. La parte sur, consiste en una serie de cuencas que aumentan progresivamente en profundidad, desde los 2000 m en la cuenca de Guaymas hasta los 3000 m en la boca del Golfo. La estructura termohalina de la parte sur del Golfo es básicamente igual a la del Pacífico Ecuatorial, con modificaciones en la superficie debido a la evaporación (Roden, 1964).

La temperatura superficial del agua en el GC es más cálida que en las regiones de latitudes similares durante abril-septiembre, y es similar durante el resto del año. El intervalo anual es muy grande hasta 22 °C en la región norte del Golfo (Álvarez- Borrego, 1983).

La circulación superficial general está fuertemente relacionada con los patrones de viento regionales, los cuales presentan dos direcciones predominantes en el transcurso del año. Durante el verano predominan los vientos del sureste y del este con intensidades de moderado a débil; en tanto que en invierno y principios de primavera, los vientos dominantes soplan del noroeste y del norte con intensidades de moderado a fuerte (Roden, 1964; Lavin *et al.*, 1997).

El GC se considera como una zona subtropical con altos índices de productividad primaria de diciembre a junio, seguido de bajos índices hasta el mes de octubre (Santamaria-del-Ángel *et al.*, 1994). Esta alta productividad resulta de una circulación de



agua profunda rica en nutrientes que alcanza la zona eufótica, y donde los nutrientes pueden ser utilizados por el fitoplancton (Luch-Cota, 2000).

Este enriquecimiento se lleva a cabo por dos procesos: un sistema de mezcla vertical permanente por los cambios de marea en las grandes islas, y por surgencias costeras causadas por el viento a lo largo de todo el año pero con mayor intensidad en invierno (Lluch-Cota, 2000).

El GC representa un lugar único debido a su elevada diversidad en cetáceos, que incluye tanto a especies residentes como aquellas que llegan a la región como parte de su comportamiento migratorio; siendo común la presencia de todas las especies durante la temporada de invierno (diciembre-mayo) (Álvarez-Castañeda y Patton, 2000). Las principales características del Golfo que permiten esta elevada diversidad, incluyen la elevada productividad, que puede sustentar complejas redes tróficas; la diversidad de hábitat debido a su topografía y oceanografía; sus características subtropicales, con aguas relativamente cálidas durante el invierno; y su alta variación estacional en cuanto a temperatura, productividad y circulación oceánica (Acevedo-Gutiérrez, *et al.*, 2002).

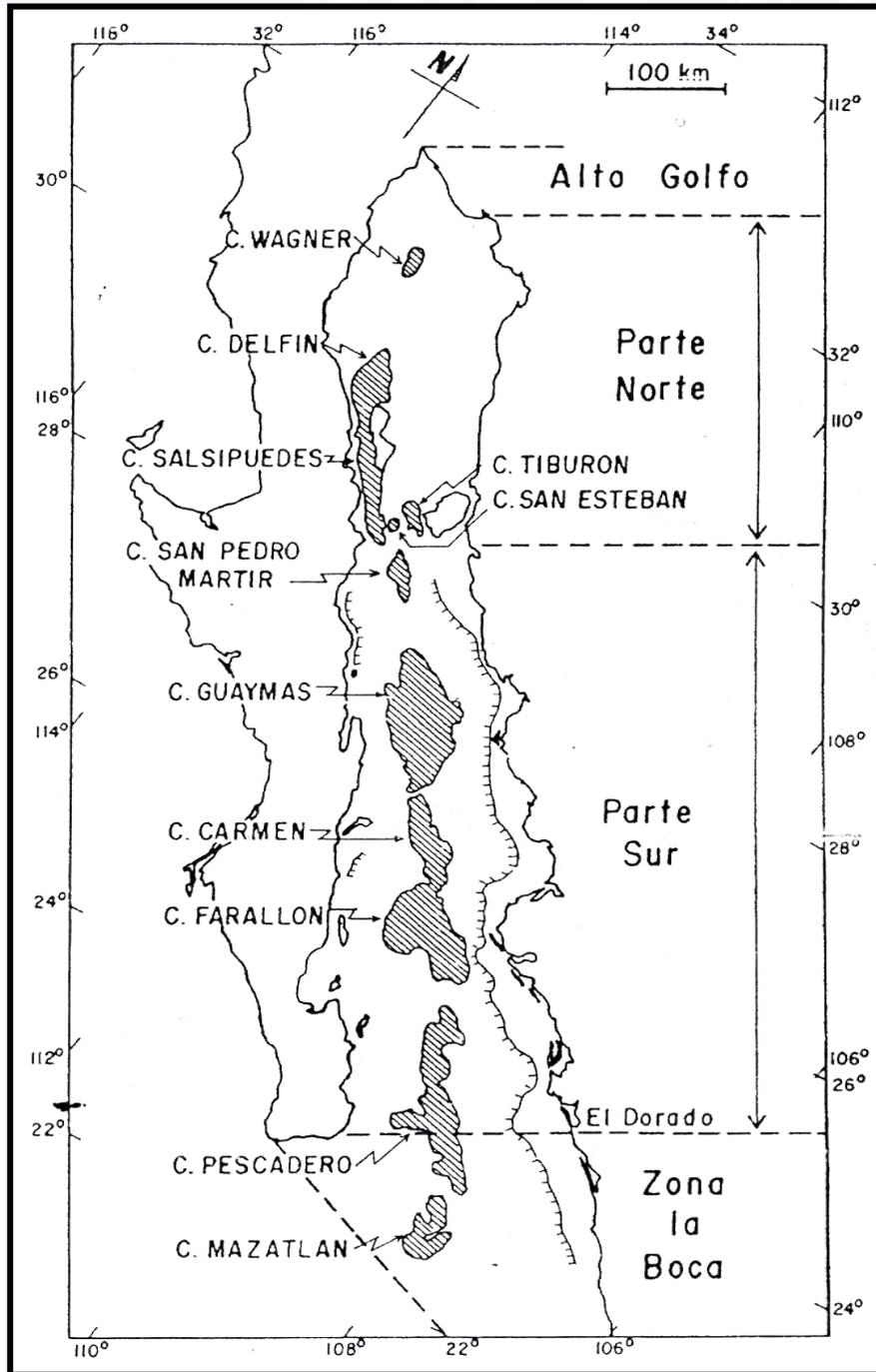


Figura 1. Regiones, cuencas y plataforma continental del Golfo de California. Las zonas sombreadas indican la isobata del umbral mas profundo. Tomado de Lavín, M.F., Beber, E. y Badan, A.. 1997. Estructura hidrográfica y circulación del Golfo de California. Escalas estacional e interanual, en: M.F. Lavín, editor. *Contribuciones a la Oceanografía Física en México*. Monografía No. 3. Unión Geofísica Mexicana. p. 142.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de biopsias

Las muestras de grasa utilizadas en este trabajo corresponden a biopsias obtenidas de ballenas foto-identificadas durante salidas de campo a lo largo del Golfo de California entre enero y abril de las temporadas 2002 a 2008 (por el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, CICIMAR-IPN). Para extraer el tejido se utilizaron puntas de acero inoxidable de 7 mm de diámetro y 40 mm de largo con barbas dirigidas hacia el interior, y lanzadas con una flecha por medio de una ballesta a una distancia aproximada de 10 a 20 m de la ballena (Ver descripción en Gendron, 2002). Inmediatamente después de su obtención se colocaron en papel aluminio y dentro de viales criogénicos para ser congeladas en nitrógeno líquido o en un congelador. Las biopsias fueron mantenidas a -70 °C hasta su procesamiento.

Los individuos de los cuales fueron tomadas las biopsias presentan un historial de avistamientos obtenido mediante foto-identificación realizada desde 1993 por el grupo del Laboratorio de Ecología de Mamíferos Marinos del CICIMAR. Además, para la mayoría de los individuos también se encuentra determinado el género mediante análisis genéticos realizados en el Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) (ver método en Enríquez-Paredes, 2005).

### Selección de biopsias

El criterio utilizado para la selección de las biopsias fue la cantidad de tejido adiposo disponible y la información de su historial de vida disponible, como el sexo, hembras lactante, y la edad mínima (año que se tomó la primera fotografía de identificación).

Las biopsias fueron cortadas con ayuda de un bisturí y sobre papel aluminio, realizando cortes longitudinales procurando tomar únicamente tejido adiposo. El peso del corte fue de aproximadamente 0.010 a 0.070 g. Una vez realizado el corte fueron



colocadas en viales para su traslado en congelación, al Laboratorio del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) unidad Iztapalapa.

## Cuantificación de las hormonas esteroides (HE)

### Extracción total de esteroides

La extracción total de esteroides se realizó siguiendo la técnica descrita por Salame-Méndez *et al*, (2004) con algunas modificaciones.

Las muestras de tejido graso fueron cortadas en pedazos pequeños con un bisturí y colocadas en tubos de ensayo de 10 ml con tapón esmerilado. Cada tubo fue previamente pesado sin el tapón en una balanza analítica. Una vez colocado el tejido en cada uno de los tubos, estos fueron pesados nuevamente con la finalidad de conocer el peso de la muestra. Posteriormente se agregó aproximadamente 1 ml de agua destilada a cada tubo y 3 volúmenes de éter dietílico para ser agitados a continuación en un vortex (Vortex Thermolyme 37600 Mixer) a velocidad media por 20-30 segundos. Los tubos se dejaron reposar unos segundos hasta verse formadas dos fases, el sobrenadante, que corresponde al solvente orgánico con el extracto total de esteroides (ETE), se separó utilizando una pipeta y colocó en otros tubos de ensayo de 10 ml. Al sedimento se agregó de nuevo 3 volúmenes de éter dietílico y se repitió el procedimiento anterior. Los tubos de ensayo con la fase orgánica fueron colocados en Baño María a una temperatura de 40 °C hasta la evaporación total del disolvente (de 1 a 2 horas aproximadamente). Una vez evaporado el disolvente, el extracto total de esteroides (ETE) fue transferido a tubos Eppendorff de 1.5 ml. Para ello se realizaron de 4 a 5 lavados utilizando una pipeta y éter dietílico. Una vez transferido el ETE el éter utilizado para ello se dejó evaporar a sequedad. El promedio de eficiencia total de extracción fue del  $98.5 \pm 0.8\%$  (Salame-Méndez *et al.*, 2004).



Los tubos Eppendorff con el ETE se almacenaron en un lugar fresco y protegido de la luz hasta la cuantificación del contenido de esteroides.

### Inmunoensayo enzimático (EIA)

Previo al análisis, los extractos esteroidales (ETE) depositados en los tubos Eppendorff fueron preparados agregando 100  $\mu$ l de etanol al 100% y 400  $\mu$ l de agua destilada, para ser mezclados en seguida en un vortex a velocidad media durante 30 segundos.

Las hormonas en el ETE fueron cuantificadas por medio de un análisis inmunoenzimático (EIA). Este análisis está basado en el principio de unión competitiva que consiste en lo siguiente: el antígeno en la muestra (la hormona a cuantificar o analito) compite con un antígeno marcado con una enzima (hormona conjugada con peroxidasa de rábano, proporcionado en el kit para EIA) y el cual produce una reacción de color (al reaccionar con una solución de tetrametilbenzidina; TMB). Estos antígenos compiten por un número limitado de sitios de unión en los anticuerpos adheridos a los pocillos incluidos en el kit. Cabe destacar que los kits utilizan anticuerpos específicos frente a cada tipo de hormona. El antígeno unido (hormona) es separado de aquel que se encuentra en exceso y no unido al anticuerpo. La cantidad de hormona en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno marcado que se adhiere a los pocillos y que genera la reacción de color. La cantidad de hormona es medida indirectamente por medio de un espectrofotocolorímetro.

Los kits utilizados para la cuantificación hormonal incluyen estándares, que son viales con diferentes concentraciones de la hormona. Asimismo incluyen dos controles, un vial que contiene concentraciones bajas y otro que contiene concentraciones altas.

La cuantificación de progestágenos se realizó con un kit comercial de EIA para progesterona (2077Z; Diagnostic Automation Inc.), con una curva estándar con rangos entre 0 y 50 ng/ml, un coeficiente de variación intra ensayos (CV) reportado entre 2.4% y 7.1%, un CV inter ensayos entre 2.6% y 12.6% y una sensibilidad de 0.3 ng/ml. Para la cuantificación de estrógenos se utilizó igualmente un kit comercial (2046Z; Diagnostic



Automation Inc.) para estradiol con una curva estándar con rangos entre 0 y 1000 pg/ml. El coeficiente de variación intra ensayos (CV) reportado entre 4.9% y 24.1%, un CV inter ensayos entre 6.6% y 26.7%; y una sensibilidad de 10 pg/ml. Los andrógenos se cuantificaron con un kit para testosterona (3725-300; AccuBind Elisa Microwells, Monobind Inc.), con una curva estándar entre 0.1 y 12.0 ng/ml, un CV intra ensayos entre 6.0% y 6.6%, un CV inter ensayos de 4.5% y 7.3%; y una sensibilidad de 0.38 ng/ml. En el caso de los glucocorticoides se empleó un kit Cortisol EIA DSL-10-2000 (Diagnostic System Laboratorios, Inc.) con una curva estándar entre 0.5 y 60.0 µg/dl, un CV intra ensayos de 2.4% y 10.3%, un CV inter ensayos entre 8% y 12%; y una sensibilidad de 0.1 µg/dl.

Los procedimientos seguidos en el análisis inmunoenzimático para cada una de las hormonas, fueron aquellos descritos por el proveedor. Para controlar los errores durante el procedimiento de cuantificación, cada muestra fue analizada por duplicado.

Finalmente, para la cuantificación de los esteroides una vez realizado el procedimiento descrito en cada kit, se utilizó un Lector de Microplaca Stat Fax-303 Plus, con un rango de onda de 400 a 750 nm.

### Cromatografía de Gases-Masas

Con la finalidad de explorar la composición de las muestras analizadas se realizaron también análisis por cromatografía de Gases-Masas para algunas muestras representativas de los diferentes estados reproductivos. Se utilizó el extracto total de esteroides (ETE) de las muestras correspondientes a una hembra madura, una lactante, una cría hembra, un macho maduro, un puberto y una cría macho. Estos extractos se utilizaron ya disueltos en etanol y agua destilada. Este proceso se realizó en el laboratorio de Espectrometría de masas del Instituto de Química de la UNAM.

Los extractos fueron centrifugados por 15 minutos, posteriormente se retiró con una punta de jeringa la grasa sobrenadante. Una vez retirada la grasa sobrenadante, las muestras fueron filtradas utilizando para ello un filtro de 0.22 µm.



Se utilizaron como referencia hormonas proporcionadas por SIGMA Aldrich. Las hormonas utilizadas fueron progesterona (Pregn-4-ene-3, 20 dione), testosterona (17 $\beta$ -Hidroxyandrost-4-en-3 one), estradiol (Estra- 1,3,5 (10)-triene-3, 17 $\beta$ -diol), y cortisol (11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21- trihidroxipregn-4-ene-3, 20 dione). Estas hormonas fueron pesadas (aproximadamente se utilizó 0.0005 gr de cada hormona) y posteriormente fueron disueltas. El estradiol se disolvió en 500  $\mu$ l de acetona, mientras que la testosterona, el cortisol y la progesterona fueron disueltos en 500  $\mu$ l de etanol. Posteriormente las hormonas de referencia fueron filtradas por medio de un filtro de 0.22  $\mu$ m.

Los análisis fueron realizados en un equipo de masas en trampa de iones marca Bruker, modelo Esquiper 6000. Para los análisis se inyectaron en el aparato aproximadamente 20  $\mu$ l de cada muestra así como de cada hormona de referencia, utilizando para ello un disolvente volátil.

Una vez obtenidos los espectros de masas para cada una de las hormonas de referencia, éstos fueron contrastados con los espectros resultantes de las 6 muestras analizadas. Para ello se consideró en los espectros de las hormonas de referencia la formación de iones y sus respectivos pesos moleculares, que fueron posteriormente utilizados para localizar las hormonas esteroides en las muestras de ballenas azules. Cabe mencionar que los estándares utilizados, al ser más económicos que otros, contienen varios compuestos por lo que no son totalmente puros, es decir, hay contaminación por isómeros, lo que afectó la comparación con las muestras.

#### Resonancia magnética nuclear

Con la finalidad de determinar la estructura de las hormonas de referencia, se realizaron análisis de éstas en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear marca Varian Inova de 500 MHz para determinar la estructura de estos productos a partir de los carbonos e hidrógenos. Para ello se utilizaron aproximadamente 1 ml de cada hormona de referencia, las cuales igualmente fueron disueltas en etanol, en el caso de progesterona, testosterona y cortisol, y en acetona en el caso del estradiol.



## Análisis estadístico.

De las muestras analizadas se consideró la información disponible sobre sus historias de vida, como el sexo, estado reproductivo (macho maduro, hembra madura, lactante y cría) y la edad mínima de los individuos. En el caso de la edad mínima, esta fue considerada de 1 año para las ballenas fotografiadas por primera vez, y de 5 años si la hembra fotografiada iba acompañada de una cría. El estado de los individuos fue catalogado como maduro, para aquellas hembras con una edad mínima de 5 años o más, para los machos, la edad de 8 años fue la que se utilizó para considerar a un macho maduro, por debajo de esta edad se consideraron pubertos o bien inmaduros si se conocía la edad real y estaba por debajo de los 6 años. En los individuos no conocidos se ignora si se trataba de ballenas jóvenes o viejas pero se sabe que no eran crías.

Con fines estadísticos las concentraciones obtenidas fueron estandarizadas con base al peso de cada muestra quedando la concentración final expresada en ng/gr de muestra. Aquellas concentraciones por debajo del límite de detección fueron reemplazadas por la concentración mínima detectable (sensibilidad del kit) reportada para cada ensayo. Se realizó también la transformación de los datos obtenidos a logaritmo base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ), con el propósito de homogenizar la varianza de los datos.

Se realizó un análisis de densidad por Kernel con la finalidad de conocer la distribución de los datos obtenidos para cada una de las hormonas cuantificadas, así como para la sumatoria de estas hormonas. Este procedimiento estadístico da indicación del sesgo, multimodalidad y grosor de las colas de distribución de los datos, además de presentar algunas ventajas frente a otros análisis de distribución como los histogramas y polígonos de frecuencia (Salgado-Ugarte, 2002).

Para conocer la relación entre las hormonas cuantificadas se realizaron gráficas de dispersión y se obtuvieron los coeficientes de correlación, mientras que para determinar las interacciones entre el estado reproductivo, los progestágenos, andrógenos, estrógenos, glucocorticoides y algunas proporciones de ellas, se realizaron análisis por Componentes principales (ACP). Asimismo se realizaron análisis discriminantes para conocer si los



contenidos hormonales permiten agrupar a las ballenas azules por género o categoría reproductiva. Las concentraciones fueron utilizadas en logaritmo base 10.

Debido a que se desconoce gran parte de la endocrinología de la ballena azul, se decidió considerar la influencia de los datos extraordinarios sobre los promedios para cada categoría. Para ello se analizó la distribución de las hormonas esteroides considerando el estado reproductivo por medio de gráficas de violín, las cuales grafican la mediana en lugar de la media

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico STATA 9.0.

## RESULTADOS

### Cromatografía de Gases-Masas

Se contrastaron los resultados obtenidos para las muestras elegidas con aquellos obtenidos para las hormonas esteroides utilizadas de referencia (Figuras 2 y 3), corroborando de esta forma el método de inmunoensayo enzimático (Anexo VIII).

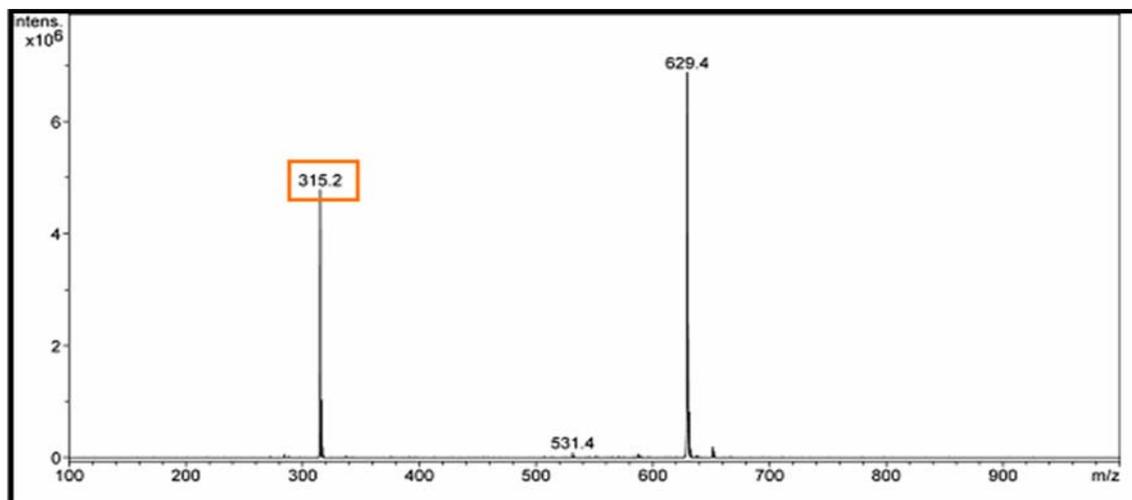


Figura 2. Espectro de masas de progesterona (Pregn-4-ene-3, 20 dione) utilizado como referencia para la identificación de los picos.

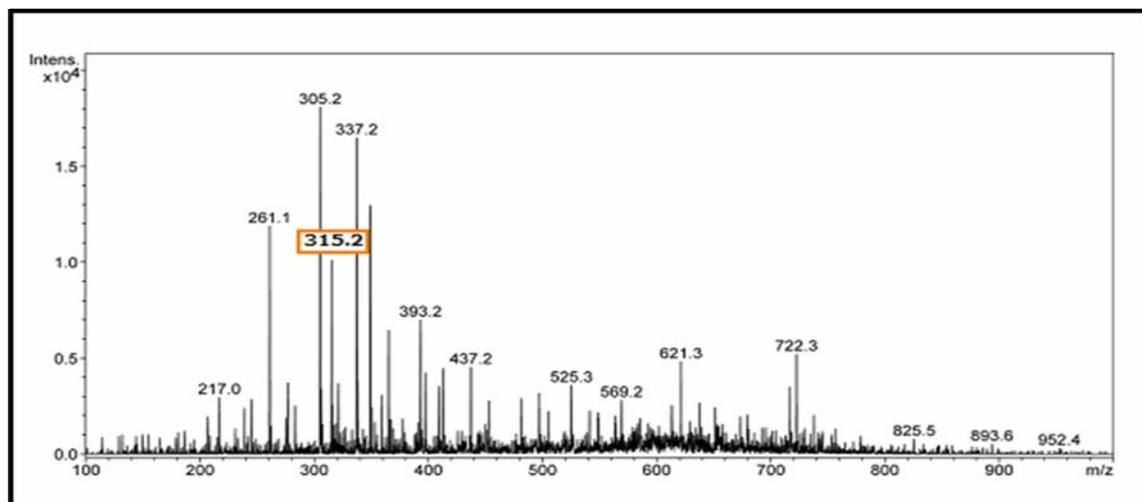
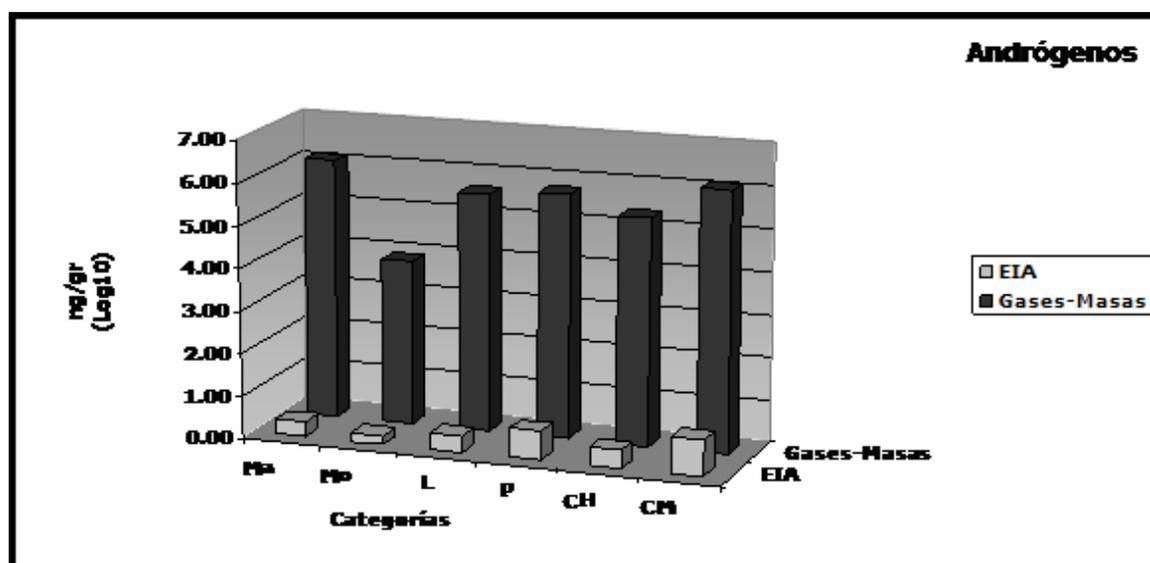
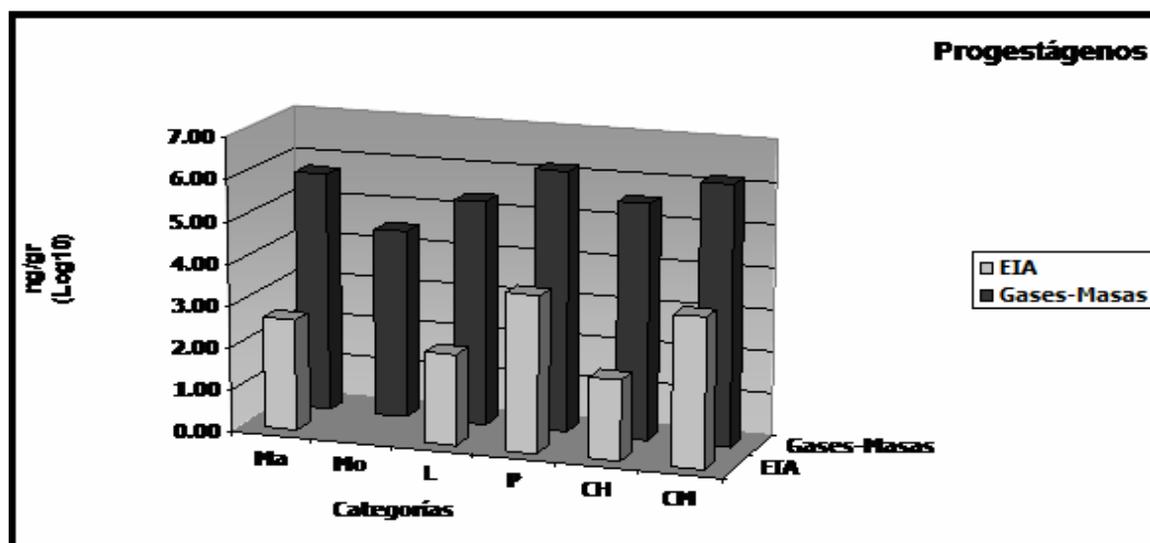


Figura 3. Espectro de masas a partir de grasa de hembra lactante de ballena azul (ID 0451; Biopsia 456).

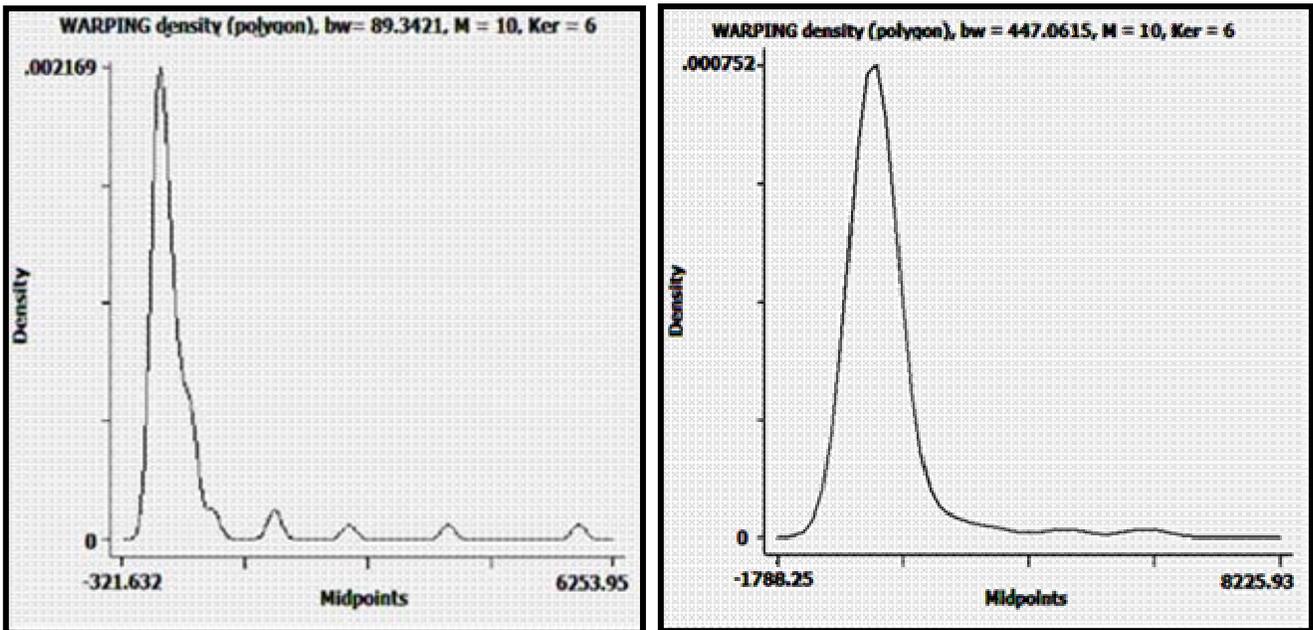
Aunque todas las muestras mostraron la presencia de las hormonas esteroides las concentraciones fueron mucho menores por el método de inmunoensayo enzimático (EIA) en comparación con el de cromatografía de Gases-Masas. No obstante, se obtuvieron perfiles similares en las concentraciones para cada muestra, siendo más evidentes en las concentraciones de progestágenos y andrógenos (Figuras 4 y 5). Lo anterior refuerza la eficiencia del método de EIA, ya que aunque las magnitudes son diferentes, los perfiles en las concentraciones se mantienen en ambos métodos (Anexo VIII).



Figuras 4 y 5 Comparación entre las concentraciones de progestágenos y andrógenos obtenidas por el método de EIA y cromatografía Gases-Masas en grasa de ballenas azules, hembras maduras (Ma), lactantes (L), crías (CH), machos maduros (Mo), pubertos (P) y crías (CM).

## Análisis de densidad por Kernel

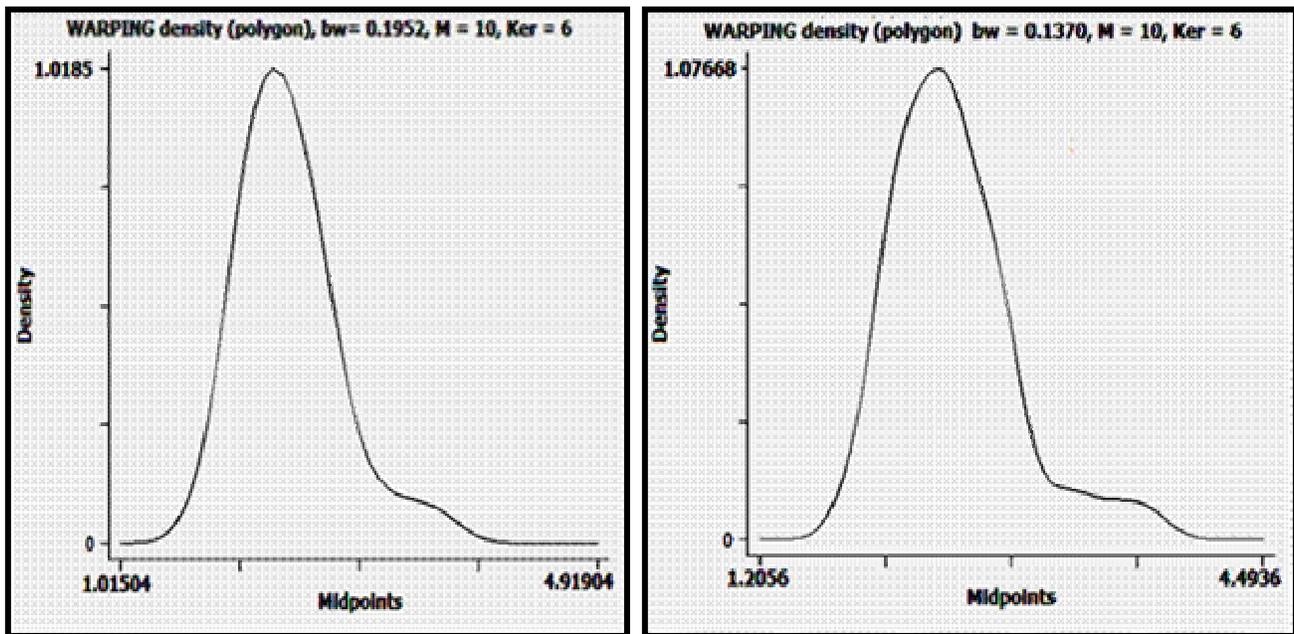
En general se observó una alta variación en las concentraciones de las hormonas analizadas, corroborada mediante análisis de densidad por Kernel (Figuras 6 y 7). Con la finalidad de reducir la variación en los datos y obtener una estandarización de los mismos, se realizó la transformación de las concentraciones a logaritmo base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ). Una vez realizada la estandarización, se observó mediante los análisis por Kernel una disminución significativa en los sesgos (Figuras 8 y 9) (Anexo I), por tal motivo se utilizó esta estandarización para todos los análisis posteriores.



a)

b)

Figuras 6 y 7. Análisis de densidad por Kernel para la sumatoria de las hormonas cuantificadas ( $\Sigma$ PAEG; progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides) sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con amplitud de banda óptima de Silverman (a) y con amplitud óptima Gaussiana de Scott (b). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración ng/gr de tejido.



a)

b)

Figuras 8 y 9. Análisis de densidad por Kernel para la sumatoria de las hormonas cuantificadas ( $\Sigma$ PAEG, progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides) sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con amplitud de banda óptima de Silverman (a) y con amplitud óptima Gaussiana de Scott (b). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración ng/gr de tejido transformada a Log 10.

### Correlación entre hormonas

Se observaron asociaciones entre las hormonas esteroides cuantificadas (Figura 10, Tabla I). Se encontró una asociación positiva y con un alto nivel de significancia entre los estrógenos y los andrógenos ( $n= 77$ ;  $r = 0.6314$ ,  $P < 0.000$ ). Éstas dos hormonas a su vez, presentaron una correlación positiva y significativa con los glucocorticoides, siendo la relación de los estrógenos con los glucocorticoides la más alta ( $r= 0.7348$   $P < 0.000$ ). También se encontró una correlación positiva y significativa de los progestágenos con los estrógenos ( $r= 0.40$   $P < 0.000$ ), de los progestágenos con los andrógenos ( $r= 0.25$   $P < 0.001$ ) y de los progestágenos con los glucocorticoides ( $r= 0.25$   $P < 0.026$ ).

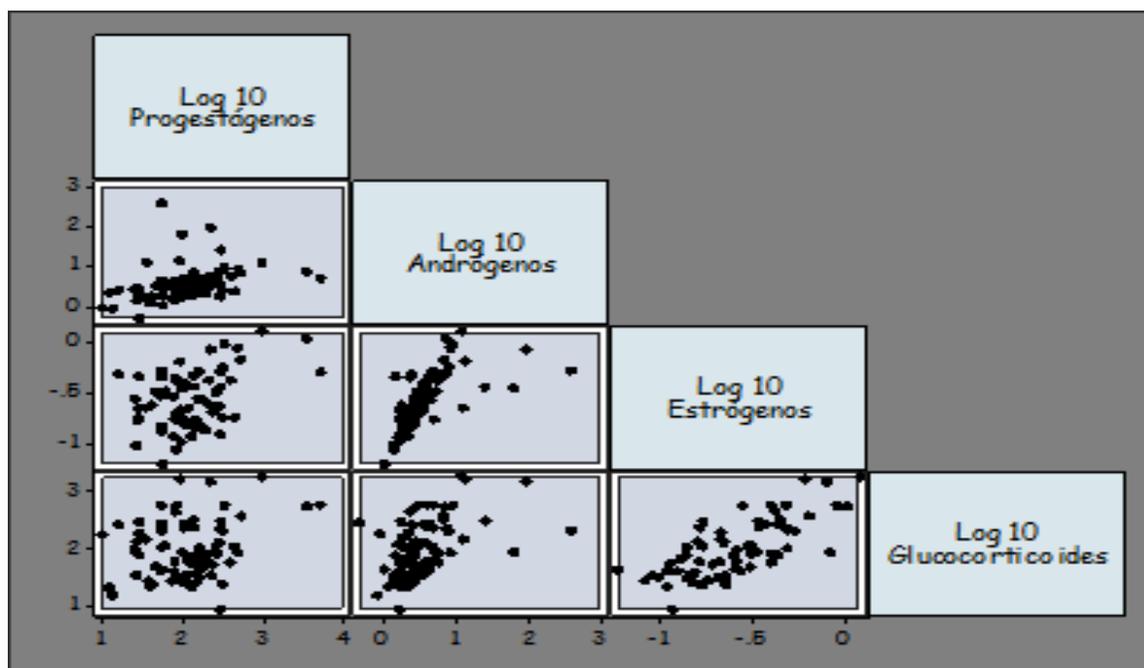


Figura 10. Relación entre las hormonas esteroides cuantificadas en grasa de ballenas azules del Golfo de California.

Tabla I. Correlación entre las hormonas esteroides (ng/gr tejido) en grasa de ballenas azules en el Golfo de California. Datos en Log<sub>10</sub>.

	Progestágenos	Andrógenos	Estrógenos	Glucocorticoides
Progestágenos	1.0000			
Sign.				
Andrógenos	0.3714	1.0000		
Sign.	0.001*			
Estrógenos	0.4096	0.6114	1.0000	
Sign.	0.000*	0.000*		
Glucocorticoides	0.2550	0.5012	0.7348	1.0000
Sign.	0.0262*	0.000*	0.000*	

Sign. = significancia; \* = con (P < 0.05)

Estas mismas asociaciones fueron analizadas mediante análisis de regresión más robustos, con la finalidad de determinar si los datos extraordinarios (outliers) afectaban las asociaciones antes mencionadas. De acuerdo a estos análisis, se encontró que la asociación entre progestágenos y glucocorticoides no fue significativa ( $n= 75$ ;  $F= 2.42$ ;  $P < 0.1242$ ), mientras que el resto de las asociaciones mostraron ser significativas. Lo que demuestra que las asociaciones no fueron afectadas por los datos extraordinarios salvo el caso antes mencionado (Anexo II).

Las asociaciones fueron evaluadas posteriormente considerando el sexo. Se encontró que estas mismas asociaciones se mantienen, siendo la asociación entre andrógenos y estrógenos de las más significativas ( $n= 38$ ;  $r= 0.8134$   $P= 0.000$  para hembras y  $n= 39$ ;  $r= 0.3836$ ,  $P= 0.0439$  para machos) al igual que entre los andrógenos y los glucocorticoides ( $r= 0.7059$   $P= 0.000$  para hembras;  $r= 0.4104$ ,  $P= 0.0095$  para machos). Sin embargo, al volver a realizar los análisis de regresión robustos, la asociación entre los progestágenos y los glucocorticoides solo fue significativo en las hembras ( $n= 38$ ;  $F= 8.96$ ;  $P < 0.0050$ ), contrastando con los machos ( $n= 38$ ;  $F= 3.82$ ;  $P < 0.0585$ ).

Sin considerar el estado reproductivo, se encontró una diferencia significativa de progestágenos, estrógenos y glucocorticoides entre sexos ( $n= 77$ ;  $H = 12.69$   $P= 0.0004$  para progestágenos,  $H = 14.94$   $P= 0.0001$  para estrógenos, y  $H = 10.79$   $P= 0.0010$  para glucocorticoides), lo que no ocurrió para los andrógenos, donde no se encontraron diferencias significativas entre sexos. También se analizó la proporción andrógenos/estrógenos con respecto al sexo, y se encontró que las hembras tienen una mayor proporción que los machos ( $n= 77$ ;  $H = 11.37$   $P= 0.0007$ ) (Figura 11).

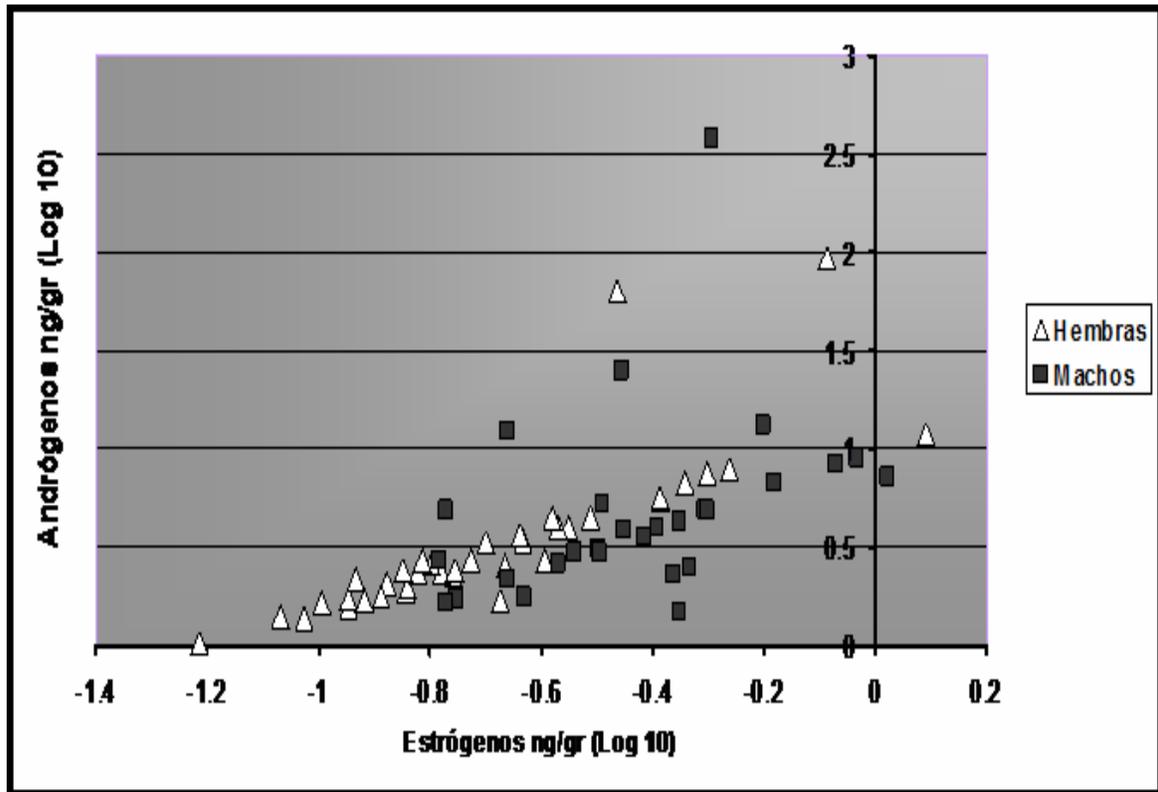


Figura 11. Relación entre los andrógenos y estrógenos con respecto al sexo en grasa de ballenas azules del Golfo de California.

Todos los machos en general presentaron una concentración significativamente mayor de glucocorticoides en comparación con las hembras ( $n=77$ ;  $H=10.79$   $P=0.0010$ ) (Figura 12), aunque cabe mencionar que se encontraron concentraciones muy altas para estas hormonas en una hembra lactante (ID# 0050) y una hembra madura (ID# 0124).

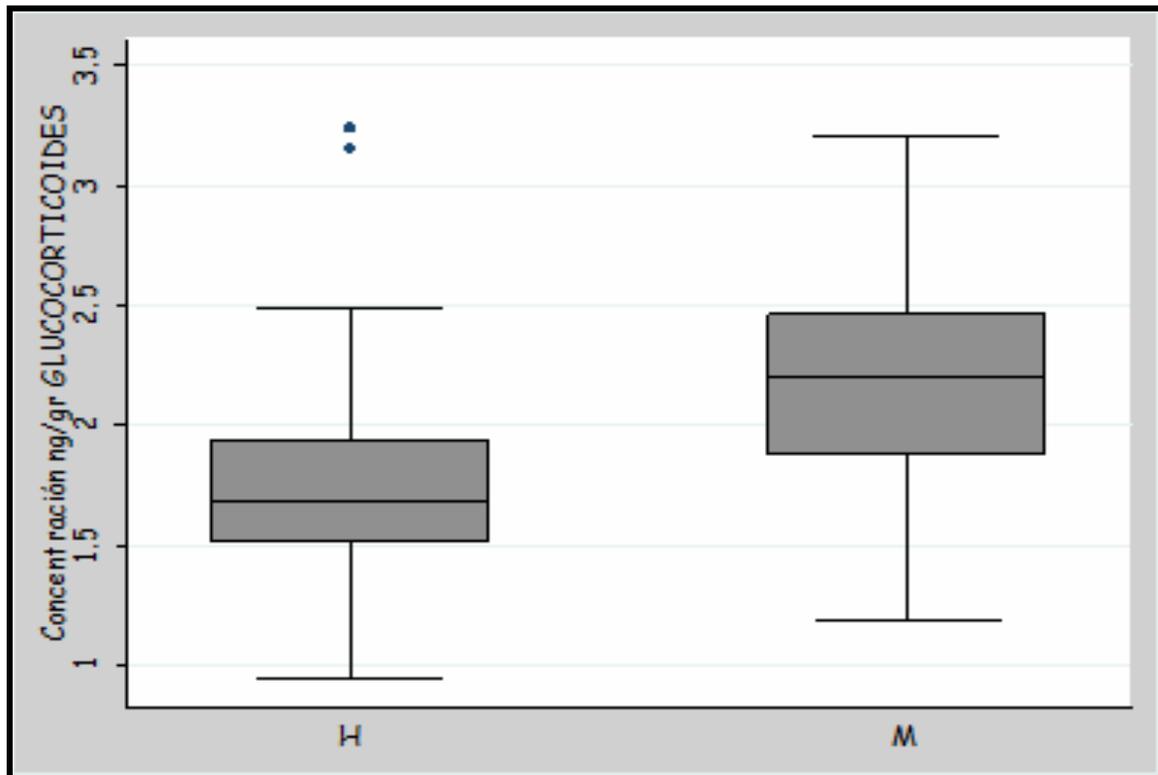


Figura 12. Concentración de andrógenos y estrógenos en hembras y machos de ballenas azules del Golfo de California.

### Historial de avistamientos

En este trabajo se analizaron 70 ballenas azules foto-identificadas durante los años 2002-2008 en el Golfo de California, incluyen 36 hembras con 2 individuos biopsiados 2 veces, y 34 machos con 3 individuos biopsiados dos veces el mismo día y 2 en diferentes días. Del total de ballenas analizadas 33 individuos (17 hembras y 16 machos) cuentan con un historial de avistamientos (Tabla VI). De estos individuos conocidos, se encuentra una hembra que se biopsió en dos ocasiones en estado de lactancia (ID# 0050) una durante marzo del 2004 (biopsia 416) y posteriormente en febrero del 2008 (biopsia 690), presentando en esta última concentraciones hormonales mucho mayores en comparación con la primer muestra. Se tiene igualmente dos biopsias (biopsia 459 del 2005 y 711 del 2008) de una hembra madura (ID# 0127), ambas muestras presentaron concentraciones muy similares de estrógenos y andrógenos, pero con variaciones en los glucocorticoides y

en los progestágenos. Se analizó también la muestra de una hembra lactante (ID# 0451) y de su cría (ID# 0478) muestreadas en febrero del 2005. Ambas muestras presentaron concentraciones similares en todas las hormonas esteroides, siendo ligeramente mayores en la hembra lactante los progestágenos y glucocorticoides (Tabla II, III).

Se determinaron las concentraciones de una cría macho (ID# 0454) y dos años después como inmaduro (biopsia 415 y 549, respectivamente). Ambas muestras presentaron concentraciones similares para los glucocorticoides, pero para el resto de las hormonas esteroides fueron mayores las concentraciones cuando esta era cría (Tabla IV). De igual forma se obtuvieron muestras de un macho puberto con edad mínima de 5 años (ID# 0240) y posteriormente como adulto (biopsias 350 y 550), con edad mínima de 9 años (Tabla V). Los resultados mostraron concentraciones hormonales diferentes en ambas etapas, siendo más elevadas en la ballena azul en su etapa como macho inmaduro de 6 años de edad. Se incluye también la cuantificación hormonal de un macho maduro con edad mínima de 20 años, foto-identificado en 1988 (ID# 142), individuo que presentó concentraciones muy bajas para todas las hormonas esteroides, resultados que fueron obtenidos igualmente por medio de la cromatografía de Gases-Masas (Anexo VII y VIII).

Tabla II y III. Concentración promedio de las hormonas esteroides (ng/gr tejido) en grasa de una hembra lactante y hembra madura de ballenas azules foto-identificadas en el Golfo de California avistadas en dos ocasiones.

Hembra lactante (ID# 0050)

Edad Mínima	Año	Glucocorticoides (ng/gr)	Estrógenos (ng/gr)	Progestágenos (ng/gr)	Andrógenos (ng/gr)
16	2004	54.46	0.11	130.71	2.17
20	2008	1415.40	0.73	223.09	91.80

Hembra madura (ID# 0127)

Edad Mínima	Año	Glucocorticoides (ng/gr)	Estrógenos (ng/gr)	Progestágenos (ng/gr)	Andrógenos (ng/gr)
10	2005	21.69	0.11	131.01	1.73
13	2008	42.86	0.06	56.64	1.02

Tabla IV y V. Concentración promedio de las hormonas esteroides (ng/gr tejido) en grasa de un macho cría y después como inmaduro, así como de un macho puberto y después como maduro.

Macho cría-inmaduro (ID# 0454)

Edad Mínima	Año	Glucocorticoides (ng/gr)	Estrógenos (ng/gr)	Progestágenos (ng/gr)	Andrógenos (ng/gr)
0-1	2004	526.31	1.05	3494.73	7.16
2	2006		0.40	87.39	3.97

Macho puberto-maduro (ID# 0240)

Edad Mínima	Año	Glucocorticoides (ng /gr)	Estrógenos (ng/gr)	Progestágenos (ng/gr)	Andrógenos (ng/gr)
5	2002	369.45	0.49	5206.89	4.90
9	2006	112.17	0.32	62.50	2.96



## Concentración de hormonas esteroides en hembras de ballena azul y su relación con el estado reproductivo

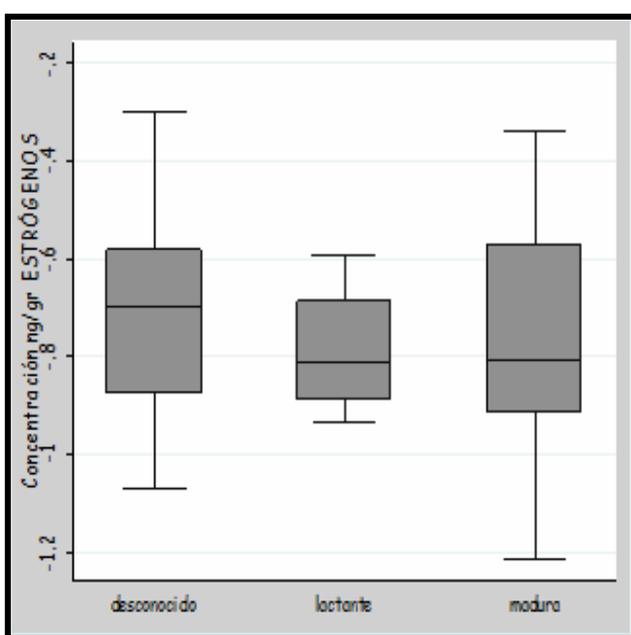
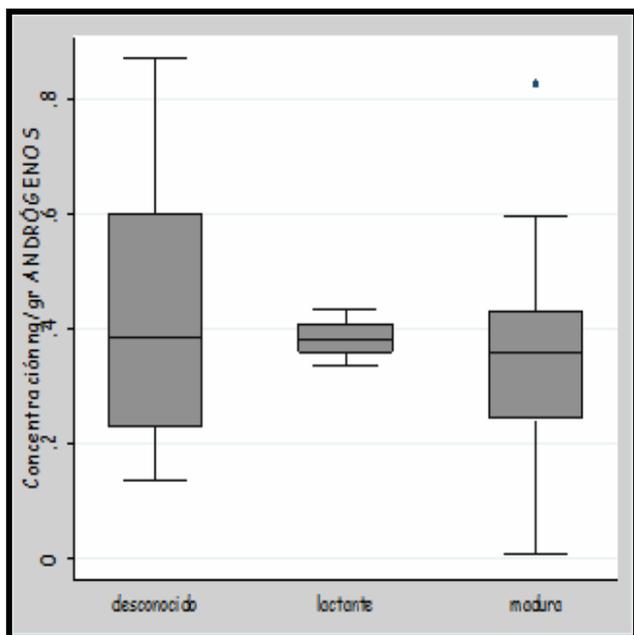
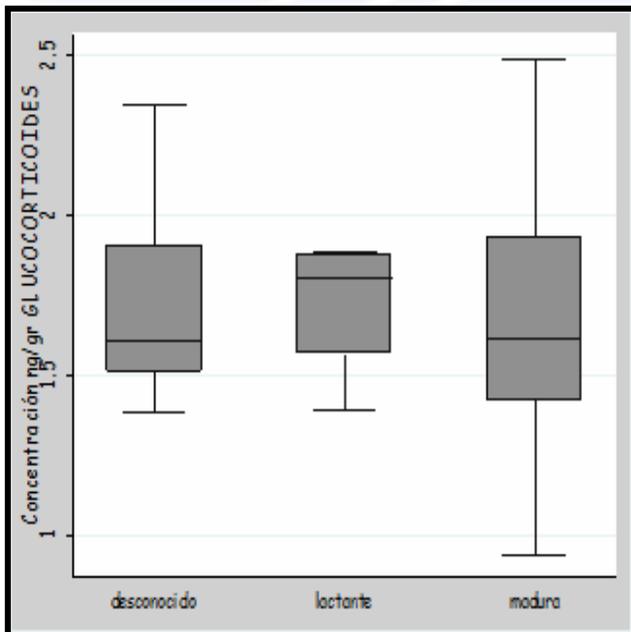
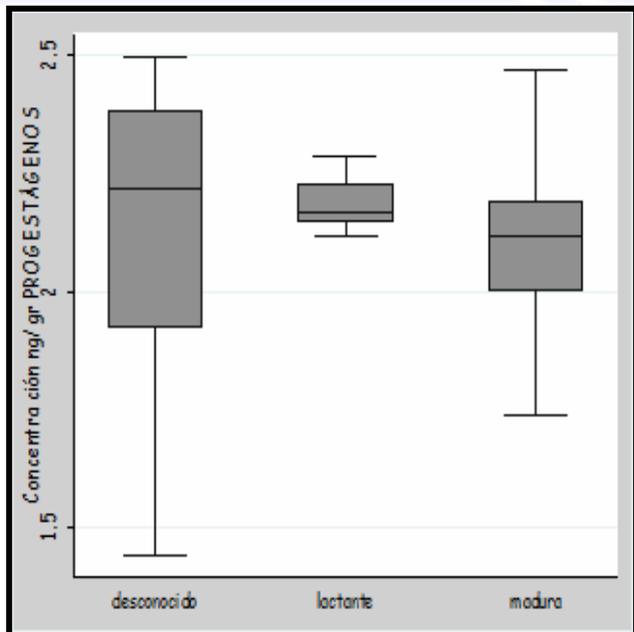
Se analizaron un total de 38 muestras de grasa provenientes de 11 hembras maduras, 5 lactantes y 3 crías, para el resto de las muestras se desconoce su estado reproductivo (Anexo III).

Aunque no hubo diferencia significativa entre las hembras con diferente estado reproductivo las crías presentaron altas concentraciones y variaciones para todas las hormonas cuantificadas. Las hembras maduras sexualmente en cambio, mostraron concentraciones menores pero la mayor variación para todas las hormonas cuantificadas (Tabla VII).

Tabla VII. Concentración promedio de las hormonas esteroides (ng/gr tejido) en grasa de hembras de ballenas azules foto-identificadas en el Golfo de California referentes al estado reproductivo.

<b>Categoría</b>	<b>n</b>	<b>Glucocorticoides (ng/gr)</b>	<b>Estrógenos (ng/gr)</b>	<b>Progestágenos (ng/gr)</b>	<b>Andrógenos (ng/gr)</b>
<b>Lactante</b>	5	329.12 ± 607.61	0.30 ± 0.29	168.48 ± 38.30	20.29 ± 39.97
<b>Madura</b>	11	224.77 ± 505.57	0.29 ± 0.33	235.81 ± 273.05	8.99 ± 18.04
<b>Cría</b>	3	95.54 ± 93.06	0.38 ± 0.18	269.47 ± 166.38	5.35 ± 2.53
<b>Desconocido</b>	19	62.68 ± 48.74	0.21 ± 0.10	165.40 ± 89.35	3.00 ± 1.61

En contraste, las hembras lactantes fueron el grupo más homogéneo con las menores variaciones intra grupo, siendo más evidente en los progestágenos (Figuras 13, 14, 15 y 16).



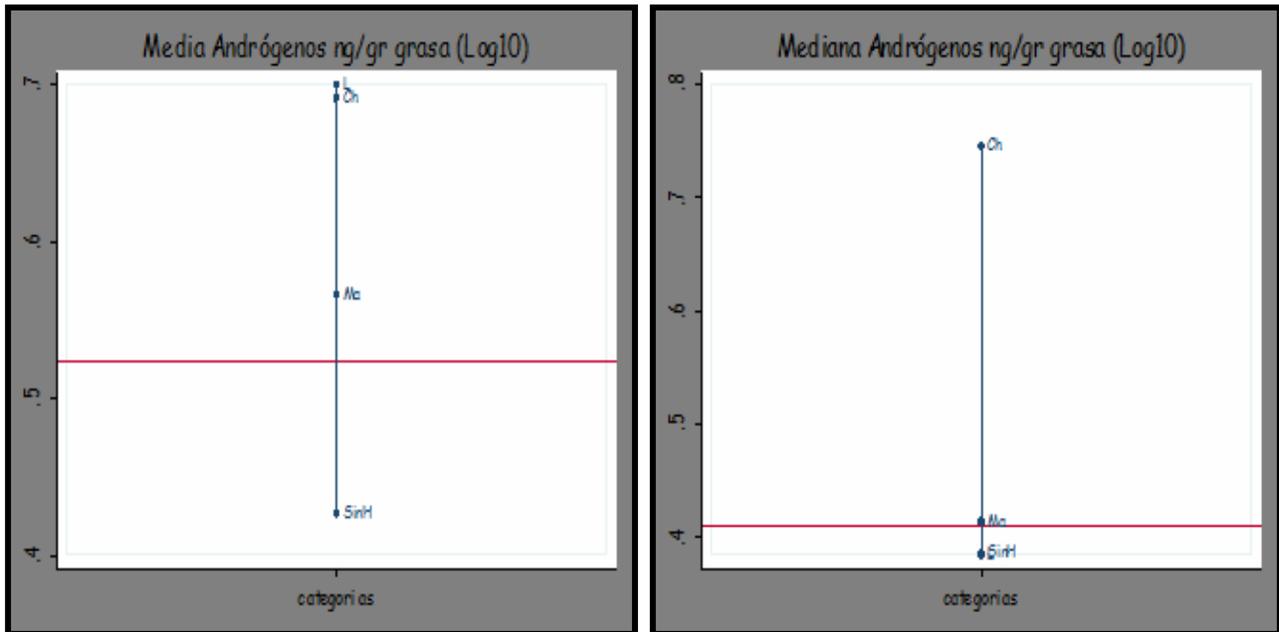
Figuras 13, 14, 15 y 16. Concentraciones de hormas esteroides en grasa de hembras lactantes, maduras y de las que se desconoce su estado, de ballenas azules en el Golfo de California. La línea dentro de la caja representa el 50% de los datos y la caja abarca el 25-75%, mientras que los bigotes representan los valores mínimos y máximos. Los puntos representan datos extraordinarios (outliers). Datos en Log<sub>10</sub>.

Se analizó la distribución de las hormonas esteroides considerando el estado reproductivo por medio de gráficas de violín (Anexo IV). Los resultados mostraron que las diferencias entre las medianas y las medias de las concentraciones por categoría no fueron grandes, y en general se presentó una tendencia en la media a ser más grande que la mediana debido a la presencia de un dato extraordinario en las hembras lactantes, y 2 en las hembras maduras (Tabla VIII).

Tabla VIII. Mediana y media de las concentraciones de hormonas esteroides en hembras de ballenas azules por categoría y la diferencia entre ambas.

	Cría			Lactante		
	Media	Mediana	Diferencia	Media	Mediana	Diferencia
Progestágenos	2.3435	2.5086	<b>0.1651</b>	2.2179	2.1696	<b>0.0483</b>
<b>Andrógenos</b>	0.6904	0.7444	<b>0.0540</b>	0.6989	0.3840	<b>0.3149</b>
<b>Estrógenos</b>	0.4577	0.3855	<b>0.0722</b>	-0.6475	-0.7785	<b>0.1310</b>
<b>Glucocorticoides</b>	1.8347	1.7594	<b>0.0753</b>	2.0070	1.8686	<b>0.1384</b>
	Sin categoría			Madura		
	Media	Mediana	Diferencia	Media	Mediana	Diferencia
Progestágenos	2.1430	2.2173	<b>0.0743</b>	2.2061	2.1426	<b>0.0635</b>
<b>Andrógenos</b>	0.4262	0.3851	<b>0.0411</b>	0.5654	0.4130	<b>0.1524</b>
<b>Estrógenos</b>	-0.7269	-0.6994	<b>0.0275</b>	-0.6923	-0.7980	<b>0.1057</b>
<b>Glucocorticoides</b>	1.7100	1.6055	<b>0.1045</b>	1.8161	1.6321	<b>0.1840</b>

A pesar de las diferencias encontradas entre la mediana y la media de las concentraciones analizadas, las tendencias observadas para cada categoría permanecieron iguales, con excepción de los andrógenos, donde la media se muestra sesgada de forma considerable por la presencia de una hembra madura con una concentración muy elevada en comparación con el resto de su categoría ( ID# 0282). Lo mismo ocurre en el caso de las lactantes donde una hembra con concentraciones elevadas sesgó la media de los andrógenos y el resto de las hormonas esteroides (ID# 0050) (Figuras 17 y18).



Figuras 17 y 18. Mediana y media de la concentraci6n de andr6genos por categora en hembras. Cria (C), lactante (L), madura (Ma) y sin categora (SinH).

Con respecto a los meses de muestreo, para ver si existia tendencia en algunos esteroides, se analizaron las muestras cuantificadas excluyendo a las cras y las hembras lactantes. Aunque se observa una mayor concentraci6n en todas las hormonas durante el mes de febrero, no se encontraron diferencias estadisticamente significativas entre meses (Figura 19). No obstante tomando en cuenta cada una de las biopsias tomadas en distintas fechas, en general, se observa una menor variaci6n en las hormonas esteroides al final de la temporada, con excepci6n de los progest6genos, los cuales presentan una gran variaci6n durante toda la temporada aunque es m6s evidente al principio de esta (Figuras 20, 21, 22 y 23). Lo anterior pudo estar sesgado debido a la presencia de un dato extraordinario, que corresponde a una hembra madura (ID# 0124) biopsiada el 21 de febrero del 2008 cuyas concentraciones hormonales de progest6genos, estr6genos y glucocorticoides se encuentran por fuera del resto de las hembras.

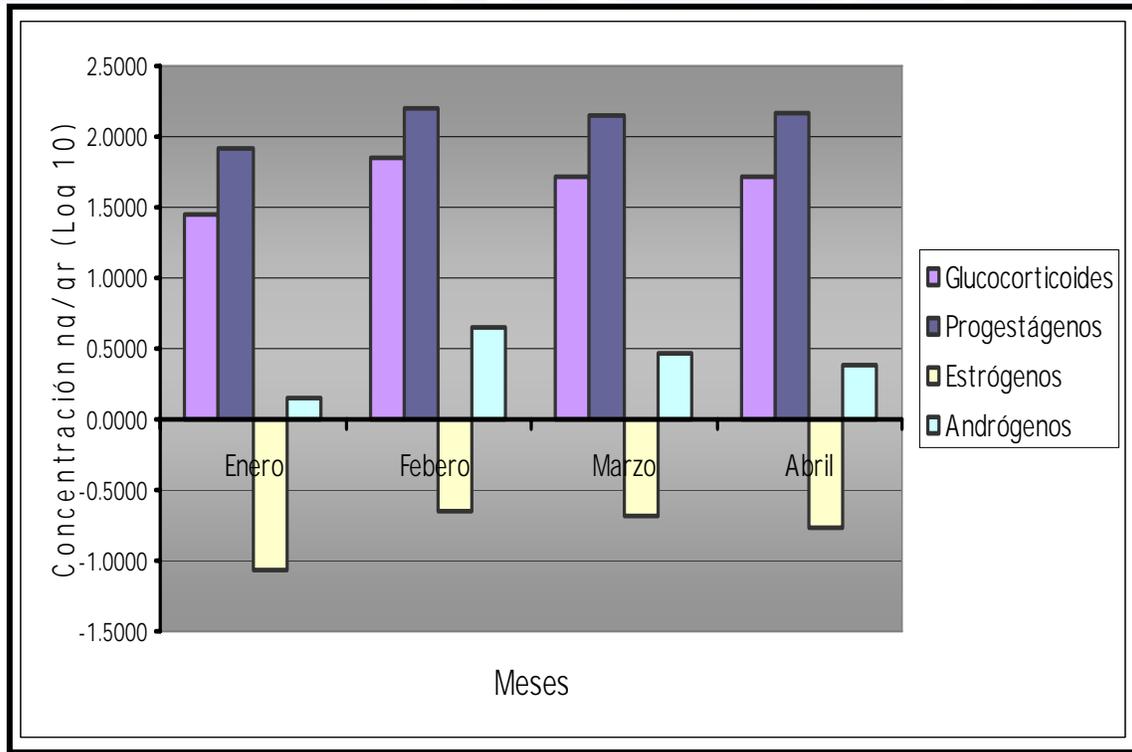
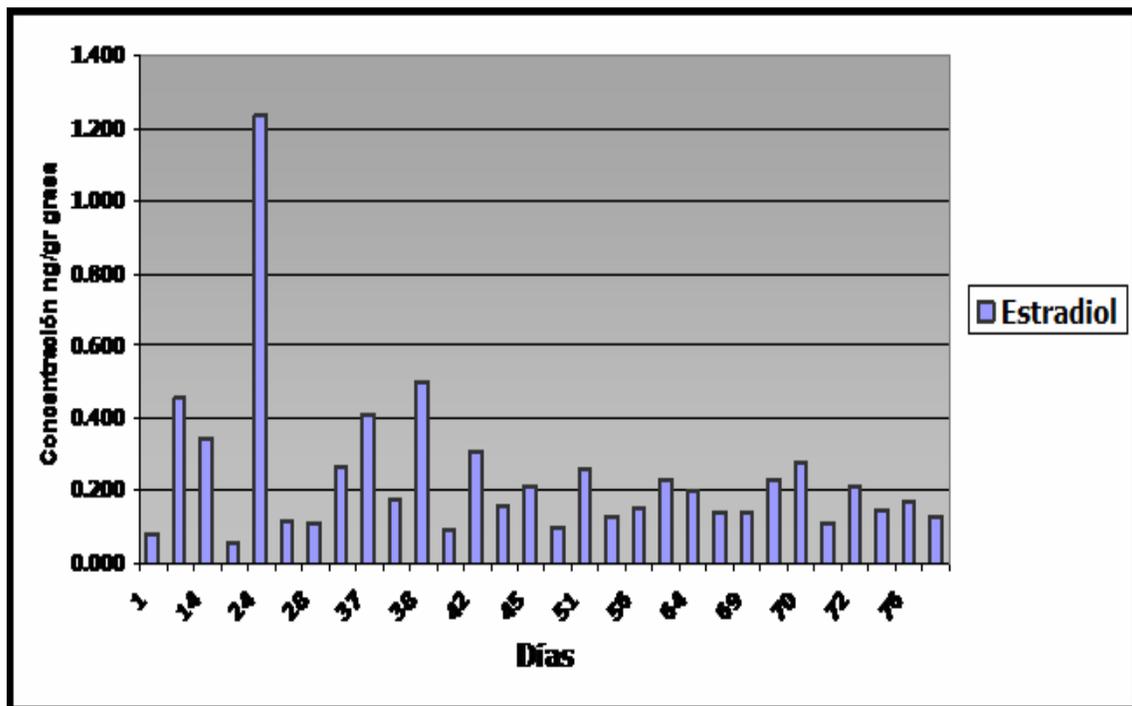
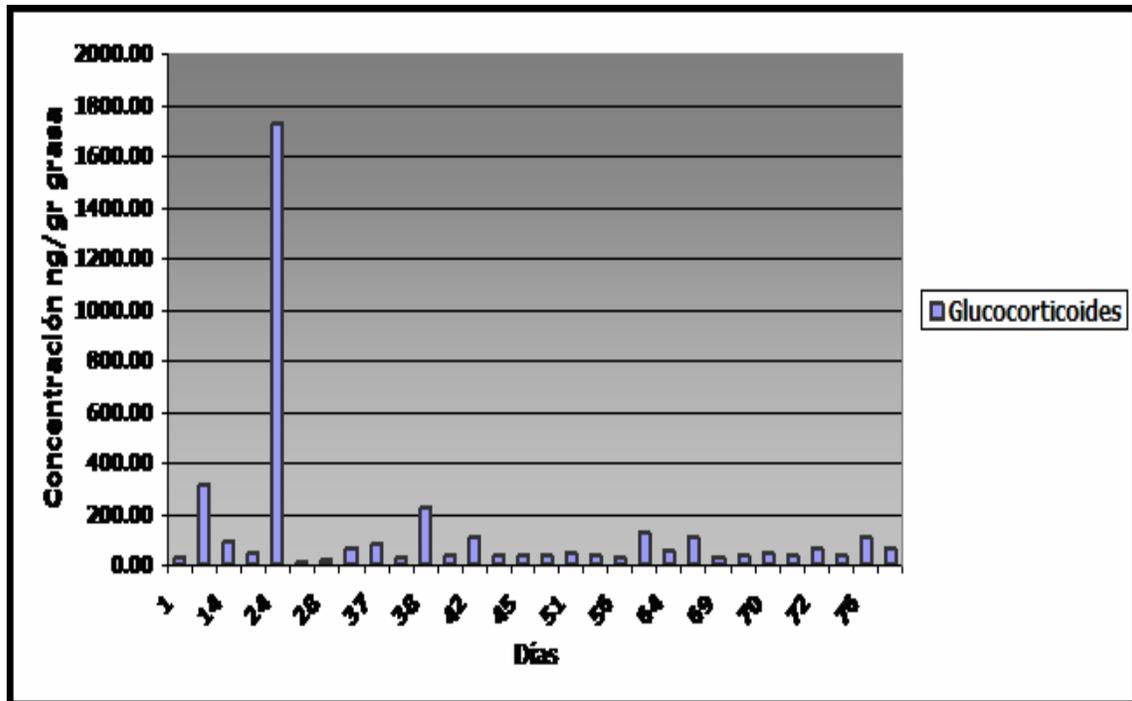
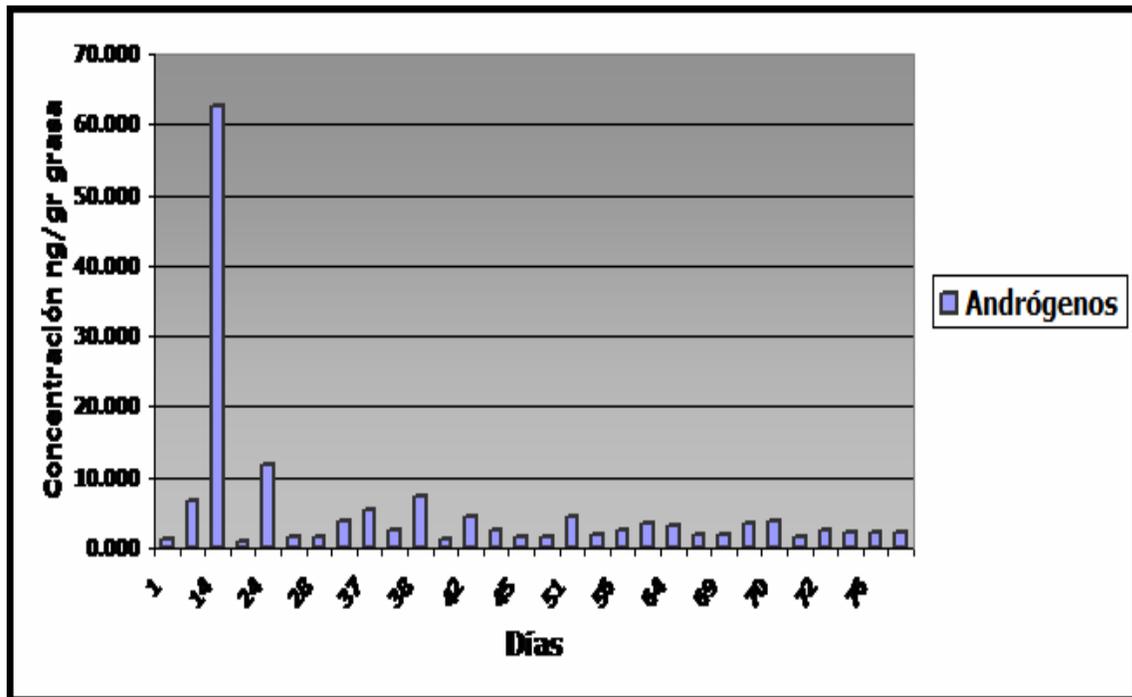


Figura 19. Gráfica de las concentraciones de a) glucocorticoides b) progestágenos c) estrógenos y d) andrógenos en grasa de hembras maduras y desconocidas de ballenas azules, en el Golfo de California en relación a los meses de muestreo.





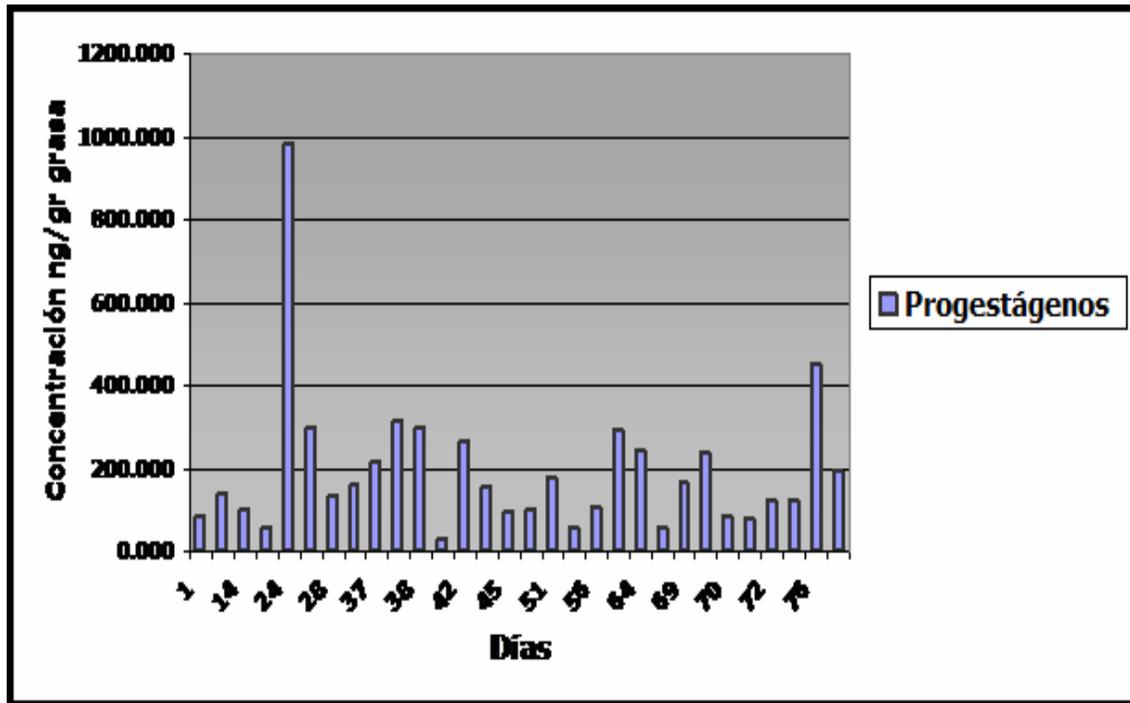


Figura 20, 21, 22 y 23. Concentración de a) estrógenos b) andrógenos y c) glucocorticoides y d) progestágenos en grasa de hembras maduras y desconocidas de ballena azul en el Golfo de California. El día uno se considera el 29 de enero.

Dentro de las muestras analizadas, se encuentra la de una madre y su cría (ID# 0451 y 0478), las cuales presentaron concentraciones muy similares para todas las hormonas cuantificadas siendo ligeramente mayores en los progestágenos y glucocorticoides para la hembra lactante (Figura 24).

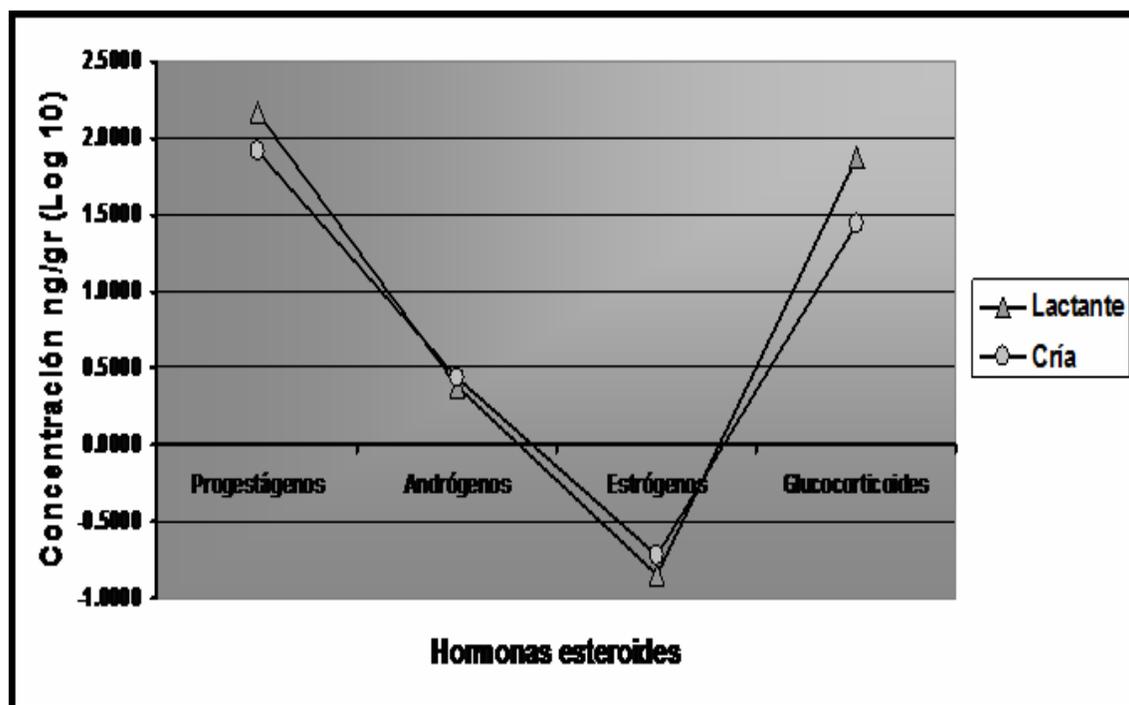


Figura 24. Concentraciones de esteroides en grasa de una hembra lactante y su cría.

Concentración de hormonas esteroides en machos de ballena azul y su relación con el estado reproductivo.

Se analizaron un total de 39 muestras de grasa provenientes de 5 machos maduros, 5 pubertos, 1 inmaduro y 6 crías, para las muestras restantes se desconoce su estado reproductivo (Anexo III).

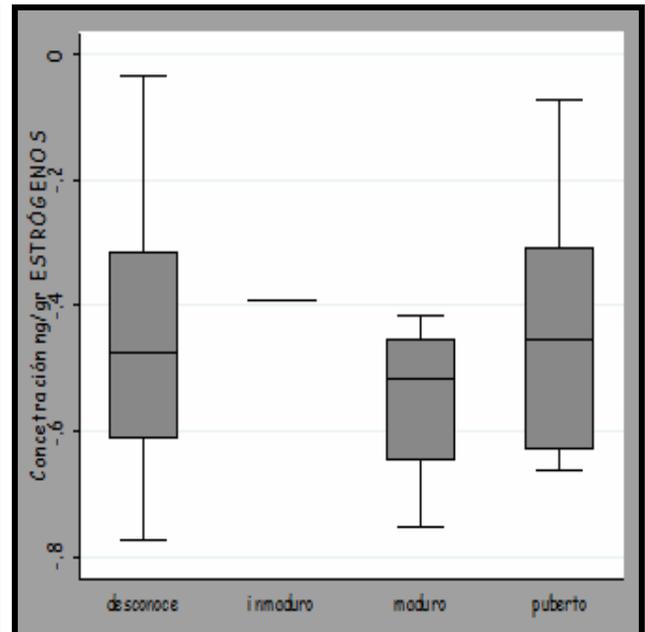
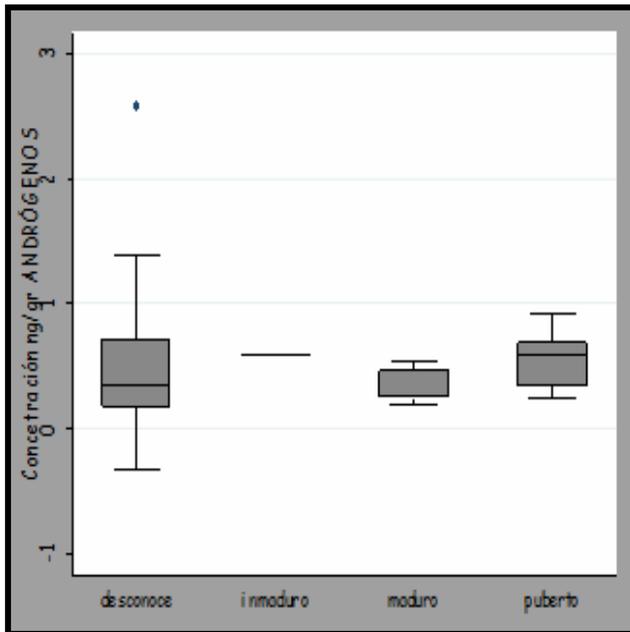
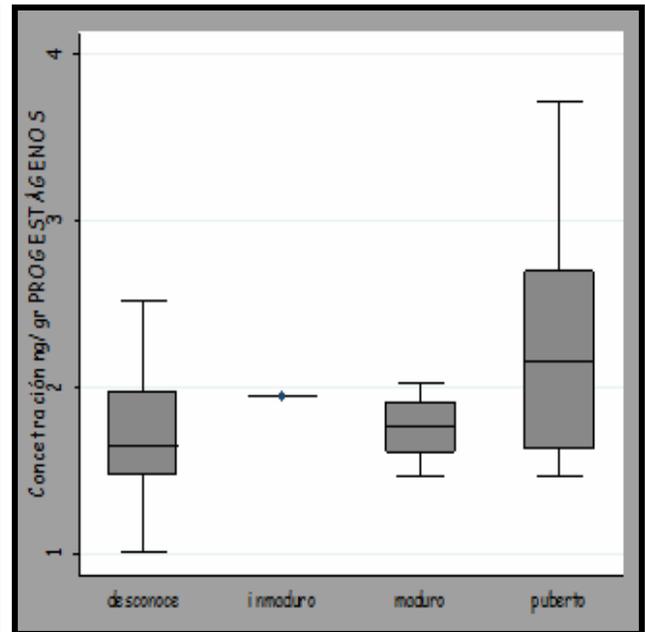
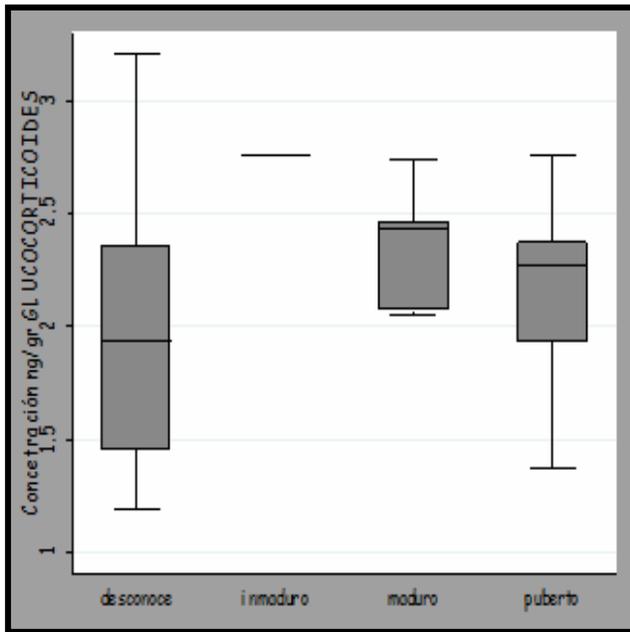
Al igual que en las hembras no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los estado reproductivos, pero si algunas tendencias. Las crías presentaron las mayores concentraciones para las hormonas cuantificadas, con excepción de los progestágenos, donde los machos pubertos (uno de ellos foto-identificado desde cría ID# 0240 y menor a 8 años) presentaron las mayores concentraciones (Tabla IX). Este grupo de machos, presentó mayores concentraciones de estrógenos, progestágenos y andrógenos, frente a los machos maduros. El macho inmaduro foto-identificado desde

cría, tuvo 2 años de edad al momento de la toma de biopsia (ID# 0454) y presentó las concentraciones de andrógenos y estrógenos similares a los machos pubertos (3.9754 ng /gr grasa para andrógenos y 0.4065 ng/gr grasa para estrógenos), una concentración de progestágenos similar a los machos maduros (87.3984 ng/gr grasa), y la mayor concentración de glucocorticoides (569.1057 ng/gr grasa).

Tabla IX. Concentración promedio de las hormonas esteroides (ng/gr tejido) referentes al estado reproductivo en machos de ballenas azules foto-identificadas en el Golfo de California.

Categoría	N	Glucocorticoides (ng/gr)	Estrógenos (ng/gr)	Progestágenos (ng/gr)	Andrógenos (ng/gr)
Maduro	5	267.39 ± 177.31	0.29 ± 0.08	63.51 ± 32.73	2.54 ± 0.85
Puberto	5	219 ± 212.27	0.42 ± 0.26	1180 ± 2258.79	4.22 ± 2.67
Inmaduro	1	569.1057	0.4065	87.3984	3.9754
Cría	6	303.49 ± 168.92	0.54 ± 0.29	726.16 ± 1369.16	4.67 ± 1.99
Desconoce	22	203.36 ± 338.69	0.39 ± 0.27	83.74 ± 94.10	21.60 ± 80.30

Los machos en general presentaron altas concentraciones de glucocorticoides siendo los machos pubertos quienes presentaron la mayor variación para estas hormonas. Con respecto a los andrógenos, se observó una tendencia de estos hacia una menor concentración en relación al estado reproductivo, donde las crías mostraron la mayor concentración y los machos maduros las menores concentraciones (Figuras 25, 26, 27 y 28).



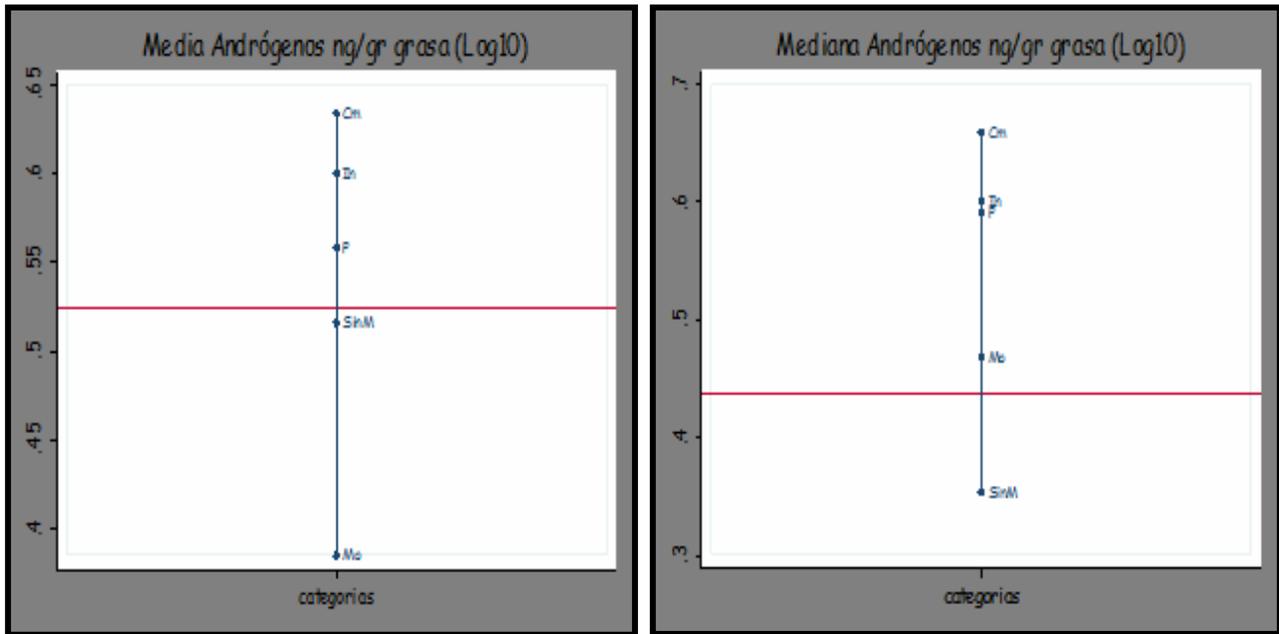
Figuras 25, 26, 27 y 28. Concentraciones de hormonas esteroides en grasa de machos maduros, inmaduros, pubertos y de los que se desconoce su estado, de ballenas azules en el Golfo de California. La línea dentro de la caja representa el 50% de los datos y la caja abarca el 25-75%, mientras que los bigotes representan los valores mínimos y máximos. Los puntos representan datos extraordinarios (outliers). Datos en  $\text{Log}_{10}$ .

Se analizó la influencia de los datos extraordinarios sobre los promedios por medio de gráficas de violín. Los resultados mostraron que las medianas para las concentraciones hormonales en los machos fueron muy similares a las medias, aunque ligeramente mayores en algunos casos, lo contrario a lo observado en las categorías de las hembras donde todas las concentraciones por categoría fueron mayores considerando la media en lugar de la mediana (Tabla X).

Las tendencias por categoría permanecieron iguales al considerar la media o la mediana, salvo para el caso de los andrógenos, donde la mediana para los andrógenos fue mayor en los machos maduros en comparación con los machos sin categoría, lo que no ocurre al considerar la media (Figuras 29 y 30). Lo anterior se debe a la presencia de un macho cuya categoría se desconoce (ID# 0374) y que presenta la mayor concentración de andrógenos encontrada en las ballenas azules (380.20 ng/gr grasa).

Tabla X. Mediana y media de las concentraciones de hormonas esteroides en machos de ballenas azules por categoría y la diferencia entre ambas.

	Cría			Pubertos		
	Media	Mediana	Diferencia	Media	Mediana	Diferencia
Progestágenos	2.2640	2.0900	<b>0.1740</b>	2.3308	2.1500	<b>0.1808</b>
<b>Andrógenos</b>	0.6332	0.6583	<b>0.0251</b>	0.5575	0.5896	<b>0.0321</b>
<b>Estrógenos</b>	0.2664	0.3266	<b>0.0602</b>	0.4246	0.4524	<b>0.0278</b>
<b>Glucocorticoides</b>	2.4104	2.4922	<b>0.0818</b>	2.1387	2.2695	<b>0.1308</b>
	Sin categoría			Maduros		
	Media	Mediana	Diferencia	Media	Mediana	Diferencia
Progestágenos	1.7124	1.6600	<b>0.0524</b>	1.7575	1.7000	<b>0.0575</b>
<b>Andrógenos</b>	0.5153	0.3531	<b>0.1622</b>	0.3846	0.4672	<b>0.0826</b>
<b>Estrógenos</b>	0.4526	0.4736	<b>0.0210</b>	0.5507	0.5172	<b>0.0335</b>
<b>Glucocorticoides</b>	1.9912	1.9394	<b>0.0518</b>	2.3501	2.4301	<b>0.0800</b>



Figuras 29 y 30. Mediana y media de la concentración de andrógenos por categoría en machos. Cria (C), inmaduro (In), maduro (Mo) y sin categoría (SinM).

Se analizó igualmente la diferencia en las concentraciones de las hormonas esteroides con relación a los meses de muestreo y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, se observó la mayor variación para todas las hormonas en el mes de marzo, y una tendencia de los andrógenos y progestágenos a disminuir hacia el fin de la temporada no así para los estrógenos y glucocorticoides (Figura 31).

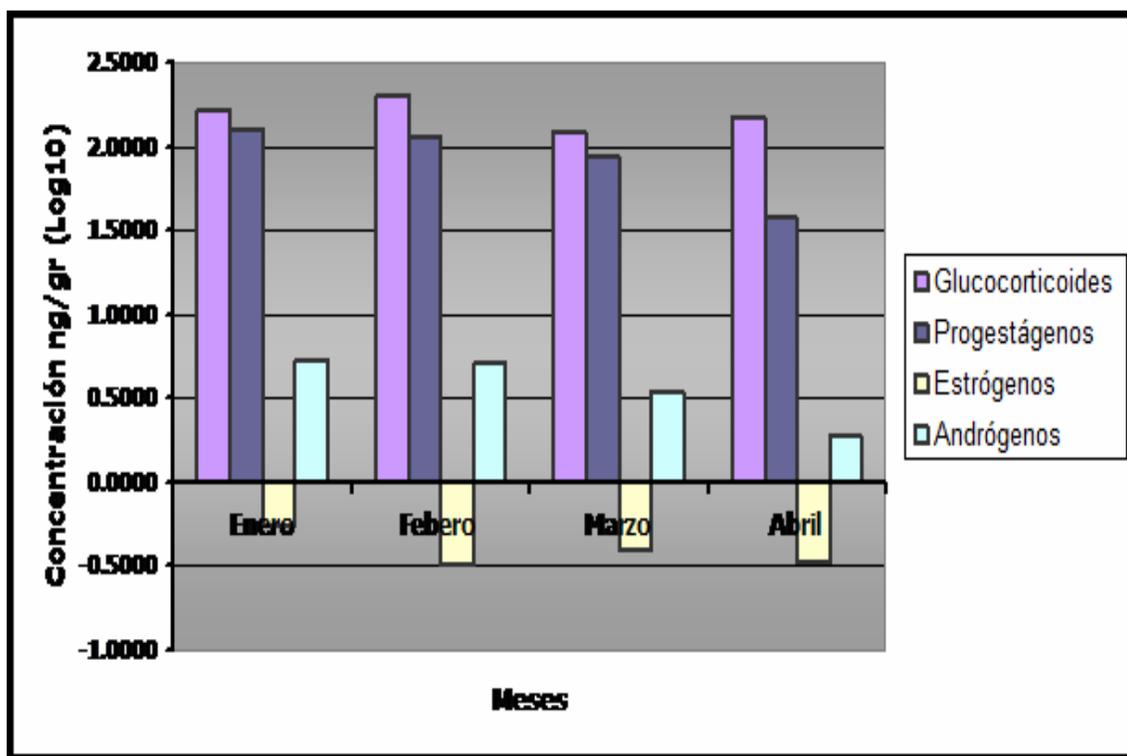


Figura 31. Gráfica de las concentraciones de a) glucocorticoides b) progestágenos c) estrógenos y d) andrógenos en grasa de machos de ballena azul en el Golfo de California en relación a los meses de muestreo.

#### Variación de las hormonas esteroides en las ballenas azules

Se organizó una matriz de datos considerando las 4 hormonas esteroides cuantificadas, así como la proporción andrógenos/estrógenos, andrógenos/glucocorticoides y estrógenos/glucocorticoides. El resultado del análisis de componentes principales (ACP) mostró que los glucocorticoides, los estrógenos y los andrógenos separaron las biopsias de acuerdo al sexo (Figura 32, Tabla XI). Donde el componente principal 1 está determinado por los estrógenos, andrógenos y glucocorticoides, mientras que en el componente 2 actúan los progestágenos.

Tabla XI. Eigenvalores y porcentaje de variación total en los componentes del ACP.

	Eigenvalor	% Varianza total	% acumulado
Componente 1	2.93955	41.99	41.99
Componente 2	2.28391	32.63	74.62
Componente 3	1.20545	17.22	91.84
Componente 4	.570916	0.00	100.00

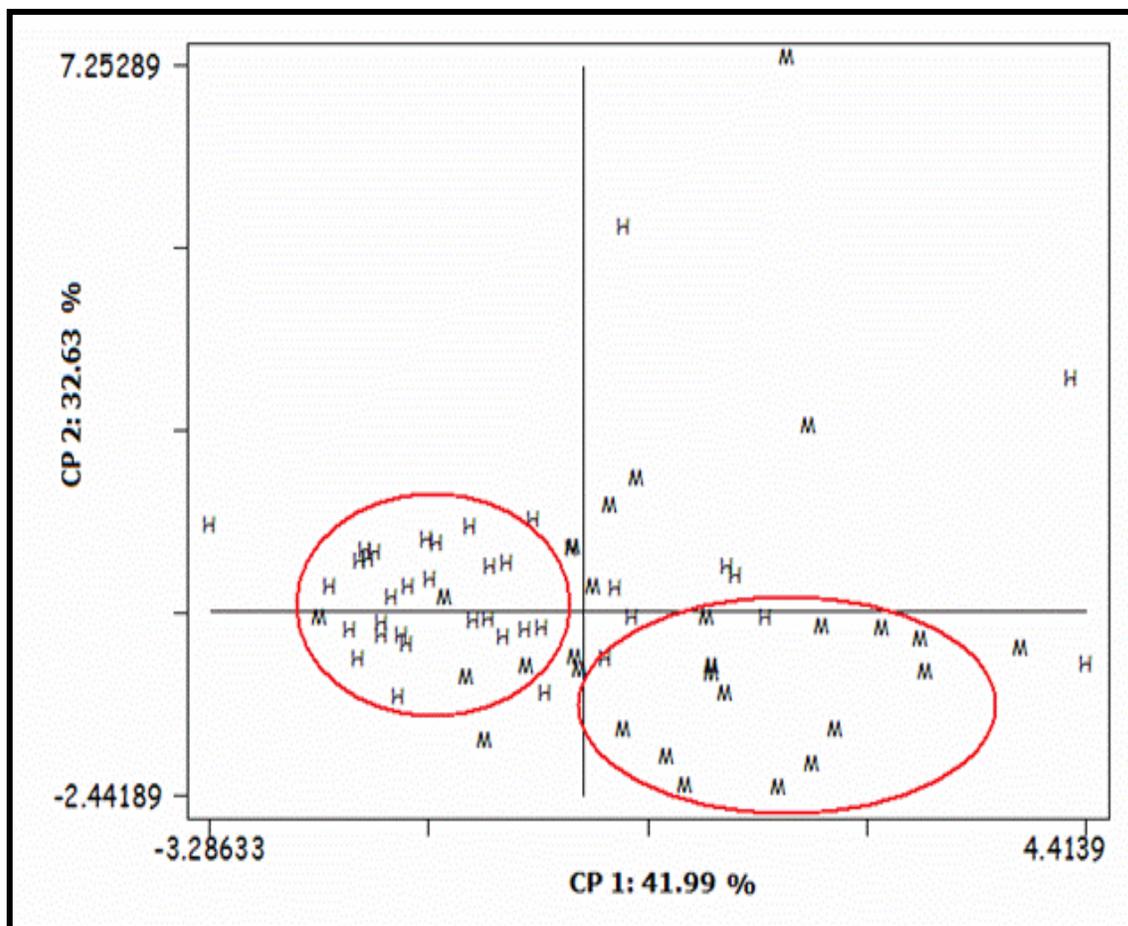


Figura 32. Ordenación de los individuos de ballena azul en función de las variables activas (H= Hembra, M= Macho).

Se realizó también un análisis discriminante con la finalidad de clasificar nuevamente a las biopsias de acuerdo al sexo. Para ello se utilizó un total de 65 casos conformados por 38 hembras y 27 machos para las cuales se consideró a las cuatro hormonas esteroides cuantificadas como predictores. De los 65 casos, el análisis discriminante identificó correctamente el sexo de 54 individuos, con una proporción correcta de 0.831. La asignación correcta del sexo para las hembras fue del 86% (33 aciertos de 38 biopsias), mientras que para los machos fue de 77% (21/27 biopsias) (Tabla XII y XIII).

Tabla XII y XIII Análisis discriminante: sexo contra andrógenos, progestágenos, estrógenos y glucocorticoides.

Distancia cuadrada entre grupos		
	H	M
H	0.00000	2.83115
M	2.83115	0.00000

Función lineal discriminante por grupos		
Constante	-67.098	-61.491
Glucocorticoides	22.569	24.915
Estrógenos	-65.051	-59.289
Progestágenos	20.411	17.22
Andrógenos	8.785	7.22

Este mismo análisis se realizó para clasificar a las hembras de acuerdo al estado reproductivo, para ello se utilizaron 19 biopsias con categoría conocida (3 crías, 5 lactantes y 11 maduras). Los análisis mostraron una asignación correcta de 11 biopsias, donde las 3 crías fueron asignadas correctamente a la categoría de crías (100%), de las 5 hembras lactantes 3 fueron asignadas correctamente (60%), y solo 5 hembras maduras se asignaron correctamente (45%) (Tabla XIV, XV y XVI). De las hembras asignadas incorrectamente se encuentran algunas cuyas concentraciones hormonales fueron muy elevadas en comparación con el resto de las hembras de su categoría (ID# 0253, 0124, 0282, 0050), dichas muestras fueron asignadas como crías (Tabla XVII).

Tabla XIV, XV y XVI. Análisis discriminante: estado reproductivo en hembras contra andrógenos, progestágenos, estrógenos y glucocorticoides.

Sumario de clasificación			
Grupos formado	Grupo verdadero		
	cría	lactante	madura
Cría	3	0	3
lactante	0	3	3
Madura	0	2	5
Total	3	5	11
Aciertos	3	3	5
Proporción	1.000	0.600	0.455
N	19		
N correctos	11		
Proporción correcta	0.579		

Distancia cuadrada entre grupos			
	cría	lactante	madura
cría	0.0000	3.8003	2.4144
lactante	3.8003	0.0000	0.2482
madura	2.4144	0.2482	0.0000

Función lineal discriminante por grupos			
	<b>cría</b>	<b>lactante</b>	<b>madura</b>
Constante	-163.44	-191.96	-185.32
Glucocorticoides	34.65	40.22	38.82
Estrógenos	-153.59	-170.20	-166.87
Progestágenos	70.49	73.22	72.70
Andrógenos	40.29	43.79	42.85

Tabla XVII. Observaciones de hembras asignadas incorrectamente por el análisis discriminante.

<b>ID</b>	<b>Grupo verdadero</b>	<b>Grupo asignado</b>		<b>Distancia cuadrada</b>	<b>Probabilidad</b>
0175	madura	lactante	cría	12.781	0.012
			lactante	5.018	0.600
			madura	5.894	0.387
0136	lactante	madura	cría	1.035	0.373
			lactante	1.866	0.246
			madura	0.990	0.381
0127	madura	lactante	cría	17.023	0.003
			lactante	5.957	0.644
			madura	7.160	0.353
0111	lactante	madura	cría	1.131	0.390
			lactante	2.341	0.213
			madura	1.092	0.397
0253	madura	cría	cría	3.830	0.377
			lactante	4.365	0.289
			madura	4.076	0.334
0124	madura	cría	cría	7.954	0.372
			lactante	8.163	0.335
			madura	8.424	0.294
0282	madura	lactante	cría	12.353	0.097
			lactante	8.982	0.524
			madura	9.629	0.379
0004	madura	cría	cría	0.323	0.533
			lactante	2.631	0.168
			madura	1.474	0.300

Este mismo análisis fue realizado en los machos, para ello se utilizaron 16 biopsias con categoría conocida de las cuales solo 7 fueron asignadas correctamente (47%). Las crías fueron asignadas correctamente en un 50%, los machos pubertos en un 40% y los machos maduros en solo un 25% (Tabla XVIII, XIX y XX).

Tabla XVIII, XIX y XX. Análisis discriminante: estado reproductivo en machos contra andrógenos, progestágenos, estrógenos y glucocorticoides.

Sumario de clasificación				
Grupos formado	Grupo verdadero			
	cría	inmaduro	puberto	maduro
cría	3	0	2	1
Inmaduro	1	2	0	1
puberto	0	0	2	1
maduro	2	0	1	1
N	5	2	5	4
N correctos	3	2	2	1
Proporción	0.50	1.00	0.40	0.25
N	17			
N correctos	8			
<b>Proporción correcta</b>	<b>0.47</b>			

Distancia cuadrada entre grupos				
	cría	inmaduro	puberto	maduro
Cría	0.0000	2.5346	2.1695	1.1798
inmaduro	2.5346	0.0000	8.6239	2.4499
puberto	2.1695	8.6239	0.0000	2.9221
maduro	1.1798	2.4499	2.9221	0.0000

Función lineal discriminante por grupos				
	cría	inmaduro	puberto	maduro
Constante	-69.19	-77.37	-69.77	-72.01
Glucocorticoides	16.47	21.42	12.58	17.51
Estrógenos	-97.25	-96.23	-104.29	-100.53
Progestágenos	7.21	4.02	10.79	7.25
Andrógenos	79.87	83.88	77.46	77.63

Tanto el ACP así como los análisis discriminantes resultan muy similares, ya que logran separar a los individuos de acuerdo al sexo dejando algunos casos ambiguos.

## DISCUSIÓN

En la actualidad existe poca información sobre la fisiología reproductiva en cetáceos (Mansour *et al.*, 2002), y en lo que respecta a su endocrinología, la determinación de hormonas sexuales para evaluar su función reproductiva apenas está desarrollándose debido a las dificultades de muestreo en estas especies. Se han realizado valoraciones hormonales en algunas especies de ballenas (Kjeld *et al.*, 1992; Toshihiro *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2006) pero hasta ahora no existen cuantificaciones de hormonas esteroides en la ballena azul, por lo que este trabajo representa la primera descripción del contenido de hormonas esteroides en la especie.

Con la finalidad de explorar la composición de las muestras analizadas y comprobar la eficiencia de la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) en la cuantificación de hormonas esteroides en grasa de ballena azul, se realizaron análisis por cromatografía de Gases-Masas (GC-MS por sus siglas en inglés), que es una técnica con alta sensibilidad y precisión (Ming-Ren *et al.*, 2004). Por medio de estos análisis, se detectó la presencia de las hormonas esteroides en las muestras representativas para los diferentes estados reproductivos de la ballena azul (Anexo VI y VII). Estas muestras analizadas mostraron un perfil similar en cuanto a las concentraciones obtenidas para las mismas muestras por el método de EIA, sin embargo, como se esperaba, los análisis por Gases-Masas presentaron concentraciones cuyos órdenes de magnitud fueron mucho mayores al método de EIA (Anexo VIII). En este último análisis, se utilizan anticuerpos específicos, los cuales reconocen y se unen a las hormonas esteroides y probablemente a ciertos metabolitos, aunque las reacciones cruzadas son desconocidas debido a que las pruebas típicamente se llevan a cabo para las hormonas más conocidas y para pocos metabolitos (Schwarzenberger, 2007). Los análisis GC-MS en cambio, son de gran sensibilidad, por lo que detectan tanto a las hormonas esteroides, como a otras sustancias como los metabolitos (Ming-Ren *et al.*, 2004).



Los análisis de EIA se realizaron a partir del extracto total esteroides (ETE), este extracto contiene otras sustancias además de las hormonas esteroides las cuales pueden interferir en el análisis, considerando los principios de unión competencia que utiliza este método. Mientras que para los análisis de GC-MS se realizó previamente una filtración al ETE lo que se suma a la alta sensibilidad del análisis.

Ambos métodos fueron eficientes para la cuantificación de hormonas esteroides, sin embargo, el análisis por EIA es una práctica alternativa para la cuantificación hormonal ya que requiere un mínimo de equipo, por lo que pueden ser cuantificados en el mismo sitio, reduciendo así el costo de los análisis así como el tiempo transcurrido entre la toma de las muestras y la obtención de los resultados (Graham, *et al.*, 2001).

Las hormonas esteroides cuantificadas en las ballenas azules presentaron asociaciones entre sí. Entre estas asociaciones la mas evidente y persistente para todas las muestras fue la asociación que mostraron los andrógenos y estrógenos ( $n= 77$ ;  $r = 0.6314$ ,  $P < 0.000$ ), así como la de estas mismas hormonas con los glucocorticoides ( $r= 0.7348$   $P < 0.000$  y  $r= 0.5012$   $P < 0.000$ , para estrógenos y andrógenos respectivamente). Aunque estas mismas asociaciones fueron reportadas en heces de ballena franca (Rolland *et al.*, 2005; Hunt *et al.*, 2006), estas mostraron algunas variaciones. En el caso de los andrógenos y estrógenos, en este trabajo se encontró una mayor proporción andrógenos/estrógenos en las hembras, a diferencia de lo encontrado por Rolland *et al.* (2005), quienes encontraron la mayor proporción en los machos.

Las diferencias en las proporciones hormonales reportadas para ambos estudios, pueden deberse a diversos factores. Uno de ellos es que las cuantificaciones fueron realizadas en diferentes tipos de muestras (grasas y excretas). Estudios de radiometabolismo en excretas de mamíferos afirman que los estrógenos en la forma de estradiol y/o estrona están presentes en las excretas, pero por el contrario, la testosterona, progesterona, y en especial el cortisol y la corticosterona son metabolizados en el tracto intestinal, por lo que estos esteroides son escasos en las heces fecales, en comparación con lo metabolitos que son más abundantes y son estos los que se cuantifican en dichas muestras (Schwarzenberger, 2007). En este trabajo en cambio, se



reportan las cuantificaciones hormonales realizadas con kits de inmunoensayo enzimático específicos para la cuantificación de progesterona, testosterona, estradiol y cortisol.

Otra explicación pudieran ser las diferencias en los métodos de extracción y la técnica utilizada en ambos estudios, por lo que los resultados son difíciles de comparar (Schwarzenberger, 2007; Schwarzenberger, *et al.*, 1996). Finalmente, también se consideran las variaciones que pudieran existir entre las dos especies, o bien, que las muestras fueron tomadas bajo condiciones diferentes. Las muestras de ballena franca fueron obtenidas durante los meses de primavera-verano en que las ballenas francas se congregan en la Bahía de Fundy para alimentarse (Rolland *et al.*, 2005) y llevar a cabo actividades de reproducción (Hunt *et al.*, 2006). En cambio las muestras obtenidas para las ballenas azules fueron obtenidas en la misma temporada pero en una zona de crianza y de alimentación para la especie (Gendron, 2002).

#### Concentraciones de hormonas esteroides en ballenas azules

Los resultados sobre hormonas esteroides en ballena azul, coinciden con lo reportado por estudios previos para otras especies de cetáceos, sin embargo, la cuantificación de estas hormonas no permitió determinar la presencia de hembras grávidas. A pesar de conocer a más de 550 individuos en esta zona (Gendron *et al.*, 2006), se observan cada año individuos nuevos de los que no se conocen su madurez sexual, lo que no permite diferenciar a todos los individuos entre maduros (as) e inmaduros (as). Del mismo modo, el obtener biopsias de una hembra sola y el año siguiente vista con una cría, podría proporcionar información sobre un posible estado de gravidez, sin embargo la probabilidad de tomar biopsias de una de las 60 hembras maduras sexualmente, las cuales solo tienen crías cada 2 o 3 años (Gendron, 2002) y que además fuese grávida es simplemente muy baja. No obstante, falta corroborar si la hembra #124, la cual presentó las mayores concentraciones para todas las hormonas esteroides, se observa el próximo año 2009 con una cría.



Dentro del grupo de hembras se encontraron una hembra madura (ID# 0253) y otra de madurez sexual desconocida (ID# 0385) que presentaron aproximadamente el doble de estrógenos (0.456 ng/gr grasa) en comparación con el promedio encontrado en las hembras maduras, y que son similares a la concentración promedio de las crías. Es posible que estos datos estuvieran reflejando condiciones cercanas a un estro, donde las concentraciones de estrógenos son elevadas y producida por parte de los folículos ováricos en desarrollo (Senger 2003). Sin embargo, cabe mencionar que es difícil determinar la presencia de un estro si no se tienen más datos de las historias de vida los individuos que permitan unir los contenidos hormonales con otros datos fisiológicos o de comportamiento, o bien, más muestras de un mismo individuo. Por ejemplo, en leopardos (*Pantera pardus nimr*) en cautiverio, De Haas van Dorsser *et al.* (2007) reportan altas variaciones en los estrógenos entre individuos y entre días en una misma hembra, lo que dificulta aún más la determinación de los valores basales de estas hormonas y por lo tanto la determinación de un estro en ballena azul.

Aunque la temporada de muestreo enero a abril posiblemente abarcó los meses de muestreo donde se cree inicia la cópula de la ballena azul, la ausencia de altos niveles de progestágenos (indicando gravidez) y los bajos niveles de estrógenos (indicando fase de estro) representa un argumento más en la idea de que la copulación ocurra más bien fuera del Golfo de California a lo largo de la costa occidental durante los meses de abril a junio (Gendron, 2002).

Las altas concentraciones de todas las hormonas cuantificadas en las crías así como la variación en las mismas ha sido reportada para otros mamíferos (Dehnhard *et al.*, 2006; Hunt *et al.*, 2006) y probablemente se explican por la transferencia de hormonas a través de la leche materna y su almacenamiento en la grasa por ser sustancias no metabolizadas. Lo anterior se relaciona con los contenidos hormonales entre una madre y su cría, los cuales fueron muy similares entre ambos y para todas las hormonas, siendo ligeramente mayores los progestágenos y los glucocorticoides en la hembra lactante (Figura 20). Esta transferencia de madre a cría ha sido reportada en ballena azul para otras sustancias lipofílicas como los contaminantes organoclorados (Metcalf *et al.*, 2004;



Flores-Lozano, 2006), así como la transferencia y transformación de algunos ácidos grasos (Rueda-Flores, 2007).

Las hembras maduras, conformadas por hembras en diferentes etapas de su ciclo reproductivo, fueron el grupo más heterogéneo en el contenido de esteroides. Particularmente, la gran variación en los contenidos de progestágenos y estrógenos probablemente es un reflejo de la actividad ovárica (Senger, 2003; Kjeld *et al.*, 2004). Slijper (1979) menciona que en el caso de la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) 12% de las hembras ovulan 2 meses después del parto, mientras que otras ovulan después del periodo de lactancia, estableciéndose un periodo de anestro durante el tiempo de lactancia (aproximadamente 5 meses) (Boness, 2002). Esta condición pudiera estar ocurriendo en las hembras de ballena azul quienes probablemente presentan un ciclo reproductivo similar a la ballena de aleta, lo que explicaría la heterogeneidad en el grupo de las hembras maduras, ya que en el periodo de estro, las concentraciones de estrógenos son altas, y las de andrógenos bajas, mientras que durante el anestro, las concentraciones de ambas hormonas son bajas (Senger, 2003).

El grupo más homogéneo en cuanto al contenido hormonal fueron las hembras lactantes, donde todas las muestras presentaron concentraciones muy similares, que son un reflejo de los cambios hormonales que ocurren durante la lactancia, donde los estrógenos intervienen en la inducción de prolactina, promoviendo de esta manera la secreción de leche en las glándulas mamarias (Senger, 2003). Las concentraciones de andrógenos fueron mayores en las hembras lactantes de ballena azul, en comparación con las hembras maduras que coincide con lo reportado por Rolland *et al.* (2005), quienes reportan para las hembras lactantes de ballena franca mayores concentraciones de andrógenos en comparación con las hembras maduras, y que es contrario a lo reportado por Dloniak *et al.* (2004) para las hienas (*Crocuta crocuta*) donde las hembras lactantes presentaron las menores concentraciones de estas hormonas entre todas las categorías de adultos.



Las mayores concentraciones de glucocorticoides en las hembras fueron encontradas en las hembras lactantes, destacando el caso de una lactante (ID# 0050), con concentraciones de glucocorticoides aún por encima de los machos. Estas altas concentraciones pueden ser explicadas debido a que los glucocorticoides, conocidos como hormonas del estrés, participan en la movilización de reservas de energía, necesarias durante un decremento en el estado nutricional del individuo, como lo que ocurre durante la lactancia (Huber et al., 2003). La mayoría de las ballenas azules lactando y acompañadas de una cría se les observa con las vértebras claramente prominentes en comparación con otros individuos sin cría (Gendron, 2002) lo que refleja el alto requerimiento energético de la lactancia, la cual es solo alrededor de 6 o 7 meses en esta especie (Lockyer, 1984). Además, durante el periodo de lactogénesis es importante la presencia de glucocorticoides, así como otras hormonas como la prolactina e insulina (Stelwagen *et al.*, 1998). Estas concentraciones elevadas de glucocorticoides en las hembras lactantes en comparación con las hembras en reposo fueron reportadas también para la ballena franca (Hunt *et al.*, 2006), así como para otras especies de mamíferos (Millspaugh y Washburn, 2004).

Otro aspecto interesante sobre los glucocorticoides fue encontrar concentraciones significativamente mayores en los machos que en las hembras, lo que posiblemente indica que es una condición fisiológica en los machos, lo que coincide con los resultados en ballenas francas (Hunt *et al.* 2006), quienes encuentran las mayores concentraciones en machos maduros. En la ballena azul los valores aparentemente mayores se presentaron en un individuo inmaduro y las crías. Las altas concentraciones en machos maduros de ballena franca, fueron atribuidos a la intensa competencia reproductiva de esta especie en los grupos activos en superficie ya que aunque las muestras corresponden a una zona de alimentación también llevan a cabo actividades de copulación (Hunt *et al.*, 2006). Las mayores concentraciones en el macho inmaduro y las crías pueden deberse a un mayor estímulo estresante en estos individuos, como pudiera ser un esfuerzo físico o algún tipo de amenaza (Kjeld, 2001).



Estas diferencias en las concentraciones hormonales de glucocorticoides por género, han sido reportadas para otras especies como roedores, ungulados, perros primates, y humanos (Wielebnowski *et al.*, 2002) aunque en algunos casos las hembras son las que presentan las mayores concentraciones de glucocorticoides. Estas diferencias por género en la actividad adrenal fueron reportadas por Wielebnowski *et al.* (2002) para la pantera nebulosa de Norteamérica (*Neofelis nebulosa*) donde las mayores concentraciones de glucocorticoides en las hembras se argumentan por una adaptación evolutiva en donde las hembras están adaptadas a un mayor estrés por el cuidado de las crías y a su menor tamaño en comparación con los machos, lo que las hace más susceptible a la depredación y a la agresión intersexual.

Las concentraciones hormonales no presentaron tendencia clara en cuanto a cambios en el tiempo (Figura 31), lo que puede deberse a que el muestreo no abarcó el periodo de la cópula de esta especie. Otra posible explicación son las fluctuaciones estacionales que se presentan como en el caso de los andrógenos (Kellar *et al.* 2006(b)) y lo que no puede ser evidente debido al corto periodo de muestreo.

Dentro de los machos, se obtuvieron biopsias de un macho puberto de 6 años conocido desde cría (ID# 0240, biopsia 350 tomada en 2004, ver cuadro 8). Este macho presentó la mayor concentración de progestágenos encontrada en las ballenas azules analizadas, así como concentraciones elevadas para el resto de las hormonas esteroides. Este mismo individuo biopsiado nuevamente dos años después, considerado ya como un adulto (biopsia 550 tomada en 2006, ver Tabla VI), presentó concentraciones hormonales menores a las determinadas como inmaduro. Estos cambios en las concentraciones hormonales de ambas muestras, posiblemente estén relacionados con los procesos endocrinos que ocurren durante la pubertad. En esta etapa, las altas concentraciones de andrógenos y estrógenos son necesarias para inhibir las concentraciones de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH), inicialmente necesarias para una retroalimentación negativa de las células del hipotálamo con baja sensibilidad, y que son necesarias a su vez para producir altas concentraciones de hormonas folículo estimulantes (FSH) y luteinizantes (LH) responsables de los procesos reproductivos durante la pubertad junto con las hormonas esteroides (Senger, 2003).



En este trabajo se consideró la influencia de los datos extraordinarios sobre los promedios de las concentraciones hormonales para cada categoría, debido a que no se cuenta con un marco de referencia en cuanto a estas concentraciones para la ballena azul. Este es el primer trabajo sobre contenido hormonal, y no es posible hacer comparaciones en cuanto a las concentraciones con otras especies, debido a las variaciones dentro de la técnica y de las muestras biológicas utilizadas, además de que se ha observado que existen variaciones considerables en cuanto a los rangos de concentración para cada especie (Schwarzenberger, 2007).

La media es una medida de tendencia central cuya desventaja es que se ve afectada por los valores extremos, mientras que con la mediana esto no ocurre (Weimer, 2005). Los resultados mostraron que la presencia o ausencia de los datos extraordinarios no alteraron de manera significativa los promedios (media) de las concentraciones hormonales, pero sí mostraron tener una tendencia en la mayoría de los casos a aumentar la media de cada categoría, lo que se comprobó al comparar las medias con las medianas.

A pesar de que no se logró determinar las categorías reproductivas intrasexuales de los individuos no conocidos usando las concentraciones hormonales sí se observó una separación de las ballenas azules por sexo. Además, la menor variación obtenida en las concentraciones de las hormonas esteroides de las hembras lactantes, quienes conformaron el grupo más homogéneo, sugiere que las concentraciones hormonales pueden ser buenos indicadores de un estado reproductivo determinado. Lo que se requiere es tener un mayor número de muestras de individuos conocidos, para poder establecer con precisión las concentraciones hormonales por categoría.

Los estudios sobre valoración hormonal como lo es el presente trabajo, están siendo aplicados a una gran variedad de especies en conjunto con otros parámetros, como el comportamiento u otros aspectos reproductivos (Schwarzenberger *et al.*, 1996). Debido a que es crucial comprobar que las fluctuaciones en las hormonas esteroides cuantificadas proveen información fisiológica relevante, es importante la validación tanto fisiológica como de la técnica a utilizar para cada especie y medio (grasa, excretas, orina, sangre); y



de esta forma demostrar que las estimaciones sobre la producción hormonal son confiables (Monfort, 2002).

Los análisis GC-MS permitieron la validación del método utilizado al verificar la presencia de las hormonas esteroides cuantificadas por la técnica de EIA en muestras representativas de grasa de ballenas azules, y aunque la validación fisiológica para esta especie es difícil de realizar, los contenidos hormonales de este trabajo asociados con algunos estados reproductivos, representan los primeros indicios de la endocrinología reproductiva de la especie. Sin embargo, es necesario continuar con estudios de este tipo, que cuenten con más individuos con historias de vida conocidas, así como de muestras con origen diferente (excretas y grasas por ejemplo), que permitan realizar una comparación de las concentraciones hormonales obtenidas.

No se conoce aún el ciclo reproductivo de la ballena azul, y es aún menor la información que se tiene sobre su endocrinología reproductiva. Sus largos intervalos entre nacimientos y su edad de madurez sexual tardía en comparación con otras especies, hacen que se requieran muchos años de estudio para generar información sobre su reproducción (Gendron, 2002). Los datos de este trabajo representan la primera descripción del contenido de hormonas esteroides en esta especie, basado en un muestreo que considera diferentes categorías de edad, pero que se encuentra restringido a pocos meses de muestreo (enero-abril).



## CONCLUSIONES

- El método de Inmunoensayo enzimático es una herramienta útil para evaluar el contenido hormonal en grasa de ballena azul.
- Los perfiles en las concentraciones hormonales determinadas por Cromatografía por Gases-Masas fueron similares a las obtenidas por el método de Inmunoensayo enzimático, lo que permite verificar la eficiencia del método en la valoración hormonal para la ballena azul.
- Las concentraciones hormonales permitieron separar por género a las ballenas azules. Las concentraciones de glucocorticoides fueron significativamente mayores en los machos, lo que pudiera estar reflejando una condición fisiológica del género, o bien una preparación de los machos para la reproducción.
- Existe transferencia de hormonas esteroides a través de la leche materna, por lo que la variación de los contenidos hormonales en las crías son un reflejo de este proceso y coincide con otros mamíferos.

## RECOMENDACIONES

Las concentraciones hormonales en muestras de grasa son una herramienta útil que reflejan la condición fisiológica de las ballenas azules, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en los contenidos hormonales para los diferentes estados reproductivos, lo que pudo ser resultado de un bajo poder estadístico debido al poco número de muestras. La inclusión de un mayor número de muestras biológicas de individuos conocidos permitirán más estudios y con mayor precisión para definir rangos de los contenidos hormonales por edad y estado reproductivo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO-GUTIÉRREZ, A., D. A. CROLL & B. R. TERSHY. 2002. High feeding cost limit dive time in the largest whales. *Journal Experiment Biology*. 205:1747-1753.
- ÁLVAREZ- BORREGO, S. 1983. Gulf of California. En: Ketchum, B. K. (Ed.), *Ecosystems of the world 26, Estuaries and enclosed seas*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, P. 427- 449.
- ÁLVAREZ – BORREGO, S. y R. A. SCHWARTZLOSE. 1979. Masas de agua del Golfo de California. *Ciencias Marinas*. 6: 43-63.
- ALVAREZ-CASTAÑEDA, S. T. y J. L. PATTON. 2000. *Mamíferos del Noroeste de México II*. CIBNOR, La Paz, B.C.S. 875 pp.
- ATKINSON, S. y W. G. GILMARTIN. 1992. Seasonal testosterone pattern in Hawaiian monk seals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 96: 35-39.
- BONESS, D. J. 2002. Estrus and estrous behavior. En *Encyclopedia of Marine Mammals*. Perrin, W. F., W. Bernd y J. Thewissen. Academic Press. 107-111.
- BOYD, I. J. 1984. Developmente and regression of the corpus luteum in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 69: 157-164.
- DE HAAS VAN DORSSER, F. J., D. I. GREEN, W. V. HOLT y A. R. PICKARD. 2007. Ovarian activity in Arabian leopards (*Pantera pardus nimr*): sexual behaviour and faecal steroid monitoring during the follicular cycle, mating and pregnancy. *Reproduction Fertility and Development*. 19: 822-830.
- DEHNARD, M., T. B. HILDEBRANDT, T. KNAUF, K. JEWGENOW, L. KOLTER y F. GÖRITZ. 2006. Comparative endocrine investigations in three bear species based on urinary steroid metabolites and volatiles. *Theriogenology*. 66: 1755-1761.

- DESPORTES, G., M. SABOUREAU y A. LACROIX. 1994. Growth-related changes in testicular mass and plasma testosterone concentrations in long-finned pilot whales, *Globicephala melas*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102: 237-244.
- DLONIAK, M. S., J. A. FRENCH, N. J. PLACE, M. L. WELDELE, S.E. GLICKMAN y K. E. HOLEKAMP. 2004. Non-invasive monitoring of fecal androgens in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). *General and Comparative Endocrinology*. 135: 51-61.
- ENRÍQUEZ-PAREDES. 2005. Identificación genética de la población de ballena azul (*Balaenoptera musculus*) en el Pacífico Nororiental: Agregación mexicana. *Tesis de doctorado*. UABC. México. 170 pp.
- FIEDLER, P. A., S. B. REILLY, R. P. HEWITT, D. DEMER, V. A. PHILBRICK, S. SMITH, W. ARMSTRONG, D. A. CROLL, B. R. TERCHY y B. R. MATE. 1998. Blue whale habitat and prey in the California Channel Islands. *Deep Sea Research. II*. 45: 1781-1801.
- FLORES-LOZANO, N. 2006. Plaguicidas organoclorados y bifenil policlorados como indicadores de la estructura poblacional de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) del Golfo de California. *Tesis de maestría*. CICIMAR. México. 77 pp.
- GENDRON, D. 2002. Ecología poblacional de la ballena azul de la Península de Baja California. *Tesis de doctorado IDEM*. CICESE. México. 112 pp.
- GENDRON, D. N. FLORES-LOZANO, M. RUEDA-FLORES, G. BUSQUETS-VASS, A. UGALDE DE LA CRUZ, L. ENRIQUEZ PAREDES y C. D. ORTEGA-ORTIZ. 2006. Estructura poblacional y reproducción de la ballena azul del Golfo de California. *1a Reunión Internacional sobre el Estudio de los Mamíferos Acuáticos SOMEMMA – SOLAMAC*.

- GRAHAM L., F. SCHWARZENBERGER, E. MÖSTL, W. GALAMA y A. SAVAGE. 2001. A versatile Enzyme Immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. *Zoo Biology*. 20: 227-236.
- HAMUDIKUWANDA, H., G. GALLO, E. BLOCK y B. R. DOWNEY. 1996. Adipose tissue progesterone concentrations in dairy cows during late pregnancy and early lactation. *Animal Reproduction Science*. 43: 15-23.
- HUBER, S., R. PALME y W. ARNOLD. 2003. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *General and Comparative Endocrinology*. 130: 48-54.
- HUNT, K., R. M. ROLLAND, S. D. KRAUS y S. K. WASSER. 2006. Analysis of fecal glucocorticoids in the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). *General and Comparative Endocrinology*. 148: 260–272.
- KARDONG. 1999. *Vertebrados. Anatomía comparada, función, evolución*. Mc Graw Hill. Interamericana. España. 732 pp.
- KELLAR, N., M. TREGO, C. MARKS y A. DIZON. 2006 (a). Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. *Marine Mammal Science*. 22 (1): 1-16.
- KELLAR, N., M. TREGO y C. MARKS. 2006 (b). Testosterone and blubber: Assessing male sexual maturity state and mating from common dolphin biopsies. *16th SMM Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals*.
- KJELD, M. 2001. Concentrations of electrolytes, hormones, and, other constituents in fresh postmortem blood and urine of fin whales (*Balaenoptera physalus*). *Canadian Journal of Zoology*. 79: 438-446.

- KJELD, J.M., J. SIGURJÓNSSON y A. ÁRNASON. 1992. Sex hormone concentrations in blood serum from the North Atlantic fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Journal of Endocrinology*. 134: 405-413.
- KJELD, M., Á. ALFREDSSON, Ö. OLAFSSON, M. TRYLAND, I. CHRISTENSEN, S. STUEN y A. ÁRNASON. 2004. Changes in blood testosterone and progesterone concentrations of the North Atlantic minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) during the feeding season. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 61: 230-237.
- LAVÍN, M.F., E. BEIER y A. BADAN. 1997. Estructura hidrográfica y circulación del Golfo de California: Escalas estacional e interanual. En: Lavín, M.F. (ed.), *Contribuciones a la Oceanografía Física en México*. Monografía UGM 3. pp. 139-169.
- LOCKYER, C. 1984. Review of baleen whale (Mysticeti) reproduction and implications for management. *Report International Whaling Commission. Spec. Iss.* 6: 27-50.
- LLUCH-COTA, S. E. 2000. Coastal upwelling in the eastern Gulf of California. *Oceanologica Acta*. 23(6): 731-740.
- MANSOUR, A., D. MCKAY, J. LIE, J. ORR, J. BANOUB y G. STENSON. 2002. Determination of pregnancy status from blubber samples in minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Marine Mammal Science*. 18 (1): 112-120.
- MARTIN, A. R., P. REYNOLDS y M.G. RICHARDSON. 1987. Aspects of the biology of pilot whales (*Globicephala melaena*) in recent mass stranding on the British coast. *Journal of Zoology*. 211: 11-23.

- METCALFE, C. B. KOENIG, T. METCALFE, G. PATERSON y R. SEARS. 2004. Intra- and inter-species differences in persistent organic contaminants in the blubber of blue whales and humpback whales from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Marine Environmental Research*. 57: 245–260.
- MILLSPAUGH, J. J. y B. E. WASHBURN. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology*. 138: 189-199.
- MING-REN F., H. SHU-YEN y L. TZEUN-YEAN. 2004. Determination of residual anabolic steroid in meat by gas chromatography-ion-trap-mass spectrometer. *Talanta*. 64: 408-414.
- MONFORT, S. L. 2002. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. En: *Reproductive Science and Integrated Conservation*. Holt, W. V., A. R. Pickard, J. C. Rodger, D. E. Wildt. Cambridge University Press. 147- 165.
- OLAFSSON, I. y M. KJELD. 1986. Serum progesterone and testosterone levels in fin whales (*Balaenoptera physalus*). *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 42, (4): 300-306.
- OKEUDO, N. J. y B. W. MOSS. 2005. Serum cortisol concentration in different sex-types and slaughter weights, and its relationship with meat quality and intramuscular fatty acid profile. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4(2): 64-68.
- PIETRASZEK, J. y S. ATKINSON. 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 shauinslandi*). *Marine Mammal Science*. 10 (4): 430-441.

- REEVES R., P. CLAPHAM, R. L. BROWNELL y G. K. SILBER. 1998. *Recovery plan for the blue whale (*Balaenoptera musculus*)*. NOAA. EUA. 39 pp.
- REILLY, S. B., y V. G. THAYER. 1990. Blue whale (*Balaenoptera musculus*) distribution in the Eastern Tropical Pacific. *Marine Mammal Science*. 6: 265-277.
- REIJNDERS, P. J. H. 1990. Progesterone and oestradiol 17- $\beta$  concentration profiles throughout the reproductive cycle in harbor seals (*Phoca vitulina*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 90: 403-409.
- ROBECK, T. R., A. L. SHNEYER, J. F. McBAIN, L. M. DALTON, M. T. WALSH, N. M. CZEKALA y D. C. KRAEMER. 1993. Analysis of urinary immunoreactive steroid metabolites and gonadotropins for characterization of the estrous activity of captive killer whales (*Orcinus orca*). *Zoo Biology*. 12: 173-187.
- RODEN, G. L. 1964. Oceanographic aspects of the Gulf of California. En Von Andel T. H. y G. G. Shor, Jr. (Eds), *Marine geology of the Gulf of California*. American Association of Petroleum Geologists *Memories*. 3: 20-38.
- ROLLAND, R. M., K. E. HUNT, S. D. KRAUS y S. K. WASSER. 2005. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. *General and Comparative Endocrinology*. 142: 308-317.
- RUEDA-FLORES M. 2007. Variabilidad de perfiles de ácidos grasos de ballena azul, *Balaenoptera musculus*, en el Golfo de California. *Tesis de maestría*. CICIMAR. México. 80 pp.
- SALAME-MÉNDEZ, A., J. HERRERA-MUÑOZ, A. CASTRO-CAMPILLO y J. RAMÍREZ-PULIDO. 2003(a). Valoración de esteroides sexuales en testículos de ratones juveniles de *Peromyscus melanotis* (Rodentia: Muridae). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 1: 83-90.

- SALAME-MÉNDEZ, A., R. M. VIGUERAS-VILLASEÑOR, J. HERRERA-MUÑOZ, E. MENDIETA-MÁRQUEZ, I. H. SALGADO-UGARTE, A. CASTRO-CAMPILLO y J. RAMÍREZ-PULIDO. 2003(b). Inmunolocalización y contenido de esteroides sexuales en ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* Allen & Chapman, 1987 (Rodentia: Muridae) durante la primera mitad de la preñez. *Acta Zoológica Mexicana*. 88: 43-57.
- SALAME-MÉNDEZ, A., A. CASTRO-CAMPILLO, I. SALGADO-UGARTE, E. MENDIETA-MÁRQUEZ, J. HERRERA-MUNOZ y J. RAMIREZ-PULIDO. 2004. Evaluación estacional de la producción de esteroides sexuales en testículos del ratón de orejas oscuras (*Peromyscus melanotis*, Allen & Chapman, 1987) de diferentes clases de edad. *Acta Zoológica Mexicana*. 20 (2): 103-114.
- SALGADO-UGARTE, I. H. 2002. *Suavización no paramétrica para análisis de datos biológicos*. UNAM. México. 130 pp.
- SANSON, G., J. L. BROWN y W. FARSTAD. 2005. Non-invasive faecal steroid monitoring of ovarian and adrenal activity in farmed blue fox (*Alopex lagopus*) females during late pregnancy, parturition and lactation onset. *Animal Reproduction Science*. 87: 309-319.
- SANTAMARÍA-DEL-ÁNGEL, E., S. ÁLVAREZ-BORREGO y F.E. MÜLLER-KARGER. 1994. Gulf of California biogeographic regions based on coastal zone color scanner imagery. *Journal of Geophysical Research*. 99:7411-7421.
- SAWYER-STEFFAN, J., V. L. KIRBY y W. G. GILMARTIN. 1983. Progesterone and estrogens in the pregnant and non pregnant dolphin, *Tursiops truncatus*, and the effects of induced ovulation. *Biology of reproduction*. 28: 897-901.
- SCHWARZENBERGER, F. 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*. 41: 52-74.

- SCHWARZENBERGER F., E. MÖSTL, R. PALME y E. BAMBERG. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science*. 42: 515-526.
- SEARS, R. 2002. Blue Whale (*Balaenoptera musculus*). En: *Encyclopedia of Marine Mammals*. Perrin, W. F., W. Bernd y J. Thewissen. Academic Press. 112-116.
- SENGER, P. L. 2003. *Pathways to pregnancy and parturition*. Current Conceptions. EUA. 368 pp.
- SLIJPER, E. J. 1979. *Whales*. Cornel University Press. E.U.A. 511 pp.
- SOTO, M. A., A. SALAME-MÉNDEZ, J. RAMÍREZ-PULIDO, L. YAÑEZ y M. A. ARMELLA. 2004. Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de Lobo Mexicano (*Canis lupus bailey*) en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana*. 20(2): 187 – 196.
- STELWAGEN, K., D.C. VAN ESPEN, G. A. VERKERK, H. A. Mc. FADDEN y V. C. FARR. 1998. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. *Journal of Endocrinology*. 159: 173-178.
- SCHWARZENBERGER, F., E. MOESTL, R. PALME, E. BAMBERG. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science*. 42(1-4): 515-526.
- SCHWARZENBERGER, F. 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*. 41: 52-74.
- TOMILIN, A. G. 1967. Mammals of the USSR and adjacent countries. Vol IX. *Cetacea, Israel Program for Scientific Translations*. Jerusalem. 717 pp.

- TOSHIGIRO, M., T. SUZUKI, M. ASADA, Y. FUKUI, H. ISHKAWA y S. OHSUMI. 2000. Functional reduction of the southern minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) testis during the feeding season. *Marine Mammal Science*. 16(3): 559-569.
- TSUJIOKA, T. 1992. Female sex steroid residues in the tissue of steers treated with progesterone and oestradiol-17 $\beta$ . *Veterinary Science*. 52: 105-109.
- TURNER, J. W., R. NEMETH y C. ROGERS. 2003. Measurement of fecal glucocorticoids in parrotfishes to assess stress. *General and Comparative Endocrinology*. 133: 341-352.
- VALDEZ-MÁRQUEZ, M. L. LARES, V. C. IBAR y D. GENDRON. 2004. Chlorinated hydrocarbons in skin and blubber of two blue whale (*Balaenoptera musculus*) stranded along the Baja California coast. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 72: 490-495.
- VOIGT, C.C., M. FABBENDER, M. DEHNAR, G. WIBBELT, K. JEWGENOW, H. HOFER y G. A. SCHAUB. 2004. Validation of a minimally invasive blood-sampling technique for the analysis of hormones in domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha). *General and Comparative Endocrinology*. 135:100–107.
- WASSER, S. K., S. PAPAGEORGE, C. FOLEY y J. L. BROWN. 1996. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentration throughout the estrous cycle. *General and Comparative Endocrinology*. 102: 255-262.
- WEIMER, R. 2005. *Estadística*. Compañía Editorial Continental. México. 839 pp.

- WIELEBNOWSKI, N. C., N. FLETCHALL, K. CARISTEAD, J. M. BUSSO y J. L. BROWN. 2002. Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biology*. 21: 77-98.
- YEN S., R. HAFTE y R. BARBIER. 2001. *Endocrinología de la reproducción*. Fisiología, Fisiopatología y Manejo clínico. Médica Panamericana. España. 912 pp.
- YOCHER, P. y S. LEATHERWOOD. 1985. Blue Whale *Balaenoptera musculus* (Linnaeus, 1758). En: *Handbook of Marine Mammals* .3: 193 – 240.

## ANEXO I

Resultados para el análisis por densidad de Kernel para las hormonas cuantificadas (ng/gr tejido) y después de su transformación a Log 10, sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California.

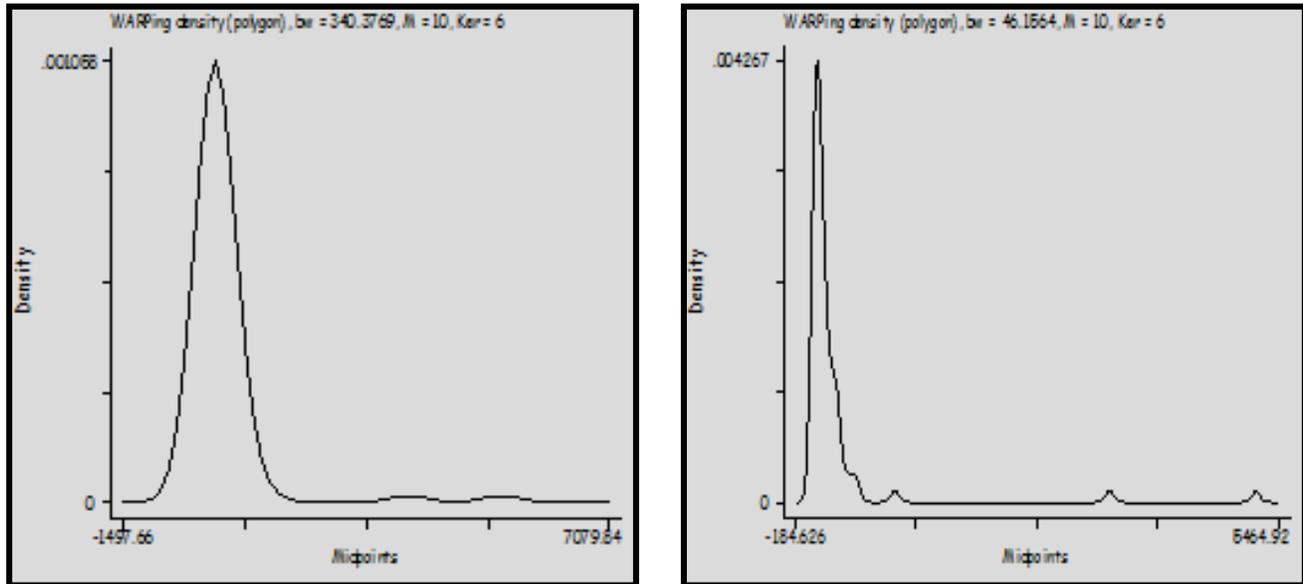


Figura 1. Análisis de densidad por Kernel para la concentración de progestágenos sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Se utilizan reglas para la elección de amplitud/ intervalo de banda óptima para la estimación de Densidad por Kernel (Scott y Silverman). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración de progestágenos (ng/gr de tejido).

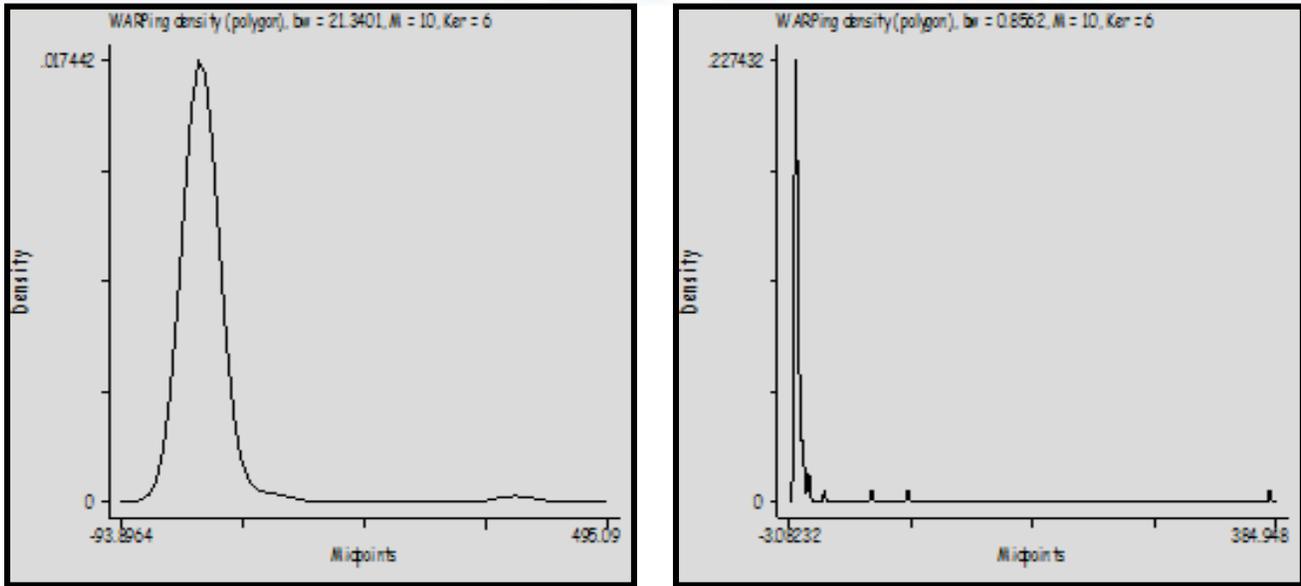


Figura 2. Análisis de densidad por Kernel para la concentración de progestágenos sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Se utilizan reglas para la elección de amplitud/ intervalo de banda óptima para la estimación de Densidad por Kernel (Scott y Silverman). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración de progestágenos (ng/gr de tejido) transformados a Log 10.

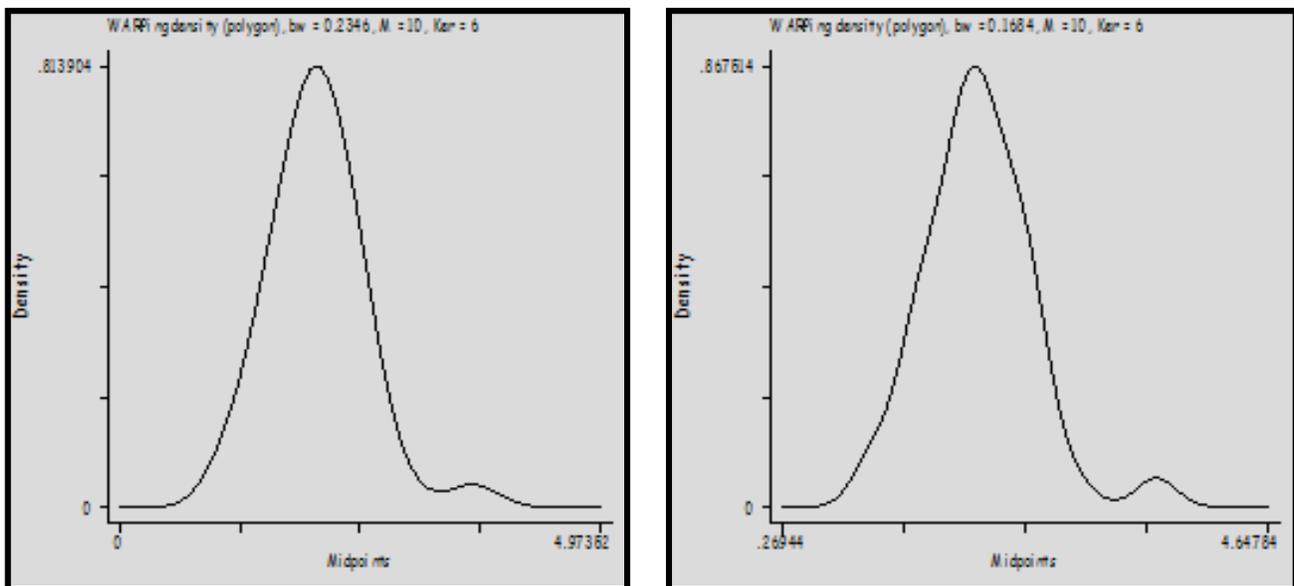


Figura 3. Análisis de densidad por Kernel para la concentración de andrógenos sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Se utilizan reglas para la elección de amplitud/ intervalo de banda óptima para la estimación de Densidad por Kernel (Scott y Silverman). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración de progestágenos (ng/gr de tejido).

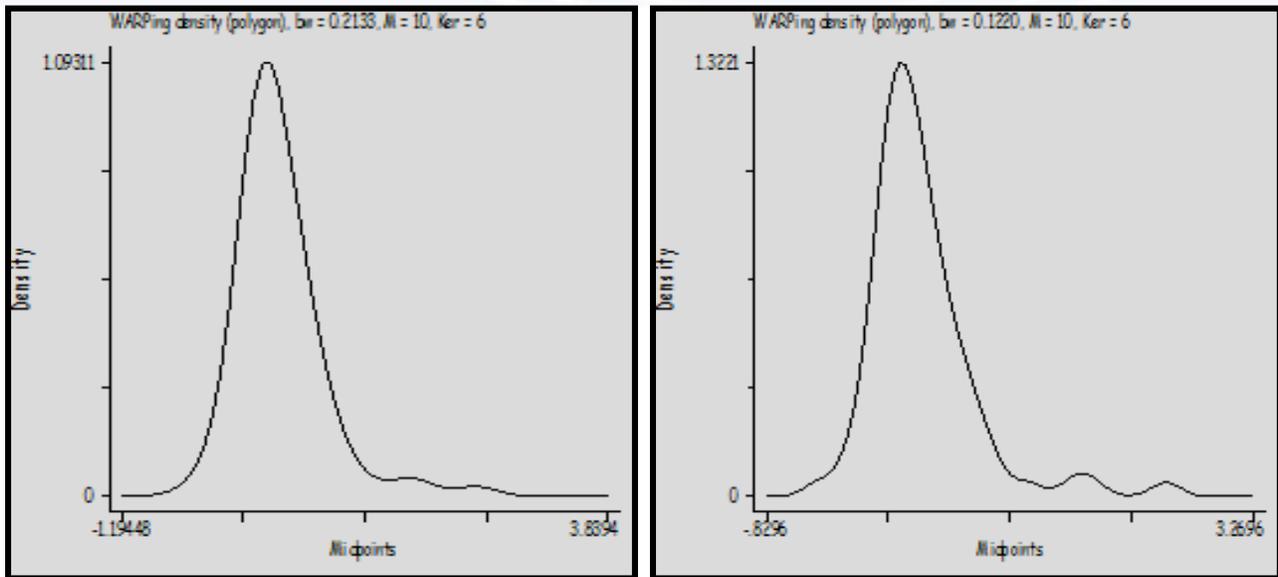


Figura 4. Análisis de densidad por Kernel para la concentración de andrógenos sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Se utilizan reglas para la elección de amplitud/ intervalo de banda óptima para la estimación de Densidad por Kernel (Scott y Silverman). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración de progestágenos (ng/gr de tejido) transformados a Log 10.

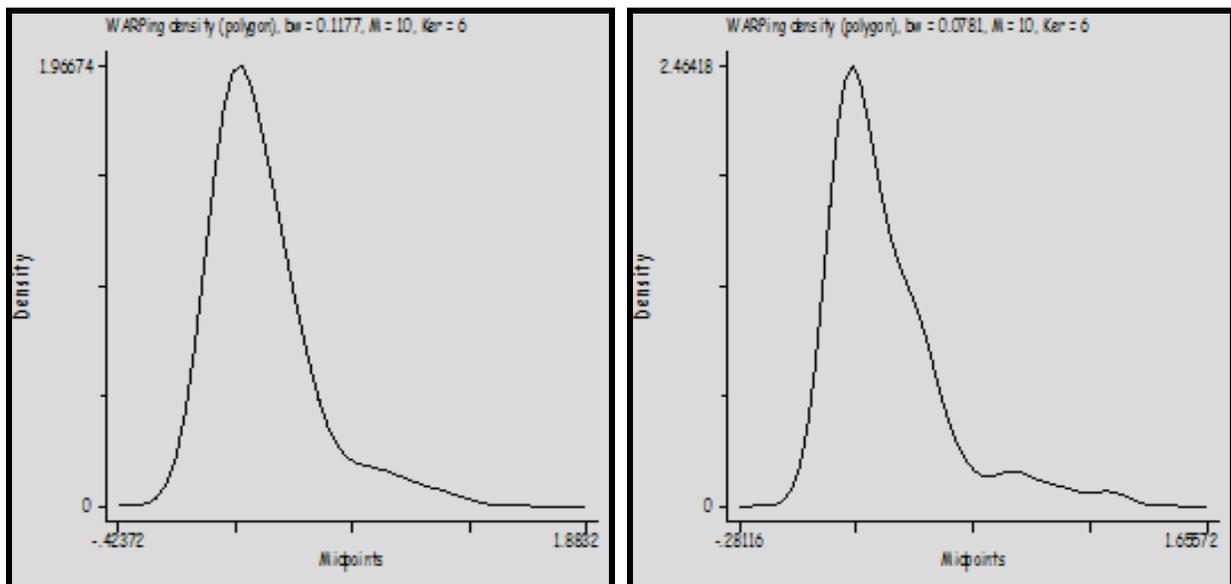


Figura 5. Análisis de densidad por Kernel para la concentración de estrógenos sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Se utilizan reglas para la elección de amplitud/ intervalo de banda óptima para la estimación de Densidad por Kernel (Scott y Silverman). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración de progestágenos (ng/gr de tejido).

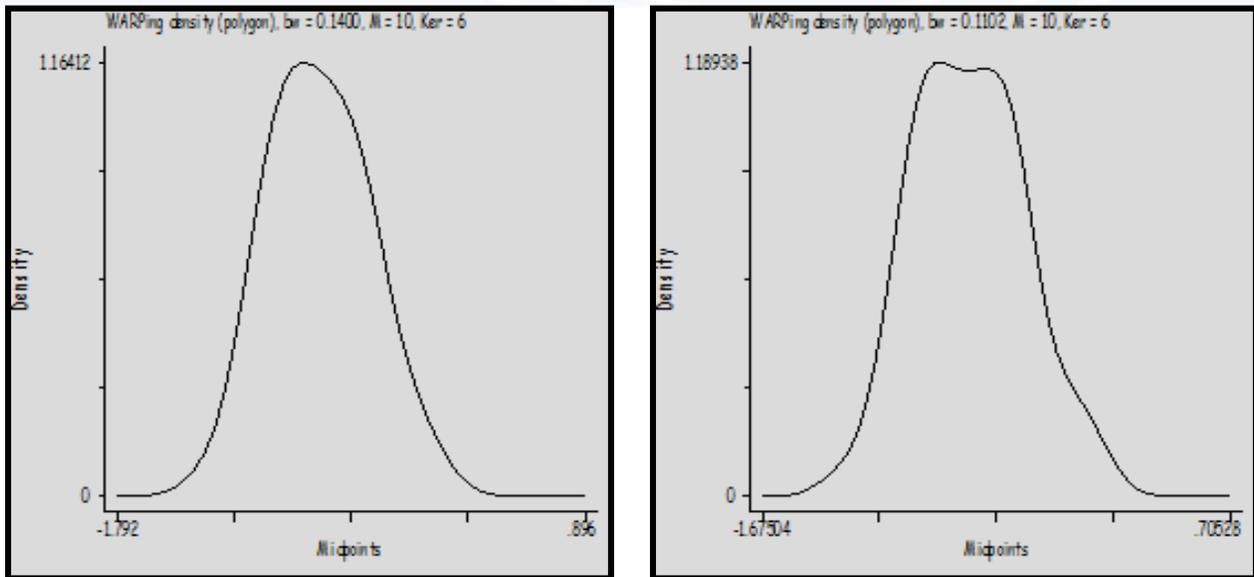


Figura 6. Análisis de densidad por Kernel para la concentración de estrógenos sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Se utilizan reglas para la elección de amplitud/ intervalo de banda óptima para la estimación de Densidad por Kernel (Scott y Silverman). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración de progestágenos (ng/gr de tejido) transformados a Log 10.

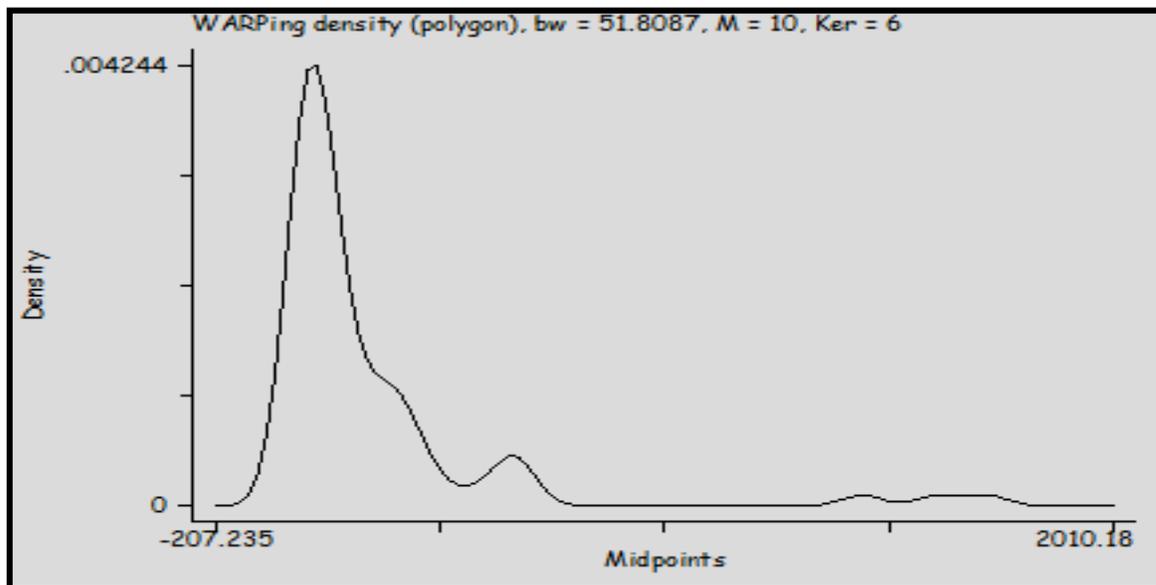
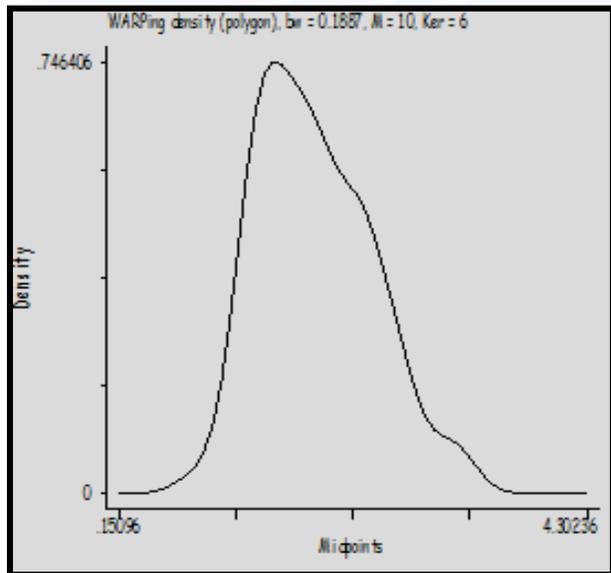
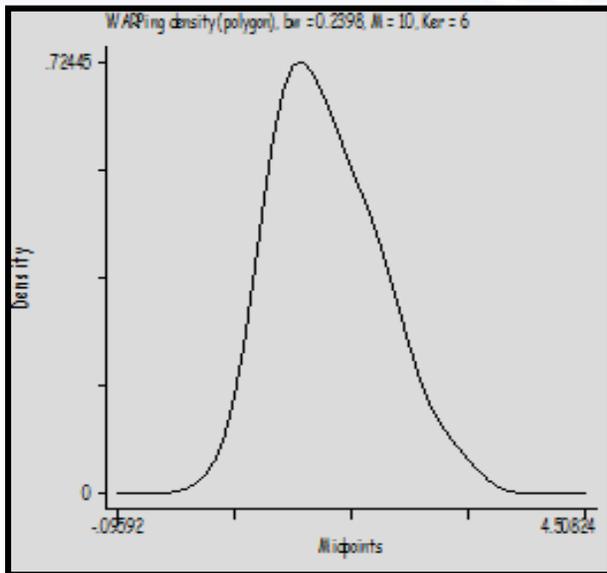


Figura 7. Análisis de densidad por Kernel para la concentración de glucocorticoides sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Se utilizan reglas para la elección de amplitud/ intervalo de banda óptima para la estimación de Densidad por Kernel (Scott y Silverman). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración de progestágenos (ng/gr de tejido).



Figuras 8 Y 9. Análisis de densidad por Kernel para la concentración de glucocorticoides sin considerar sexo, en grasa de ballena azul del Golfo de California. Se utilizan reglas para la elección de amplitud/ intervalo de banda óptima para la estimación de Densidad por Kernel (Scott y Silverman). Eje vertical representa la densidad y el eje horizontal representa la concentración de progestágenos (ng/gr de tejido) transformados a Log 10.



**. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE LOS ANDRÓGENOS (110T) Y ESTRÓGENOS (110E)**

Huber iteration 1: maximum difference in weights = .89342993  
 Huber iteration 2: maximum difference in weights = .414982  
 Huber iteration 3: maximum difference in weights = .07333156  
 Huber iteration 4: maximum difference in weights = .03073137  
 Biweight iteration 5: maximum difference in weights = .26805789  
 Biweight iteration 6: maximum difference in weights = .08151256  
 Biweight iteration 7: maximum difference in weights = .01868198  
 Biweight iteration 8: maximum difference in weights = .00336781

Robust regression  
 Number of obs = 66  
 F( 1, 64) = 242.97  
 Prob > F = **0.0000**

	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
110E	.7729681	.0495888	15.59	0.000	.6739031	.8720331
_cons	.9647296	.0318624	30.28	0.000	.9010772	1.028382

**. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE LOS PROGESTÁGENOS (110P) Y GLUCOCORTICOIDES (110C)**

Huber iteration 1: maximum difference in weights = .59590023  
 Huber iteration 2: maximum difference in weights = .12443553  
 Huber iteration 3: maximum difference in weights = .02130882  
 Biweight iteration 4: maximum difference in weights = .15420611  
 Biweight iteration 5: maximum difference in weights = .0071535

Robust regression  
 Number of obs = 76  
 F( 1, 74) = 2.42  
 Prob > F = **0.1242**  
**NO SIGNIFICATIVO**

	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
110C	.1651444	.1062096	1.55	0.124	-.0464829	.3767717
_cons	1.699695	.2154321	7.89	0.000	1.270438	2.128953

**. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE LOS ANDRÓGENOS (110T) Y GLUCOCORTICOIDES (110C)**

Huber iteration 1: maximum difference in weights = .84022173  
 Huber iteration 2: maximum difference in weights = .14030745  
 Huber iteration 3: maximum difference in weights = .07645174  
 Huber iteration 4: maximum difference in weights = .01311313  
 Biweight iteration 5: maximum difference in weights = .28713007  
 Biweight iteration 6: maximum difference in weights = .069113  
 Biweight iteration 7: maximum difference in weights = .02291808  
 Biweight iteration 8: maximum difference in weights = .00521642

Robust regression  
 Number of obs = 77  
 F( 1, 75) = 46.40  
 Prob > F = **0.0000**

	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
110C	.3656177	.0536765	6.81	0.000	.2586886	.4725468
_cons	-.2449645	.1089037	-2.25	0.027	-.4619118	-.0280172

. ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE LOS ESTRÓGENOS (110E) Y GLUCOCORTICOIDES (110C)

Huber iteration 1: maximum difference in weights = .50001691  
 Huber iteration 2: maximum difference in weights = .00227503  
 Biweight iteration 3: maximum difference in weights = .15844203  
 Biweight iteration 4: maximum difference in weights = .0115155  
 Biweight iteration 5: maximum difference in weights = .00177181

Robust regression

Number of obs = 66  
 F( 1, 64) = 68.06  
 Prob > F = **0.0000**

110E	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
110C	.4128666	.0500466	8.25	0.000	.3128869	.5128462
_cons	-1.405439	.1034659	-13.58	0.000	-1.612136	-1.198742

## ANEXO III

Cuadro 1. Concentración de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides en grasa de hembras de ballena azul *Balaenoptera musculus* del Golfo de California (concentraciones en ng/gr de tejido).

ID	BIOPSIA	EDAD MÍN	ESTADO	FECHA	Progestágenos	Andrógenos	Estrógenos	Glucocorticoides
397	368	1		09/04/2002	79.3651	1.5895	0.1129	39.6825
393	362	1		06/04/2002	56.2852	1.8836	0.1435	103.1895
501	482	1		07/04/2005	164.9485	1.9918	0.1448	30.9278
508	492	1		18/04/2005	193.9655	2.0819	0.1326	64.6552
175	484	9	madura	14/04/2005	449.1726	2.2837	0.1749	108.747
520	483	1		13/04/2005	118.2033	2.3657	0.1509	35.461
398	369	1		10/04/2002	119.4006	2.5418	0.2165	58.7396
136	365	7	lactante	08/04/2002	193.0502	2.72	0.2555	77.2201
395	366	1		08/04/2002	233.3333	3.3867	0.2323	33.3333
477	505	1		02/04/2006	240.5498	3.3196	0.1998	51.5464
396	367	1		08/04/2002	80.6452	3.9913	0.282	40.3226
556	567	0.5	cría	01/04/2006	322.5806	7.7903	0.5474	201.6129
458	450	2		29/01/2005	83.2178	1.3944	0.0853	27.7393
127	711	13	madura	13/02/2008	56.6442	1.0202	0.0612	42.8659
47	520	13	madura	24/02/2006	294.6274	1.6742	0.1212	8.6655
127	459	10	madura	25/02/2005	131.0159	1.7367	0.113	21.692
111	515	12	lactante	18/02/2006	147.7833	2.3793	0.1665	24.6305
451	456	10	lactante	23/02/2005	147.7833	2.4215	0.1423	73.8916
478	457	0.5	cría	23/02/2005	82.6446	2.7245	0.188	27.5482
253	501	11	madura	07/02/2006	138.8889	6.7083	0.4561	309.0278
124	717	17	madura	21/02/2008	981.4815	11.9259	1.2346	1728.3951
282	703	15	madura	11/02/2008	99.6564	62.543	0.3436	85.9107
50	690	20	lactante	10/02/2008	223.0928	91.8033	0.8197	1415.4077
458	419	1		09/03/2004	27.6625	1.3712	0.0941	34.5781
492	473	1		18/03/2005	96.7742	1.6362	0.1011	32.2581
391	357	1		14/03/2002	94.9367	1.6835	0.2129	31.6456
23	361	14	madura	24/03/2002	54.6114	1.779	0.12935	39.6345
50	416	16	lactante	08/03/2004	130.719	2.1715	0.1166	54.4662
379	347	1		06/03/2002	313.253	2.4275	0.1761	24.0964
304	469	6	madura	13/03/2005	154.2416	2.5884	0.1592	38.5604
408	552	5	madura	25/03/2006	104.9869	2.6871	0.1537	26.2467
553	557	1		26/03/2006	288.8087	3.6045	0.2296	126.3538
4	410	22	madura	04/03/2004	156.8627	3.9547	0.2702	58.8235
484	480	1		20/03/2005	176.9912	4.44	0.263	44.2478
409	387	3		11/03/2003	265.4867	4.4705	0.3073	110.6195
384	342	1		06/03/2002	216.2162	5.4939	0.4119	81.0811
420	379	0.5	cría	07/03/2003	402.2989	5.5517	0.4116	57.4713
385	352	1		07/03/2002	294.1176	7.453	0.4998	220.5882

Cuadro 2. Concentración de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides en grasa de machos de ballena azul *Balaenoptera musculus* del Golfo de California (concentraciones en ng/gr de tejido).

ID	BIOPSIA	EDAD MÍN	ESTADO	FECHA	Progestágenos	Andrógenos	Estrógenos	Glucocorticoides
499	490	1		14/04/2005	29.8770	0.4675		281.1951
499	485	1		14/04/2005	10.0840	0.8941		176.4706
547	555	1		03/04/2006	29.4562	1.4592	0.4444	75.5287
473	565	4	puberto	22/04/2006	29.5405	2.1543	0.2188	185.9956
504	487	1		14/04/2005	25.6065	2.6038	0.2695	94.3396
394	364	0.5	cría	08/04/2002	55.5556	4.2933	0.4444	266.6667
502	491	1		16/04/2005	267.3797	5.2588	0.3229	80.2139
363	326	2		30/01/2002	47.7707	3.0764	0.3185	47.7707
363	348	2		30/01/2002	333.3333	8.9444	0.9259	555.5556
303	462	6	puberto	26/02/2005	42.0561	1.7704	0.2336	23.3645
142	580	25	maduro	00/00/2007		1.5705		117.0047
12	463	16	maduro	26/02/2005	29.1005	1.7378	0.1764	291.0053
7	461	18	maduro	26/02/2005	54.7550	2.9325	0.2882	547.5504
189	503	10	maduro	08/02/2006	107.6923	3.5335	0.3846	269.2308
240	350	6	puberto	14/02/2004	5206.8966	4.9091	0.4926	569.1057
374	329	2		05/02/2002	55.8376	380.2030	0.5076	203.0457
482	472	1		18/03/2005	14.0187	0.8287		15.5763
486	481	1		20/03/2005	40.8602	1.1441		21.5054
468	436	1		25/03/2004	38.7812	1.4737		27.7008
491	470	1		13/03/2005	74.7922	1.4737		27.7008
494	475	1		18/03/2005	78.8732	1.4986		28.1690
546	554	1		30/03/2006	81.0811	1.6318	0.1689	59.1216
482	478	1		18/03/2005	31.5789	1.8667		157.8947
519	474	1		18/03/2005	12.7660	2.0553		21.2766
376	353	0.5	cría	07/03/2002	82.6087	2.3130	0.4348	434.7826
383	341	1		06/03/2002	16.2791	2.4744	0.4651	255.8140
508	465	1		13/03/2005	113.3005	2.6207		73.8916
405	359	0.5	cría	15/03/2002	27.9146	2.7356	0.1642	131.3629
240	550	8	maduro	25/03/2006	62.5000	2.9644	0.3205	112.1795
454	549	2	inmaduro	25/03/2006	87.3984	3.9754	0.4065	569.1057
379	546	5	puberto	24/03/2006	140.5788	3.8875	0.3528	235.8164
455	417	0.5	cría	08/03/2004	160.0000	4.8300	0.5000	100.0000
543	551	1		29/03/2006	106.6434	4.8951	0.1689	227.2727
425	397	0.5	cría	27/03/2003	536.1842	6.7002	0.6579	361.8421
454	415	0.5	cría	08/03/2004	3494.7368	7.1668	1.0526	526.3158
249	389	5	puberto	11/03/2003	495.7627	8.4249	0.8475	84.7458
487	466	1		13/03/2005	36.1842	12.2807	0.2193	142.5439
355	346	2		06/03/2002	94.3396	13.2075	0.6289	1603.7736
538	562	1		28/03/2006	303.5714	25.0000	0.3497	297.6190

## ANEXO IV

Concentración de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides (Log 10) para hembras de ballena azul, representadas por medio de gráficas de violín, donde se gráfica la mediana para cada hormona analizada y por categoría. El rectángulo blanco indica la mediana, el recuadro negro el 25 y 75 % de los datos y la línea de la gráfica los valores máximos y mínimos.

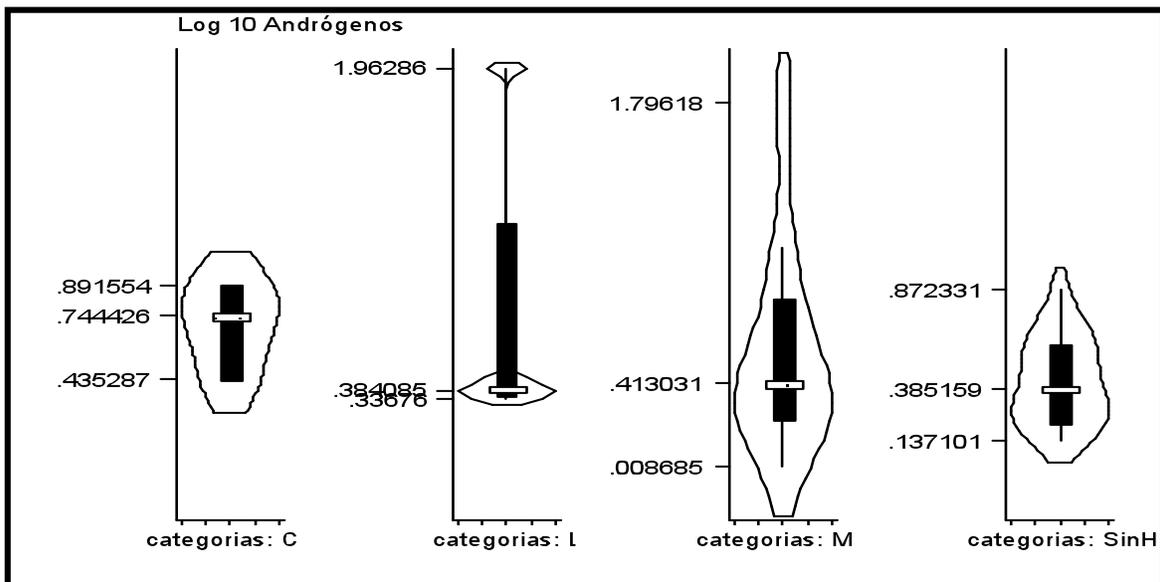
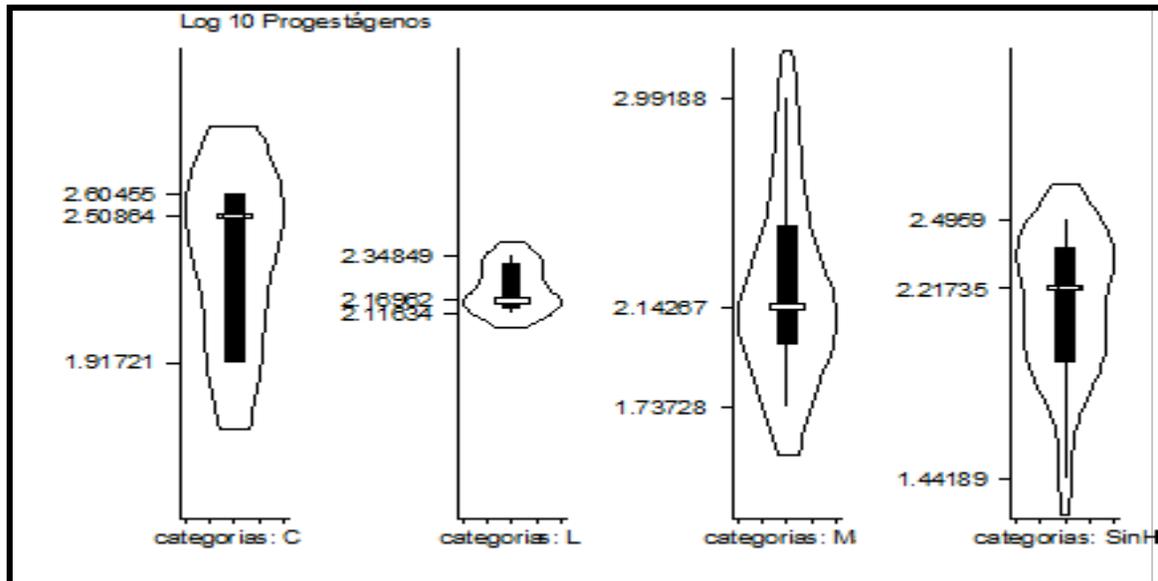
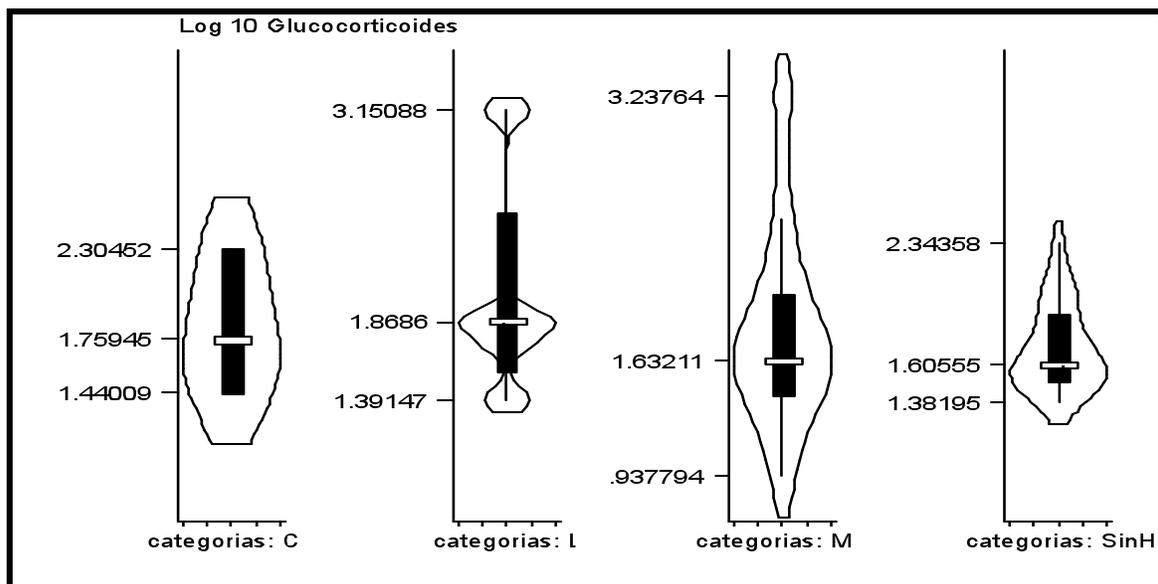
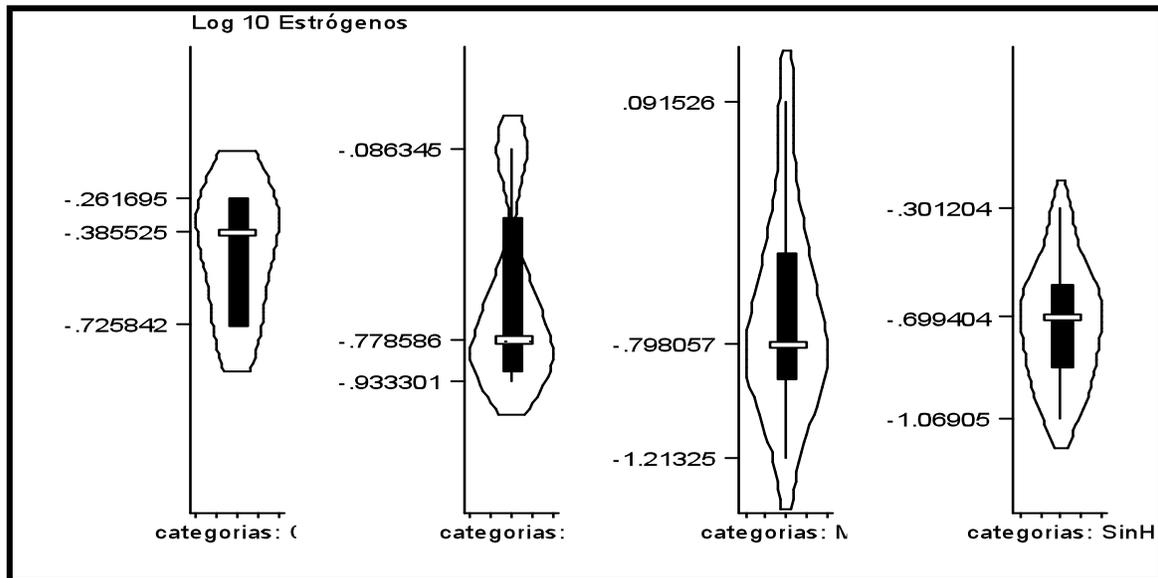


Figura 1 y 2. Gráficas de violín para progestágenos y andrógenos (ng/gr Log 10) en hembras de ballena azul por categoría, cría (C), lactante (L), madura (M) y sin categoría (SinH).



Figuras 3 y 4. Gráficas de violín para estrógenos y glucocorticoides (ng/gr Log 10) en hembras de ballena azul por categoría, cría (C), lactante (L), madura (M) y sin categoría (SinH).

## ANEXO V

Concentración de progestágenos, andrógenos, estrógenos y glucocorticoides (Log 10) para machos de ballena azul, representadas por medio de gráficas de violín, donde se gráfica la mediana para cada hormona analizada y por categoría. El rectángulo blanco indica la mediana, el recuadro negro el 25 y 75 % de los datos y la línea de la gráfica los valores máximos y mínimos.

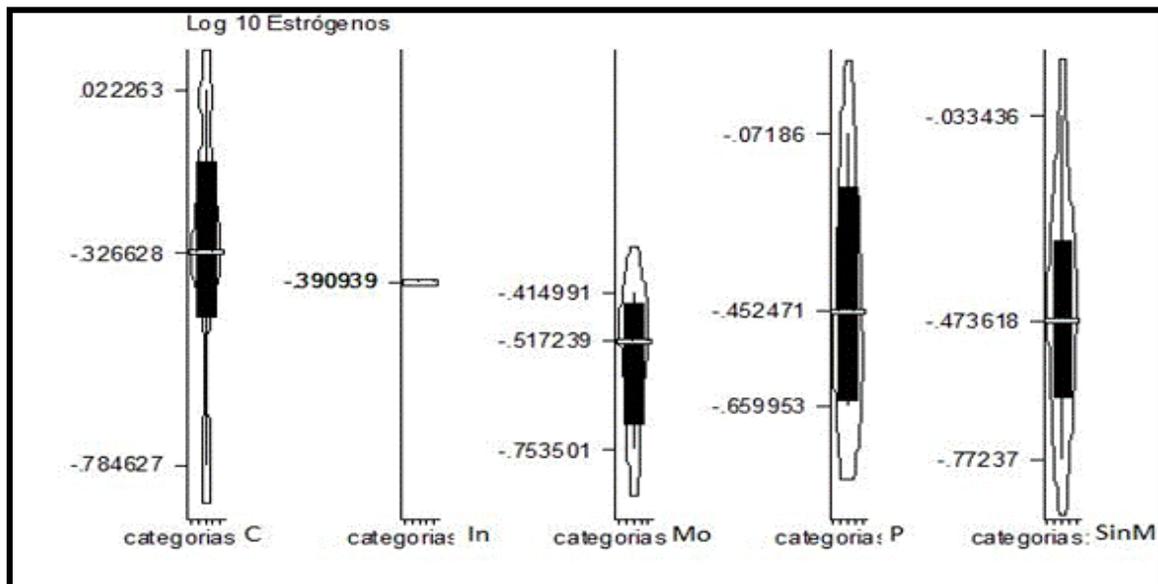
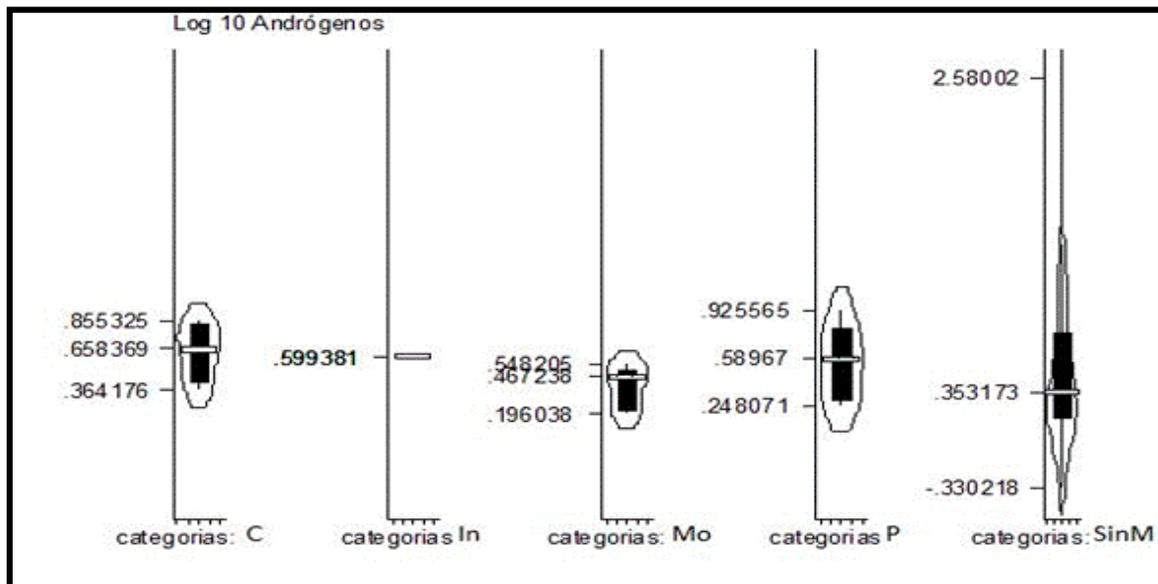


Figura 1 y 2. Gráficas de violín para andrógenos y estrógenos (ng/gr Log 10) en machos de ballena azul por categoría, cría (C), inmaduro (In), maduro (Mo) y sin categoría (SinM).

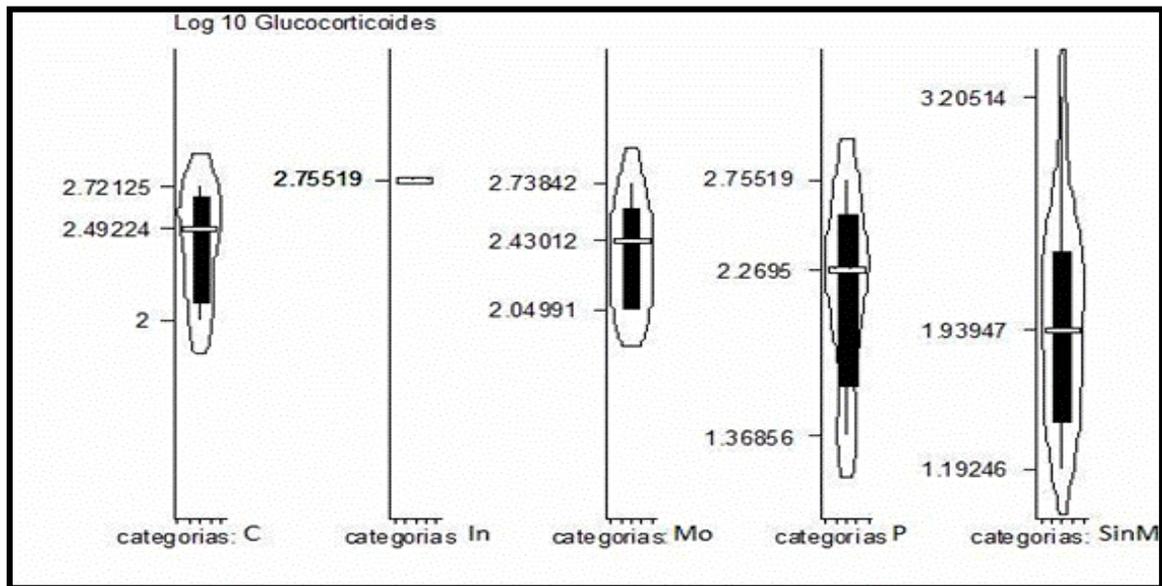
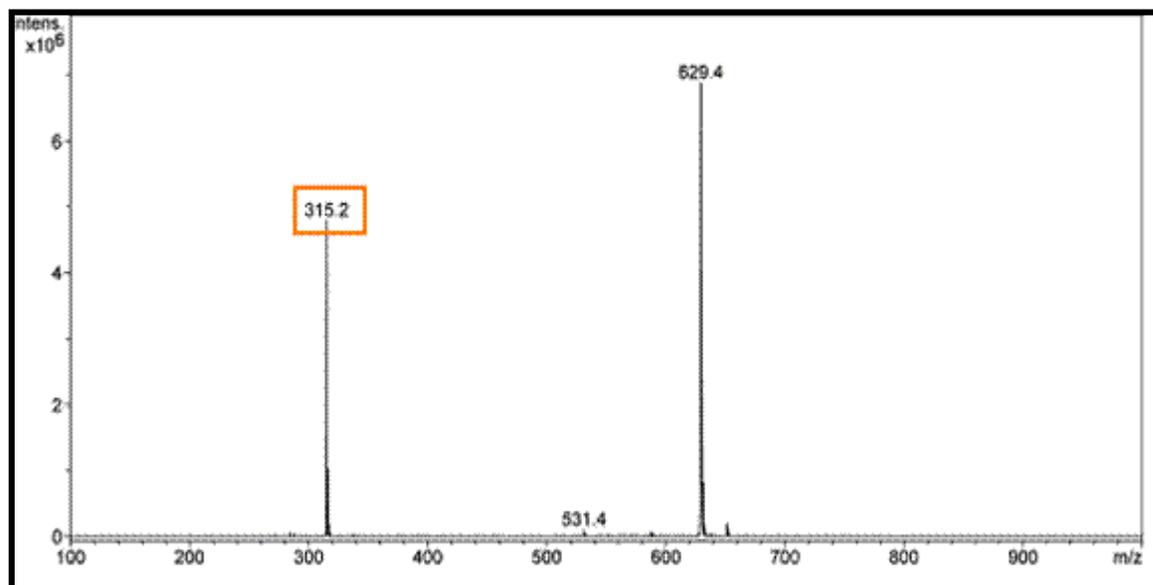


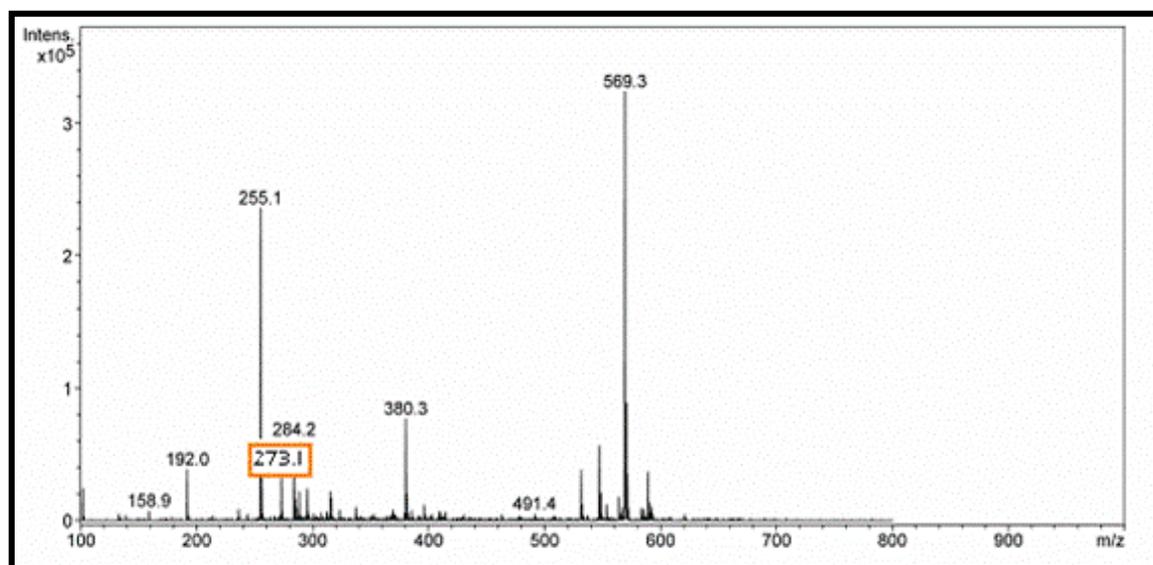
Figura 3. Gráficas de violín para glucocorticoides (ng/gr Log 10) en machos de ballena azul por categoría, cría (C), inmaduro (In), maduro (Mo) y sin categoría (SinM).

## ANEXO VI

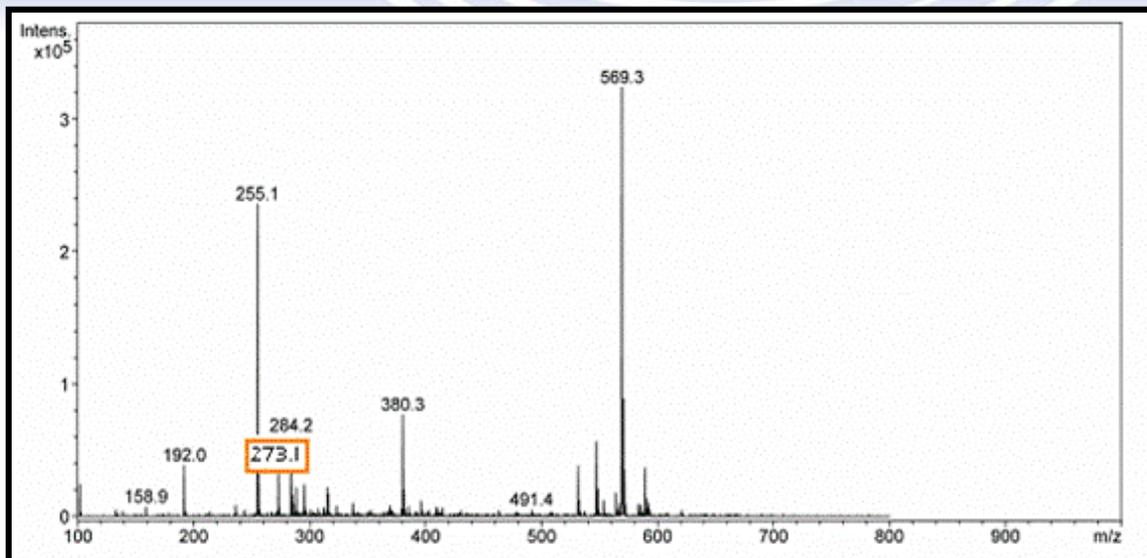
Espectros de masas utilizados como referencia para la identificación de los picos de las hormonas esteroides.



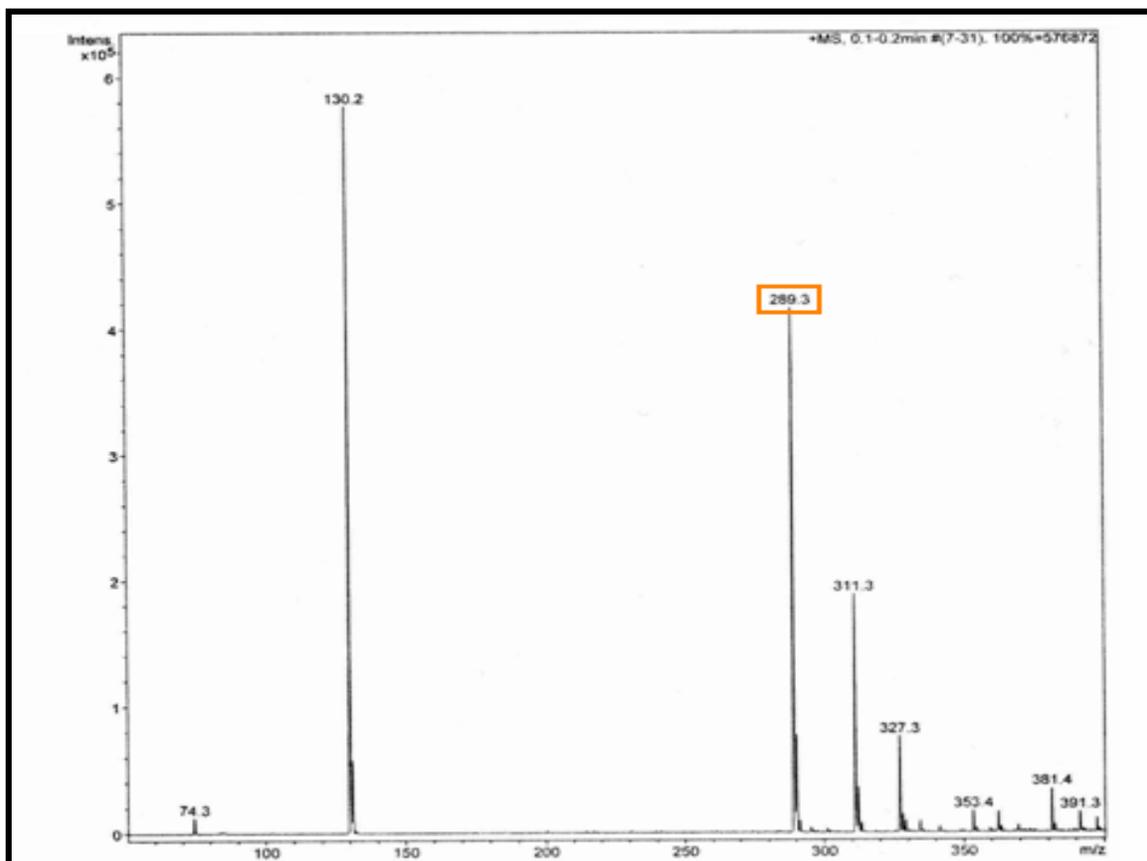
Espectro de masa de progesterona (Pregn-4-ene-3, 20 dione) utilizado como referencia para la identificación de los picos.



Espectro de masa de estradiol (Estra- 1,3,5 (10)-triene-3, 17 $\beta$ -diol) utilizado como referencia para la identificación de los picos.



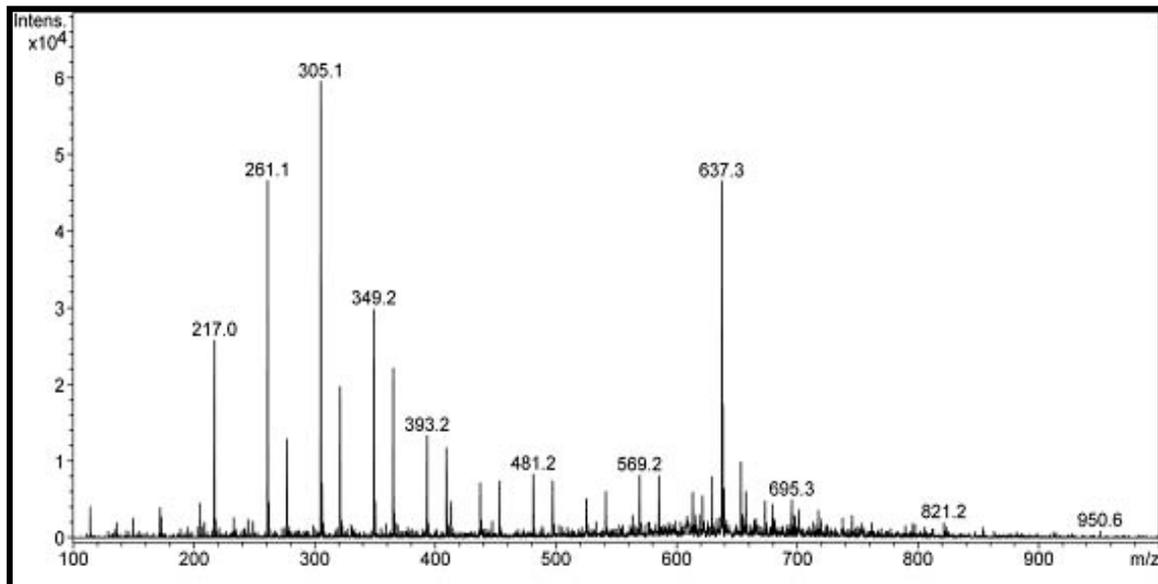
Espectro de masa de cortisol (11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21- trihidroxipregn-4-ene-3, 20 dione) utilizado como referencia para la identificación de los picos.



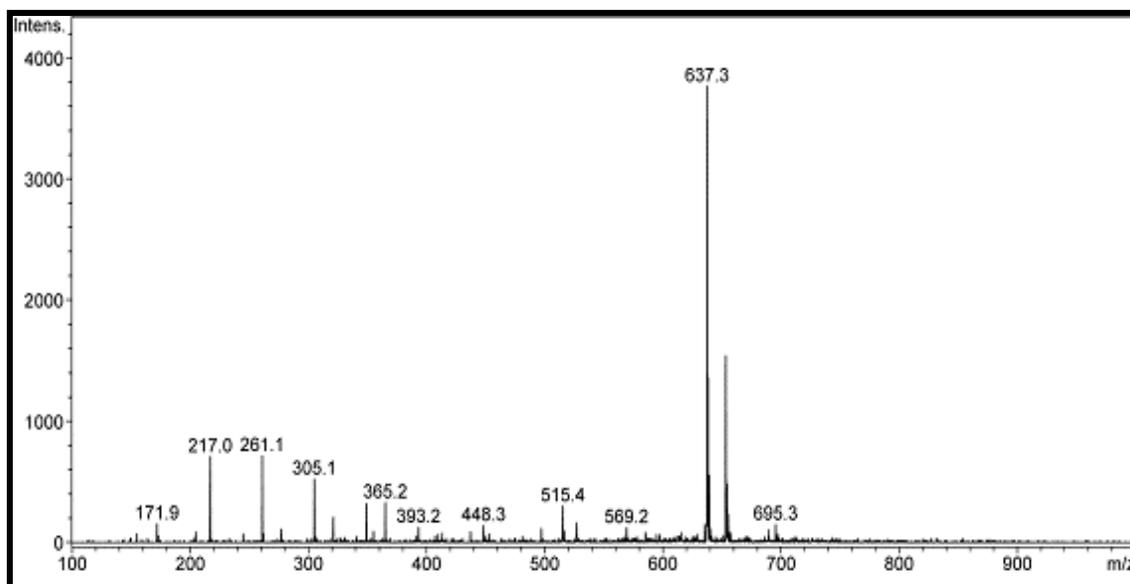
Espectro de masa de testosterona utilizado como referencia para la identificación de los picos.

## ANEXO VII

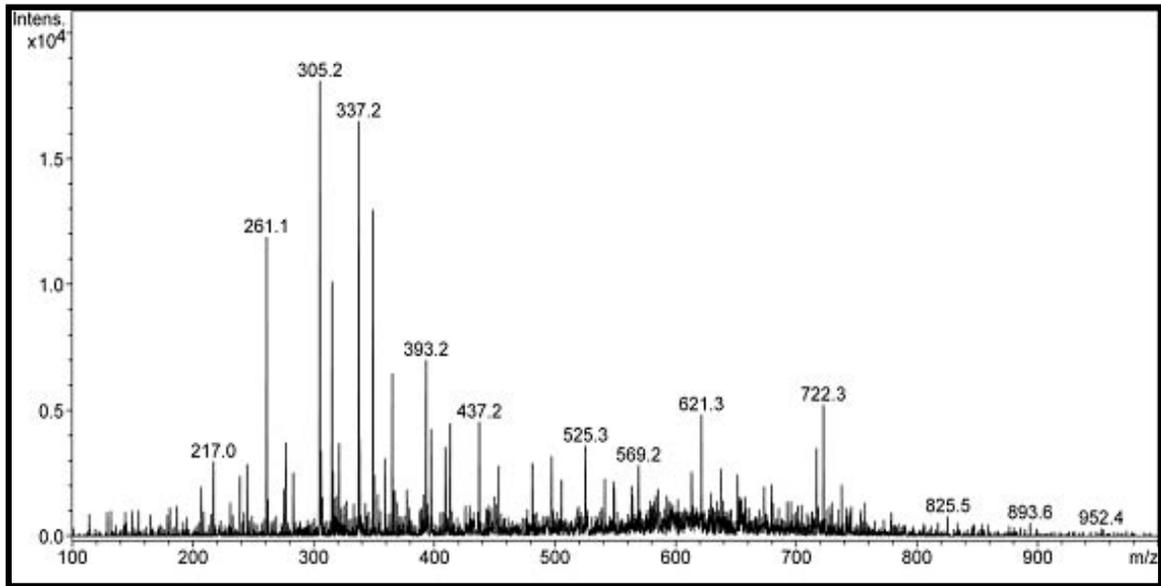
Espectros de masa para la identificación de hormonas esteroides en 6 biopsias de grasa de ballenas azules del presente estudio.



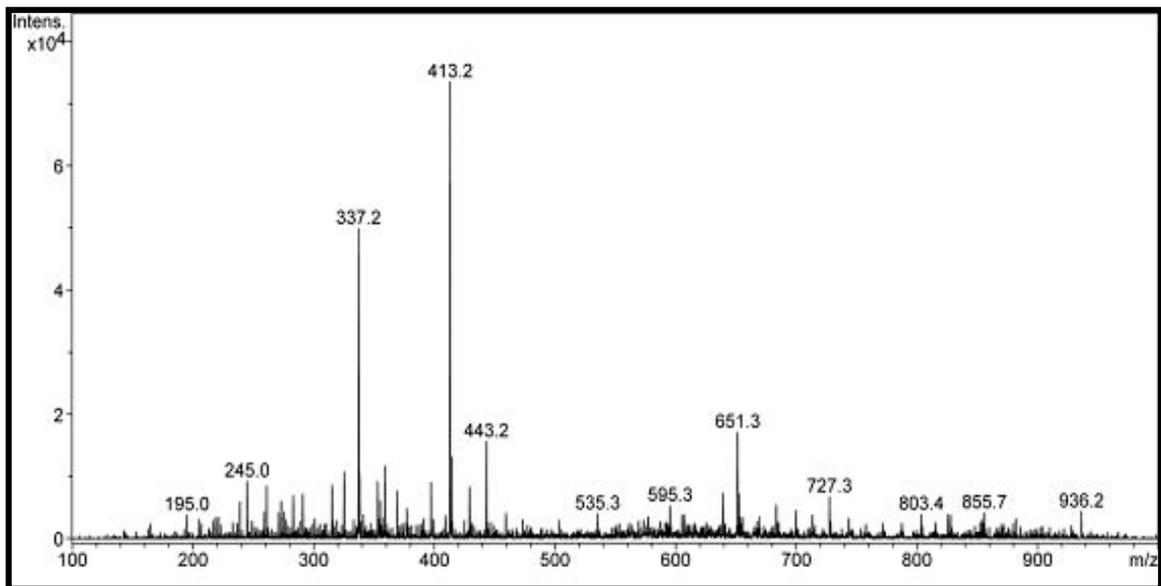
Espectro de masas de grasa de hembra madura de ballena azul (ID 0175; Biopsia 484).



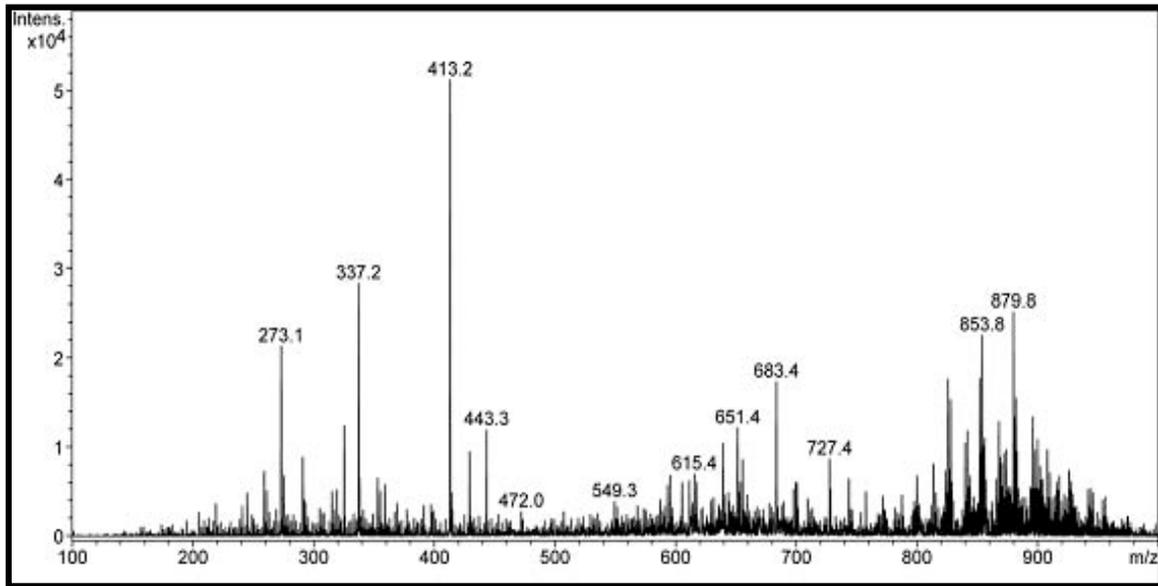
Espectro de masas de grasa de macho maduro de ballena azul (ID 142; Biopsia 580).



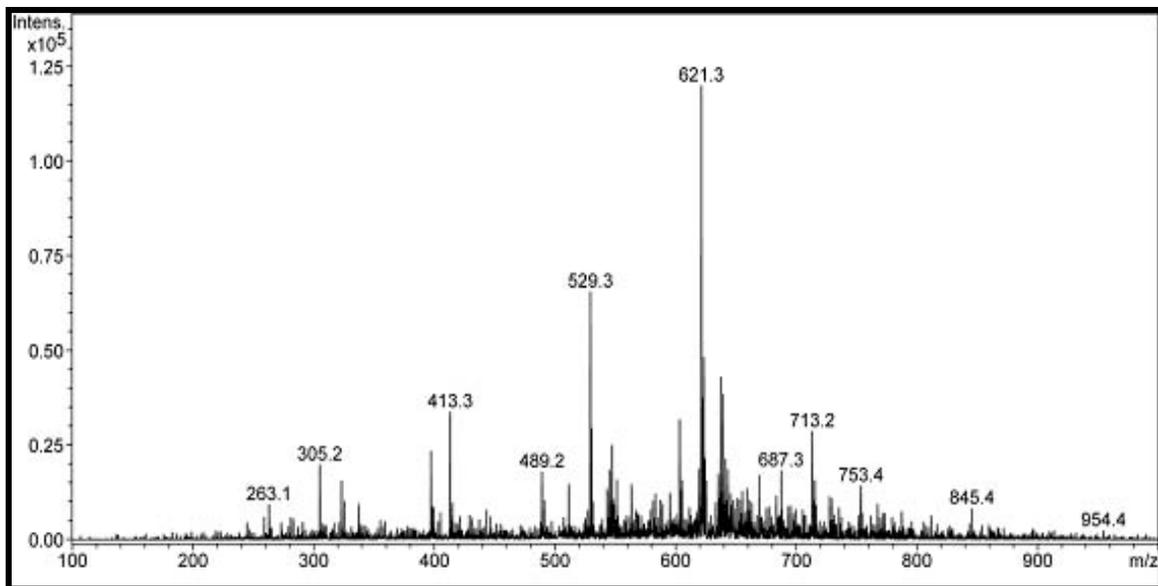
Espectro de masas de grasa de hembra lactante de ballena azul (ID 0451; Biopsia 456).



Espectro de masas de grasa de macho puberto de ballena azul (ID 0240; Biopsia 350).



Espectro de masas de grasa de cría hembra de ballena azul (ID 0478; Biopsia 457).



Espectro de masas de grasa de cría macho de ballena azul (ID 0454; Biopsia 415).

## ANEXO VIII

Comparación de las concentraciones obtenidas por el método de EIA y de Cromatografía Gases-Masas.

**Progestágenos (ng/gr)**

<b>BIOPSIA</b>	<b>EDAD MÍN</b>	<b>ESTADO</b>	<b>FECHA</b>	<b>EIA</b>	<b>Cromatografía</b>
484	9	madura	14/04/2005	449.1726	524228.4625
580	25	maduro	00/00/2007		31535.5911
456	10	lactante	23/02/2005	147.7833	223113.1024
350	6	puberto	14/02/2004	5206.8966	1571957.755
457	0.5	cría	23/02/2005	82.6446	381477.7668
415	0.5	cría	08/03/2004	3494.7368	1534139.3965

**Andrógenos (ng/gr)**

<b>BIOPSIA</b>	<b>EDAD MÍN</b>	<b>ESTADO</b>	<b>FECHA</b>	<b>EIA</b>	<b>Cromatografía</b>
484	9	madura	14/04/2005	2.2837	1321566.4214
580	25	maduro	00/00/2007	1.5705	7423.9308
456	10	lactante	23/02/2005	2.4215	400649.1363
350	6	puberto	14/02/2004	4.9091	572228.5065
457	0.5	cría	23/02/2005	2.7245	221489.5783
415	0.5	cría	08/03/2004	7.1668	1345609.8653

**Estrógenos (ng/gr)**

<b>BIOPSIA</b>	<b>EDAD MÍN</b>	<b>ESTADO</b>	<b>FECHA</b>	<b>EIA</b>	<b>Cromatografía</b>
484	9	madura	14/04/2005	0.1749	524228.4625
580	25	maduro	00/00/2007		4279.9615
456	10	lactante	23/02/2005	0.1423	251864.3573
350	6	puberto	14/02/2004	0.4926	546981.8313
457	0.5	cría	23/02/2005	0.1880	333376.9748
415	0.5	cría	08/03/2004	1.0526	4430749.6348

Glucocorticoides (ng/gr)					
BIOPSIA	EDAD MÍN	ESTADO	FECHA	EIA	Cromatografía
484	9	madura	14/04/2005	108.7470	945969.2769
580	25	maduro	00/00/2007	117.0047	4908.7277
456	10	lactante	23/02/2005	73.8916	233503.3518
350	6	puberto	14/02/2004	569.1057	360607.7955
457	0.5	cría	23/02/2005	27.5482	
415	0.5	cría	08/03/2004	526.3158	1785640.5776

Gráficas de las concentraciones obtenidas por el método de Inmunoensayo enzimático (EIA) y por el método de Cromatografía de Gases-Masas, para 6 muestras de grasa representativas de las categorías, hembra madura, lactante, cría, macho maduro, puberto y cría.

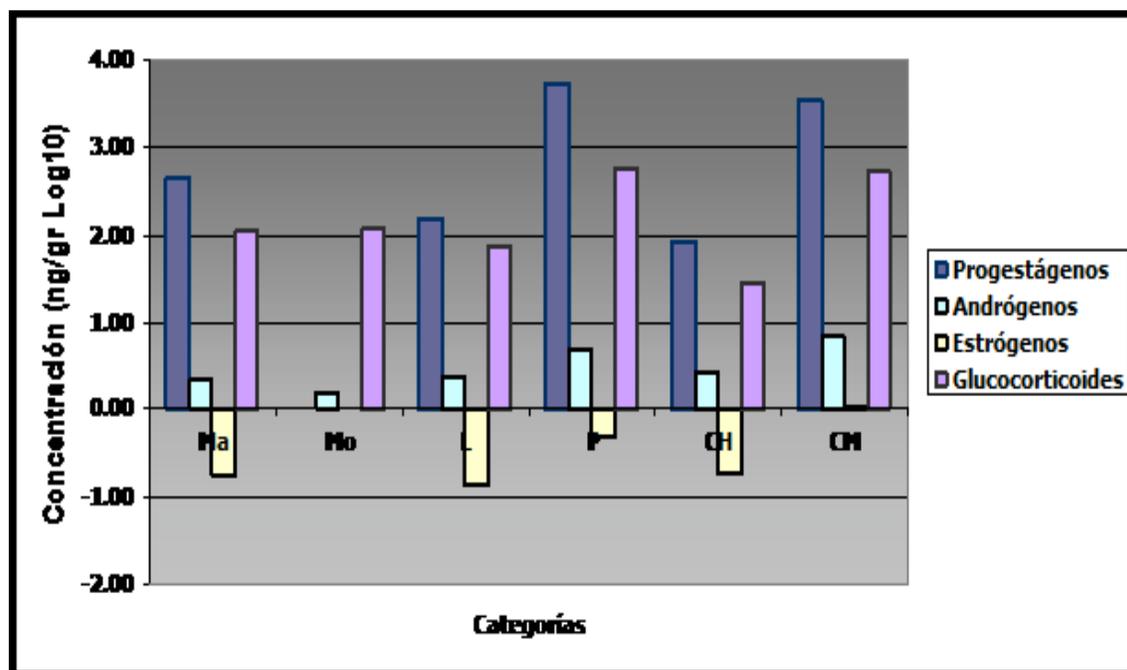


Figura. 1 Gráfica de las concentraciones obtenidas por el método de EIA para muestras de grasa de hembra madura (Ma), lactante (L), cría (CH), macho maduro (Mo), puberto (P) y cría macho (CM). Los datos están en ng/gr grasa y transformados a Log 10.

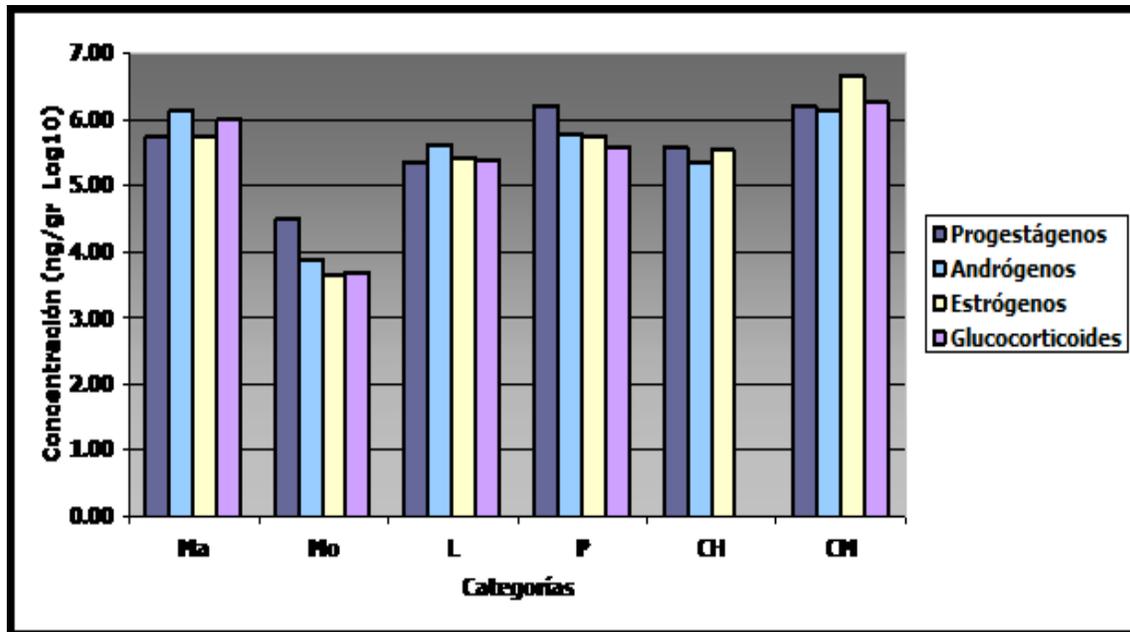


Figura. 2 Gráfica de las concentraciones obtenidas por el método de Cromatografía Gases-Masas para muestras de grasa de hembra madura (Ma), lactante (L), cría (CH), macho maduro (Mo), puberto (P) y cría macho (CM). Los datos están en ng/gr grasa y transformados a Log 10.