

Presencia de doble estro anual en una hembra de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio

Ma. de la Asunción Soto^{1*}, Carmen Vázquez², Xochitl Ramos³,
Ma. de Lourdes Yáñez L.⁴ y Miguel A. Armella¹

Abstract

As in most of the wolf subspecies, sexual behavior in Mexican wolf is shown in late winter once a year. Reproductive cycle in female wolves includes seasonality and monoestrus, with a long anestrus period. Estrogens and progesterone are responsible for estrus appearance and presence of both seems to be necessary for the full stimulation of sexual behavior in female wolves. In previous studies we made quantification of fecal estrogens and progesterone to several couples of Mexican wolves in captivity, in all the cases peaks on both hormones are correlated with reproductive behavior and shown in winter. Lately, another couple hosted in Aragon Zoo, Mexico City, shown, on in an unexpected way, sexual behavior during August in addition to the normal one in February; then we performed a sexual hormones analysis since this last periods in fecal samples. Results show a significant rise on female sexual steroid hormones concentrations in both, winter and summer. Female was checked for clinical and physical disorders, finding no evidence of pathologies. Pedigree was reviewed looking for possible hybridization, but only a pure wolf lineage was found, environmental factors were also studied providing no evidence that could explain such hormones concentrations. This is first report in summer of estrus behavior in Mexican wolf.

Keywords: anestrus, estradiol, monoestrus, progesterone, sexual behavior, testosterone

Resumen

La conducta sexual en el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) se presenta a finales del invierno. La reproducción en las lobas es estacional y monoéstrica, continuando con un largo período de anestro. Los estrógenos y progesterona controlan la presentación del estro, ambas son necesarias para la presentación de la conducta sexual en las hembras de la familia Canidae, lo que ha sido demostrado con cuantificaciones de las hormonas sexuales a partir de heces fecales en nuestro laboratorio. Una pareja de

¹Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Distrito Federal 09340, México. Email: maps@xanum.uam.mx (MAPS), maa@xanum.unam.mx

² Zoológico de San Juan de Aragón, Av. Loreto Fabela s/n. Distrito Federal 17920, México. Email: carmenlobaragon@yahoo.com.mx (CV)

³ Zoológico de Chapultepec Calle Chivatito, Bosque de Chapultepec s/n. Distrito Federal 11850, México. E-mail: xramoslupus@hotmail.com

⁴ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Distrito Federal 09340, México. Email: lyanez@xanum.uam.mx

*Corresponding Author

lobos mexicanos alojada en el Zoológico de Aragón, Ciudad de México, presentó de manera inesperada conducta reproductiva tanto en el mes de febrero como en agosto; por lo que se procedió a llevar a cabo un análisis de las hormonas sexuales a partir de la conducta de verano por medio la técnica de inmunoensayo enzimático. Los resultados indicaron un incremento de estas hormonas en la hembra durante ambos períodos. La loba ha sido revisada clínicamente sin encontrarse evidencias que sugieran la presencia de patologías que pudieran propiciar el incremento de las hormonas. Así mismo, se efectuaron análisis de sus antecedentes familiares, los que descartan cualquier indicio de hibridación con otros cánidos. También se analizó si los factores ambientales, como la temperatura o fotoperiodo pudieran estar causando esta actividad hormonal anómala. Este es el primer reporte de conducta sexual en verano en lobo mexicano.

Palabras clave: anestro, conducta sexual, estradiol, monoestro, progesterona, testosterona.

Introducción

Al igual que la mayoría de los cánidos, los lobos (*Canis lupus*) tienen una sólo reproducción al año la cual es marcadamente estacional, aunque hay excepciones como el perro (*Canis lupus familiaris*; Concannon *et al.* 1997), el zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*; Asa 1999) y la zorra fennec (*vulpes zerda*; Valdespino *et al.* 2002) que se reproducen dos veces al año. Al igual que en el resto de los lobos, en el lobo mexicano la estación reproductiva se registra desde la segunda semana de enero a la tercera semana de abril conforme a la latitud (Asa 1999; Servín 1997).

El lobo mexicano presenta un pico de actividad sexual que puede aparecer desde la segunda semana de febrero hasta la primera semana de marzo (Servín 1997), temporada que incluye una fase de proestro, la que se acompaña de un sangrado de la vulva, y la hembra se hace atractiva al macho; una fase de estro, que es el tiempo de ovulación y la hembra será receptiva al macho, permitiendo la monta y desviando la cola para facilitar la intromisión; la siguiente es la fase lútea o diestro que es prolongada en las hembras de cánidos, con la hormona progesterona elevada y es cuando se lleva a cabo la implantación del huevo fecundado (Asa 1999; Packard 2003; Seal 1979). Al igual que en el resto de los cánidos, el ciclo reproductivo de las hembras de lobo es monoéstrico: tiene sólo un ciclo ovulatorio en la estación reproductiva, por lo que las hembras solo tienen una oportunidad para quedar gestantes por evento anual (Asa 1999). El ciclo de las hembras en los cánidos se asocia a una fase lútea prolongada (o pseudogestación) que dura dos meses; le sigue un largo anestro con una pausa reproductiva de alrededor de siete meses (normalmente de junio a diciembre), y termina para comenzar un nuevo ciclo reproductivo (Asa 1997, 1999; Kreeger 2003; Mech 2000; Seal 1979). Desde el punto de vista evolutivo, esta secuencia puede atribuirse a la adaptación a la marcada estacionalidad ambiental en el hemisferio norte, es decir, temporadas con diferente disponibilidad de recursos; procesos que se vuelven más evidentes con el aumento en la latitud; así, un solo parto al inicio de la primavera, asegura el nacimiento de las crías cuando existe mayor abundancia de recursos (Asa y Valdespino 1988).

Este trabajo describe la presencia de un doble estro anual de una hembra de lobo mexicano, y la conducta sexual tanto de la hembra como del macho. Además, es objetivo del mismo encontrar que factores pueden causar estos patrones reproductivos inusuales.

Material y Métodos

Desde el año 2003, la hembra de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) con el número de studbook 605 (Siminski 2012) nacida en 1999, se encuentra alojada en el zoológico de San Juan de Aragón, Ciudad de México, que es considerado el límite septentrional de la distribución original (Latitud Norte 19.461402°, Longitud Oeste 99.084153°) proveniente del Zoológico Africam Safari, Puebla. El macho nacido en 2002 (Número de Studbook 779) fue llevado a este mismo encierro en Junio de 2006. La pareja se mantuvo aislada en un encierro de 900 m², sin pendientes, cercado con malla ciclónica y con vegetación consistente en plantas de otate y algunos árboles de casuarina. El encierro tenía agua *Ad libitum* y los lobos eran alimentados una vez al día con carne de pollo sin hormonas adicionadas siguiendo las especificaciones de la SAGARPA: NOM-061-ZOO-1999 sobre especificaciones zoonosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal.

Para describir la conducta sexual de esta pareja de lobos, se observó su comportamiento diariamente en períodos matutinos y vespertinos, a partir de que se detectó la presentación de conducta sexual en Agosto de 2006, y durante los años 2007 a 2010.

Las observaciones se realizaron con registro focal de eventos. La observación incluyó olfateo de genitales, intentos de monta, monta, cópula, lock y desviación de la cola (flagging) por parte de la hembra. Simultáneamente se recolectaron muestras fecales para analizar las concentraciones de las hormonas esteroides sexuales (estradiol, progesterona y testosterona).

Recolección de muestras fecales. Para discriminar las heces de la hembra de las del macho se utilizó un colorante vegetal para pastelería (Daimón®) que fue incorporado a su alimento la noche anterior a que las heces fueran recolectadas, separándola del macho a la hora de la alimentación. Cada dos días se recogieron las heces más frescas, tomando en cuenta la consistencia y apariencia. Considerando el tiempo de digestión y la hora de recolección de las heces se calcula que tenían unas cuatro horas de haber sido depuestas. Una vez recogidas las muestras fecales se colocaron en frascos de polipropileno con 10 ml de etanol al 70%, indicando los datos del animal depositante, en base a la coloración finalmente los frascos se transportaron al laboratorio y se refrigeraron para que las muestras reposaran (Soto et al. 2004).

Extracción y cuantificación de las hormonas esteroides. Se disolvieron las muestras de las heces en el mismo etanol en el que fueron transportadas agitándolas en un vortex. De cada muestra se tomaron 3 ml del etanol y se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 min, el sobrenadante (extracto) fue separado del material sólido y colocado en criotubos de polipropileno de 5 ml. para de ahí tomar las alícuotas para efectuar las cuantificaciones. Las muestras de las que se tomó el alícuota se secaron en un horno a 100° C durante 12 horas y se obtuvo el peso seco, y así poder calcular la concentración de hormona por gramo de peso de las heces (Bauman com. pers.)

La cuantificación de las hormonas sexuales (estradiol, progesterona y testosterona) en cada extracto se hizo mediante la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) utilizando kits comerciales (Diagnostic System Laboratories, Inc®, Webster, Texas)

y determinándose la concentración de cada hormona en un espectrofotocolorímetro (Microplate Reader, MR 600, DynatechProduct®).

Validación de la técnica ELISA. La técnica fue validada mediante pruebas de exactitud, paralelismo, precisión y especificidad.

Exactitud: Se agregaron cantidades conocidas de hormona, en tres dosis, a cuatro extractos fecales lo que resultó en una recuperación de $112.8\% \pm 3.5$ ng/g excremento seco para la progesterona, $97.95\% \pm 2.9$ ng/g para el estradiol y 118.20 ± 5.6 ng/g para la testosterona.

El test de paralelismo se realizó mediante diluciones en serie (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16) de tres extractos fecales, obteniéndose un porcentaje de valores observados/esperados de 96.5% para la progesterona, 101.1% para el estradiol y 98% para testosterona.

Los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo para progesterona de concentración baja resultó en 3% ($n = 4$), concentración intermedia 3.5% ($n = 4$) y de la concentración alta 7.7% ($n = 4$) e inter-ensayo fue 10.61% ($n = 4$), 10.68% ($n = 4$), 4.30% ($n = 4$), respectivamente. Los CV intra-ensayo para el estradiol de concentraciones bajas fueron de 9.5% ($n = 3$), para intermedias 8.7% ($n = 3$) y en las altas fueron de 5.5% ($n = 3$). Los CV inter-ensayo para concentraciones bajas de estradiol fueron , 8.45% ($n = 3$); intermedias, 4.3% ($n = 3$); y altas, 6.8% ($n = 3$). Los CV intra-ensayo para testosterona de concentraciones bajas 5.35% ($n = 4$) intermedias 6.4 ($n = 4$) y altas 4.7% ($n = 4$). Los CV interensayo para la testosterona fueron para concentraciones bajas 9.1% ($n = 4$) intermedias 9.7% ($n = 4$) y altas 7.9% ($n = 4$).

Especificidad. La reactividad cruzada de la prueba, provista por el fabricante, se detalla a continuación: Progesterona: Progesterona 100%, 5-alfa pregnano 3,20-dione 6%, 11-desoxicorticosterona 2.50%, 17 alfa-hidroxiprogesterona 1.20%, 5 beta-pregnano-3,20-diona 0.80%, 11-desoxicortisol 0.48%, 20 alfa-dihidroprogesterona 0.10%. Estradiol: Estradiol 100%, Equilinina 2.73, Estrona 2.10%, Estriol 1.50%, 17-alfa Estradiol 0.30%, Cortisol < 0.01%, progesterona < 0.01%, testosterona 0.01%, sulfato de Estrona 1.23%, Glucurónido de Estrona 0.36%. Testosterona: Testosterona 100%, 5 α -dihidrotestosterona 6.6%, 5-androstene-3 β , 17 β -diol 2.2%, 11-oxotestosterona 1.8%, androstendiona 0.9%, 5 β -androstano-3 β , 17 β -diol 0.5%, 17 β -estradiol 0.4%, y 5 α androstano-3 α -ol-17-ona 0.2%.

Para descartar que los dos periodos de estro al año en la loba se debieran a enfermedades como neoplasias ováricas, hiperplasias, quistes ováricos, persistencia del cuerpo lúteo o infecciones del tracto reproductivo, se efectuaron evaluaciones clínicas, como palpación del vientre para detectar hinchazón, revisión de alopecia difusa, citología vaginal, revisión de la vulva para detectar consistencia y color de las secreciones, observación si la hembra se lamía la zona frecuentemente, además de observar que la secreción de progesterona y estradiol no era continua durante todo el año, en una cirugía para vitrificar oocitos se encontró que el tracto reproductivo era totalmente normal.

Al analizar los factores ambientales, se efectuaron comparaciones de la temperatura en base a los datos de la estación del Meteorológico Nacional número 046 ubicada en San Juan de Aragón, cercana al zoológico donde se localizaba la pareja y los ciclos de

luz-oscuridad en la ciudad de México (GAISMA) entre los años 2004 y 2007, éstos en los que la hembra no presentó doble estro (2004-2005) y años en que sí presentó esta condición (2006-2007).

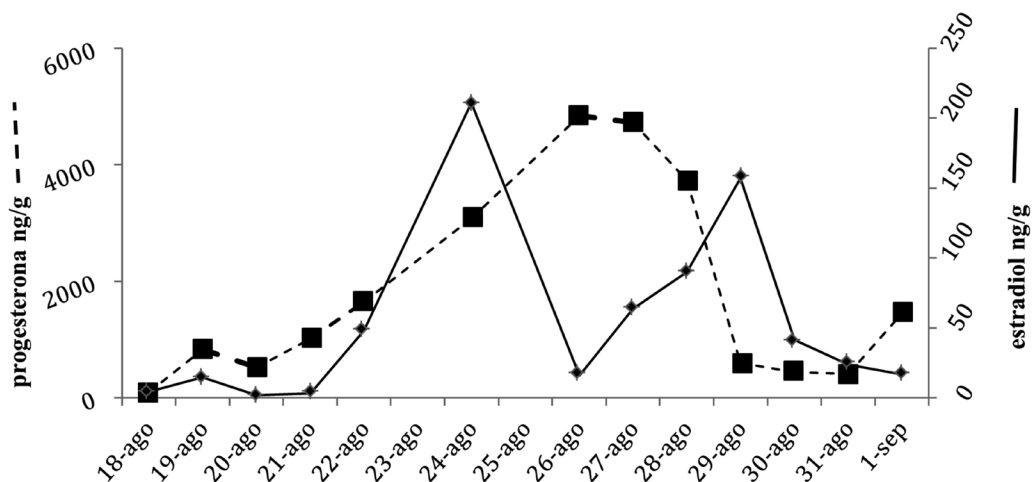
Por último, se hizo un análisis de la genealogía de la hembra para determinar si un proceso de endogamia podría ser la causa del doble ciclo reproductivo.

Resultados

Observaciones conductuales y concentraciones hormonales. A partir de que la pareja fue reunida (enero de 2006) mostró un buen acoplamiento conductual. A mediados de agosto la pareja presentó conducta sexual, comenzando con presentación de genitales por parte de la hembra al macho con un evidente desplazamiento de la cola. El macho comenzó a olfatear y lamer los genitales de la hembra y después de unos días presentó varios intentos de monta y montas. No se observaron cópulas (lock); incluso aunque la hembra mostraba conducta receptiva, la vagina no mostró apertura y redujo así las oportunidades de la intromisión peneana, no se observó el sangrado propio del proestro, ni hinchamiento de la vulva, propio de la etapa de proestro.

Durante estos eventos descritos anteriormente se cuantificaron estradiol y progesterona a partir de las heces fecales de la hembra (Fig. 1), observándose un incremento en la concentración de ambas hormonas, lo cual normalmente no sucede en esta temporada. En enero del 2007 la hembra mostró sangrado e hinchazón de la vulva propios de la época reproductiva; el macho olfateó y lamió los genitales de manera frecuente por un periodo de un mes, observándose numerosos intentos de monta. A finales de mes se registraron varias cópulas (lock) que dieron lugar a gestación.

Fig. 1 Concentraciones de las hormonas esteroides sexuales de la hembra en verano de 2006.



A mediados de febrero se observó, en la hembra un sangrado vaginal, y como la pareja no estaba asignada para reproducción por el Plan Binacional de Recuperación de la especie, se decidió separarla aún sin saber que estaba gestante, (en los cánidos no es posible diagnosticar gestación con base en las concentraciones de progesterona, ya que esta hormona normalmente se eleva exista o no preñez, Asa (1999)), el 2 de abril nació un cachorro mortinato.

En mayo, después de la época reproductiva, de nuevo se reunió a la pareja, y en el mes de agosto se observó que la hembra tenía hinchamiento de vulva y comenzaba a presentar los genitales al macho. Durante las dos primeras semanas en las que se

presentaron estos eventos, el macho comenzó a olfatear y lamer los genitales de la hembra. Posteriormente se observaron varias cópulas, pero esta vez no hubo gestación.

Una conducta similar fue observada en 2008, 2009 y 2010, cuando la hembra fue ovariectomizada para participar en el programa de vitrificación de oocitos.

El estradiol y la progesterona, cuantificados a lo largo del año, mostraron una serie de picos correspondientes a los períodos en que se presentó la conducta sexual, tanto desde enero hasta a abril como en agosto (Fig. 2), en el macho durante ese mismo año también se observa un incremento de la testosterona en el periodo reproductivo y en el mes de agosto (Fig. 3).

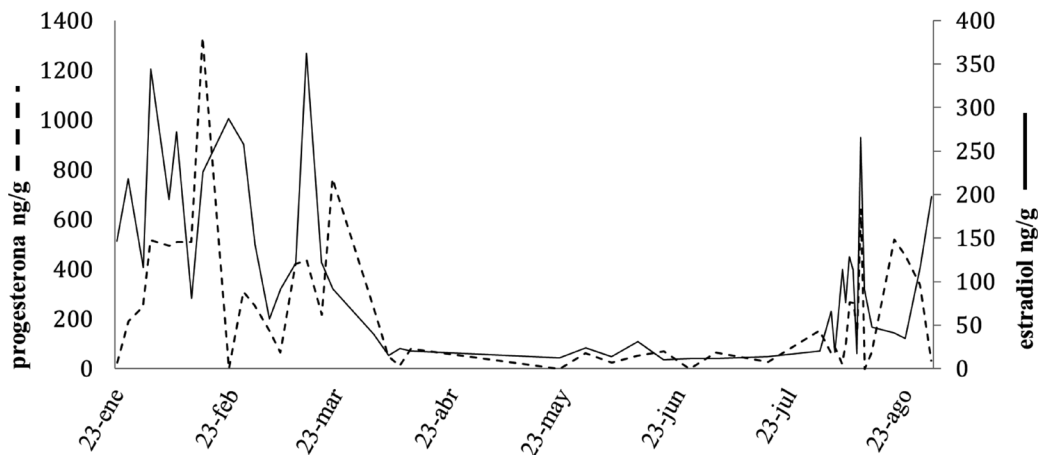


Fig. 2 Concentraciones de las hormonas esteroides sexuales de la hembra durante el año 2007.

Factores ambientales. Durante los años en que la hembra permaneció en el Zoológico de Aragón en la Ciudad de México, no se presentaron variaciones relevantes en los ciclos luz-oscuridad (Fig. 4), y tampoco en los ciclos de temperatura de la ciudad de México (Fig. 5).

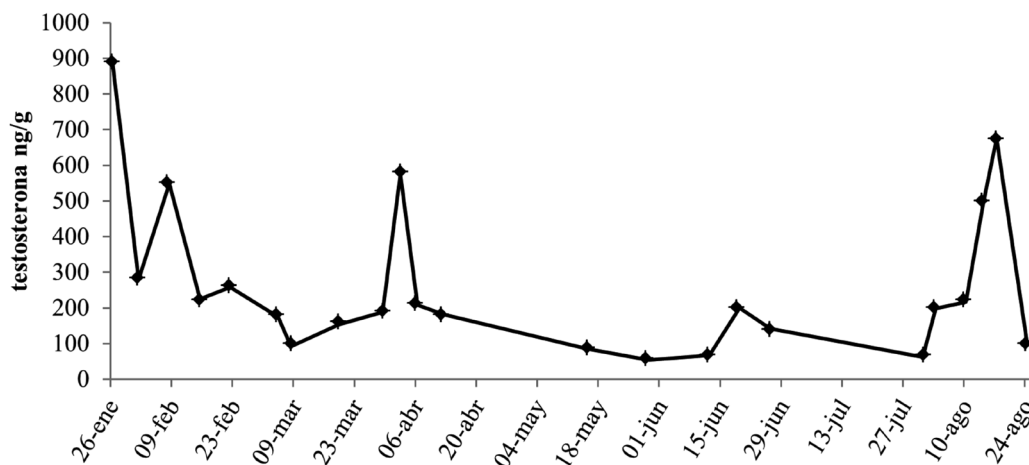


Fig. 3 Concentraciones de testosterona en el macho durante el año 2007

Análisis del pedigrí. Respecto a la hembra, a lo largo del pedigrí general y en la revisión del coeficiente de endogamia y grado de parentesco en el studbook (Siminski 2012). Se encontró que al igual que el resto de la población de lobo mexicano, sus ancestros están emparentados; aún así, la hembra no esta considerada como ejemplar de alta

consanguinidad. Al contrario, se la ha considerado como un buen candidato para la reproducción, ya que su genoma no está sobrerrepresentado dentro de la población cautiva de lobo mexicano (Speevak 2008; Fig. 6).

Pruebas clínicas. Los resultados de las pruebas clínicas para determinar si en la hembra tenía alguna condición patológica que pudiera influir en la presentación del doble estro anual, no arrojaron ninguna evidencia de enfermedad. Por lo que se descarta cualquier posibilidad de daño o patología como causante del doble estro.

Discusión

Una de las principales diferencias con el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), que se reproduce dos veces por año, es que todas las demás subespecies de lobo reportadas se reproducen sólo una vez al año (Asa et al. 1998; Asa 1999; Kreeger 2003; Soto et al. 2004). Este factor podría relacionarse con una inhibición fisiológica de un segundo ciclo, inhibición que no existe en los perros. Si esto es correcto, podríamos asumir que tal factor está suprimido en la hembra examinada (studbook 605). El anestro prolongado ha sido descrito como un período de quiescencia endocrina (Kreeger 2003), por lo tanto una secreción hormonal anormal podría ser la causa de esta interrupción del anestro y la aparición de un segundo estro. Algunos autores (Concannon et al 1997, Stornelli et al. 2006), al estudiar perras, se refieren a la presencia de un factor “dormitorio o inhibitorio” durante el anestro, y que se ha observado que perras que se encuentran en anestro medio o tardío y que conviven con hembras en proestro o estro acortarán la duración de su anestro en al menos 30 días (Concannon et al. 1993). Se sugiere que este efecto está mediado por feromonas, pero el mecanismo aún es desconocido (Stornelli et al. 2006). Al mismo tiempo, existen reportes de la inducción y sincronización de estros con la tratamientos de agonistas de gonadotrofinas con aplicación de desroleína en lobas (Asa et al. 2006) y en perras (Kutzler et al. 2005), y con aplicación de buserelina y cistolerina también en perras (Stornelli et al. 2006). Esto nos sugiere que nuestra hembra quizá tenga elevadas las concentraciones de las gonadotrofinas y que esto cause este doble estro anual.

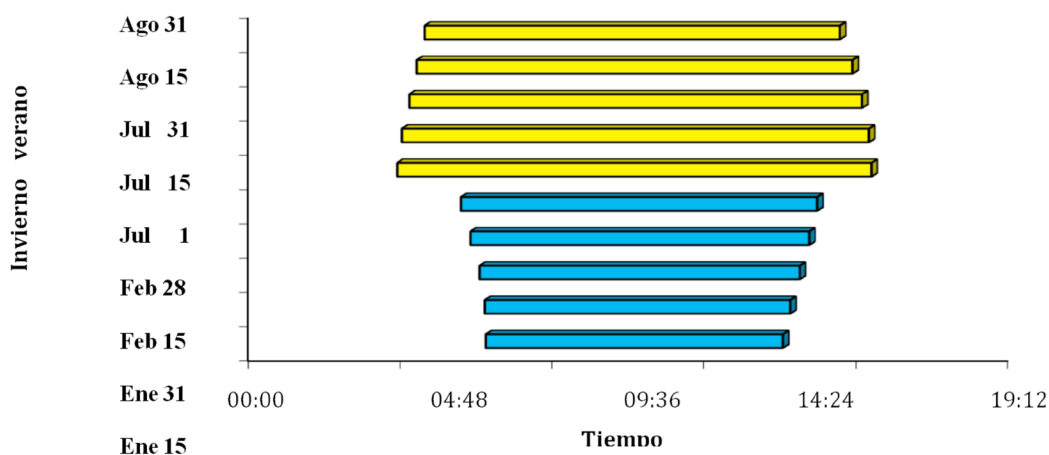


Fig. 4 Fotoperíodo promediado de los años 2005 a 2007 (GIMSA)

Además de su importancia en la lactancia y cuidado parental la prolactina tiene otras funciones relacionadas con la reproducción. Esta hormona presenta un ritmo circanual

en ambos sexos, tanto en lobos como en perros, elevándose en la primavera con los días largos y disminuyendo en invierno con los días cortos (Kreeger *et al.* 1991). Este ritmo circanual funciona como una señal para la actividad reproductiva y se sabe que tiene un papel importante en la duración del periodo interestral afectando la liberación de las gonadotropinas (Stornelli *et al.* 2006). Por lo tanto, al presentarse la disminución de la prolactina en invierno se facilita la secreción gonadotrófica y así se da inicio al periodo reproductivo de invierno. En base a esto podemos suponer que alguna alteración en la secreción, tanto de prolactina como de hormonas gonadotróficas durante el verano sea la probable causa de la presentación de un segundo periodo de estro en la hembra 605.

Es importante que si aparecen más casos como el de esta hembra, se efectúe un análisis de las concentraciones de ambas hormonas durante todo el año, y así pueda encontrarse la causa posible del doble estro anual.

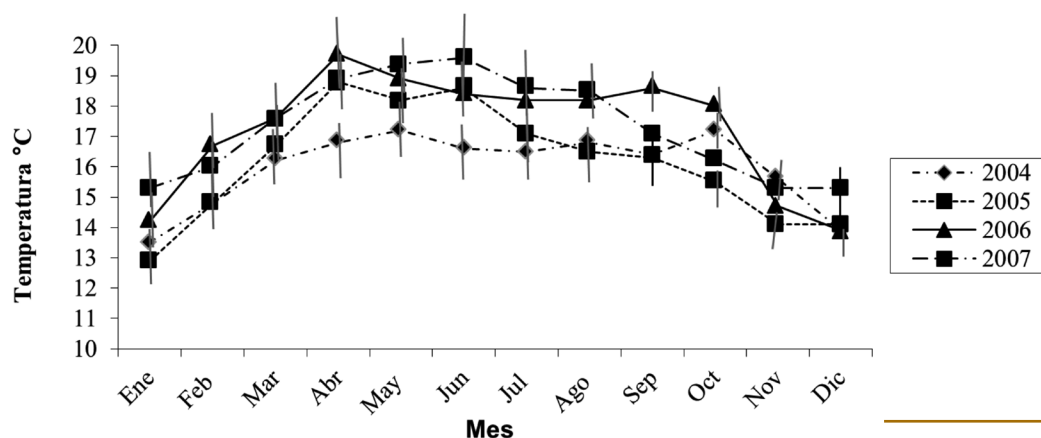


Fig. 5 Temperatura media mensual promedio en el zoológico de San Juan de Aragón, Ciudad de México del 2004 al 2007 (SMN estación 06)

Las observaciones conductuales durante el mes de agosto, en las que se registró el comportamiento sexual por parte de la hembra, mostraron que sus conductas más la presencia de olores de la descarga vaginal, la hacían muy atractiva al macho, y lo estimulaban a presentar conducta sexual. Esto difiere de lo reportado para los machos de lobo referente que, al igual que las hembras, también son de reproducción estacional, Kreeger (2003). Asimismo, a finales de invierno se ha reportado en el lobo que la secreción de testosterona es mayor durante el período reproductivo y no así en el resto del año (Asa 1999). Nuestro trabajo confirma un incremento normal de la testosterona en el macho 779 alojado con la hembra 605 durante el invierno. Pero nuestros resultados mostraron que en el mes de agosto el macho tuvo un incremento importante de esta hormona. Probablemente esto se deba a una respuesta suya a la estimulación conductual y olfativa por parte de la hembra, lo cual disparó esta secreción hormonal en el macho.

La temperatura y ciclos luz oscuridad no presentaron cambios relevantes que pudiera explicar la presentación del segundo período estral, la temperatura promedio fue más elevada en los años 2006-2007. Sin embargo, la diferencia de temperaturas promedio entre enero y agosto es mucho mayor, por lo que es difícil considerar que la temperatura, por si sola, pueda explicar la presencia del segundo celo.

Tampoco se observaron cambios en la duración, intensidad de la luminosidad que pudieran justificar el desarrollo hormonal que derivara en la aparición del período reproductivo.

En el análisis del pedigrí se muestra que la hembra 605 pertenece al linaje McBride puro por lo que podemos concluir que no tiene ninguna influencia genética de otra especie (*i.e.* perro) que pudiera influir en la presentación del doble estro. Sin embargo, como se mencionó en la figura 6 se puede observar por los resultados que los ancestros sí muestran cierto parentesco, lo que le da a la hembra 605 una condición de consanguinidad. Pero debe señalarse que esto también lo presenta gran parte de las hembras de la población de lobo mexicano, ya que los fundadores de esta población incluyeron solo cinco ejemplares, Armella (2012), y no se ha observado el doble estro en otra hembra de lobo lo que nos dice que es poco probable que la causa sea esta consanguinidad.

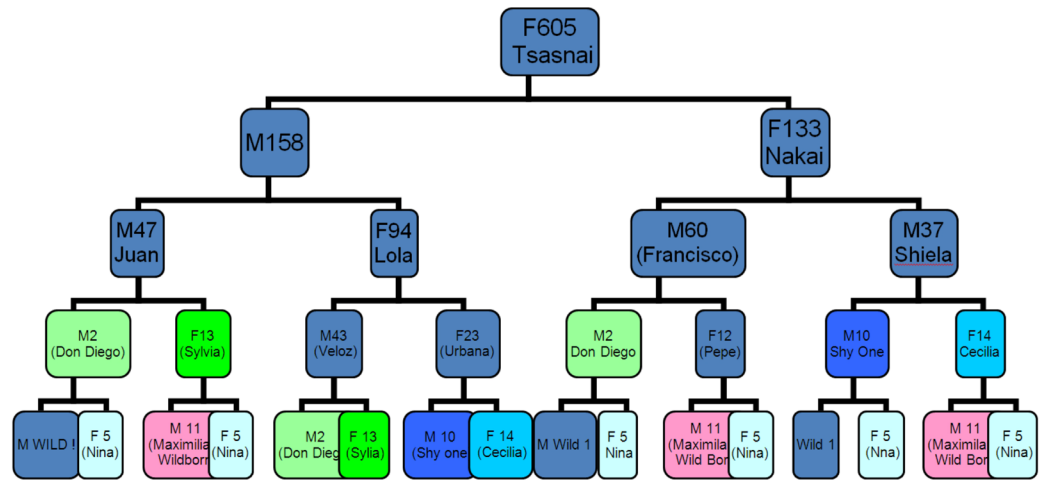


Fig. 6 Pedigrí de la hembra 605.

Nosotros no encontramos reportes de lobas que presentaran esta condición de doble estro de manera similar a la hembra 605, lo cual dificulta concluir sobre exactamente que factores influyen en este doble estro, solo podemos estar seguros de que no se debe a una condición generada por alguna enfermedad.

Literatura citada

- ARMELLA, M. A. 2011. Will the Mexican wolf again become part of Mexico's wildlife. *International Wolf* 21:16-19.
- ASA, C. S. 1997. Hormonal and experiential factors in the expression of social behavior and parental behavior. Pp. 129-149 in *Cooperative breeding in mammals* (Solomon, N. G., y J. A. French, eds.). Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- ASA, C. S. 1999. Dogs. Pp. 902-909 en *Encyclopedia of Reproduction*. Volumen uno. Academic Press. New York, EE.UU.
- ASA, C. S., K. BAUMAN, P. CALLAHAN, J. BAUMAN, D. H. VOLKMANN, Y J. WOLFGANG. 2006. Gn-RH-agonist induction of fertile estrus with either natural mating or artificial insemination, followed by birth of pups in gray wolves (*Canis lupus*). *Theriogenology* 66:1778-1782.
- ASA, C. S., Y C. VALDESPINO. 1988. Canid reproductive biology: an integration of proximate mechanisms and ultimate causes. *Integrative and Comparative Biology* 38:251-259.

- CONCANNON, P. W., G. C. W. ENGLAND, A. RIJNBEC, J. P. VERSTEGEN, Y C. DOBERSKA.** 1997. Reproduction in dogs, cats and exotic carnivores. *Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)* 51, 81:3-25.
- CONCANNON, P. W., G. C. W. ENGLAND., J. P. VERSTEN, Y H. A. RUSELL.** 1993. Fertility and infertility in dogs, cats and other carnivores. *Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)* 47, 39:6-34.
- GAISMA.** <http://www.gaisma.com/en/location/mexico-city.html>
- KREEGER, T. J., U. S. SEAL, Y. COHEN, E. D. PLOTKA, Y C. S. ASA.** 1991. Characterization of Prolactin Secretion in gray wolves. *Canadian Journal of Zoology* 69:1366-1374.
- KREEGER, T J.** 2003. The Internal Wolf: Physiology, Pathology and Pharmacology. Pp. 192-217 in *Wolves, Behavior, Ecology and Conservation* (Mech, D., y L. Boitani, eds.). The University of Chicago Press. Chicago, EE.UU.
- KUTZLER, M. A.** 2005. Induction and synchronization of estrus in dog. *Theriogenology* 64:766-775.
- MECH, L. D.** 2000. The wolf. The ecology and behavior of an endangered species. University of Minnesota Press. Minneapolis, EEUU.
- MECH, L. D., Y L. BOITANI.** 2003. *Wolves, Behavior, Ecology and Conservation.* The University of Chicago Press. Chicago, EE.UU.
- PACKARD, J. M.** 2003. Wolf Behavior: Reproductive, Social and Intelligent. Pp. 35-65 in *Wolves, Behavior, Ecology and Conservation* (Mech, D., y L. Boitani, eds.). The University of Chicago Press. Chicago, EE.UU.
- SEAL, U. S., E. D. PLOTKA, J. M. PACKARD, Y L. D. MECH.** 1979. Endocrine correlates of reproduction in the wolf I. Serum progesterone, estradiol and LH during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* 21:1057-1066.
- SERVÍN, J.** 1997. El periodo de apareamiento, nacimiento y crecimiento del lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*). *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 45:43-46.
- SIMINSKY, P.** 2012. Mexican Wolf *Canis lupus baileyi*; International Studbook (update) 31 July 2012. The Living Desert. Palm Desert, California.
- SPEEVAK, E.** 2008. Mexican wolf *Canis lupus baileyi*: Population Mean Kinship. In Special Survival Plan (SSP) (Siminski, P. ed.) Saint Louis Zoo. San Louis Missouri, EEUU.
- SOTO, M. A., A. SALAME-MÉNDEZ., J. RAMIREZ-PULIDO., L.YAÑEZ., Y M.A. ARMELLA.** 2004. Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 20:187-196.
- STORNELLI, M. C., F. GIMENEZ, C. M. TITTARELLI, C. A. SAVIGNONE, R. L. DE LA SOTA Y M. A. STORNELLI.** 2006. Inducción de ciclos estrales en la perra: Actualización bibliográfica. *Analecta Veterinaria* 25:39-45.
- VALDESPINO C., C. S. ASA., Y J. E. BAUMAN.** 2002. Ovarian cycles, copulation and pregnancy in the fennec fox (*Vulpes zerda*). *Journal of Mammalogy* 83:99-109.

Sometido: 6 de agosto de 2013
Revisado: 27 de octubre de 2013
Aceptado: 14 de noviembre de 2013
Editor asociado: Jorge Servin
Diseño gráfico editorial: Gerardo Hernández