

Método no invasivo de diagnóstico de gestación en venadas *Odocoileus virginianus*

Non-Invasive Method for Pregnancy Diagnosis in *Odocoileus Virginianus*

P. Cervera-Hernández^a

R. C. Montes-Pérez^{a,*}

F. Victoria-Arceo^b

J. Camacho-Reyes^c

I. F. Castillo-López^c

Resumen

Objetivo: Valorar la eficiencia del diagnóstico de gestación mediante la estimación de niveles de progesteronas fecales en venadas cola blanca *O. virginianus* en la época no reproductiva. **Materiales y métodos:** Se analizaron muestras sanguíneas y heces de nueve venadas cola blanca (VCB), semanalmente, durante dos meses en la época reproductiva. Adicionalmente, las VCB fueron expuestas a macho durante un mes durante la época reproductiva, y se colectaron heces dos veces fuera de esta, para medir los niveles de metabolitos de progesteronas. Se determinó el valor de corte para diagnosticar gestación a partir de los niveles de metabolitos de progesteronas fecales en fase luteal y folicular. La progesterona sanguínea fue medida por radioinmunoanálisis, y se correlacionó con los niveles de progesteronas fecales. Los diagnósticos de gestación fueron relacionados con los partos. **Resultados:** La correlación total entre niveles de progesteronas sanguíneas y metabolitos de progesteronas fecales fue 0,37 ($p < 0,01$). La variación de la correlación individual fue 0,104 hasta 0,99. El valor de corte para diagnosticar gestación fue 4000 ng/g en heces. La eficiencia del diagnóstico de gestación fue 77,78 %; el valor predictivo del diagnóstico positivo fue 75 %, y el negativo fue 80 %, respectivamente. **Conclusiones:** Es posible diagnosticar gestación fuera de la época de reproducción mediante la estimación de los niveles de metabolitos de progesteronas fecales, en VCB en cautiverio, tomando como valor de corte 4000 ng/g de heces.

Palabras clave: Metabolitos esteroides, Heces, Cérvidos, Reproducción de venadas, Diagnóstico de gestación.

^aUniversidad Autónoma de Yucatán, México.

* Autor de correspondencia: mperez@uady.mx

^bParque Zoológico del Centenario, Mérida, Yucatán, México.

^cUniversidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Boyacá.

Abstract

Objective: To value the efficiency of pregnancy diagnosis by estimating levels of fecal progestins in white-tailed deer *O. virginianus* outside the reproductive season. **Materials and methods:** Blood and feces samples of nine White tailed-deer (WTD) were analyzed weekly for two months in reproductive season. Additionally WTD were exposed to a male during a month in reproductive season and feces were collected twice in non-reproductive season, in order to estimate progestins metabolites levels. The cut value for pregnancy diagnosis from levels of fecal progestins metabolites in luteal and follicular phases of WTD, was determined. Blood progesterone levels were measured by radioimmuno analysis and were correlated with the fecal progestins levels. Pregnancy diagnosis was related with the deliveries. **Results:** Total correlation coefficient between blood progestins levels and fecal metabolites progestins was 0.37 ($p < 0.01$). Individual correlation coefficient variation was 0.104 to 0.99. Cut off value for pregnancy diagnosis was 4000 ng/g in feces. Efficiency for pregnancy diagnosis was 77.78 %, predictive positive value was 75 % and the negative was 80 % respectively. **Conclusions:** It is possible to carry out pregnancy diagnosis in non-reproductive season, through quantification of fecal progestin metabolites levels, in WTD in captivity, taking as cut value 4000 ng/g feces.

Key words: Steroid Metabolites, Feces, Deer, Reproduction, Pregnancy Diagnosis

1. Introducción

Las venadas cola blanca (VCB) de Yucatán México, presentan reproducción estacional. La época reproductiva se extiende de octubre a enero de cada año [1], durante esta las hembras presentan estro cada 26 días, el cual dura aproximadamente 18 horas [2]. El ciclo estral está representado endocrinológicamente por dos fases: folicular y luteal; en la primera ocurre crecimiento folicular, y los niveles de progesterona sanguínea alcanzan valores medios de 0,5 ng/ml; en la segunda fase aumenta la progesterona, por haber ovulación y la formación de uno o más cuerpos lúteos, y la progesterona alcanza niveles medios de 5,1 ng/ml [3]. Si la VCB no concibe durante la época reproductiva, permanecerá con niveles basales de progesterona durante la época no reproductiva; de lo contrario, mantendrá niveles altos de progesterona sanguínea, por la presencia de cuerpo lúteo [4, 5].

Debido a la dificultad que representa en ungulados silvestres el manejo periódico necesario en evaluaciones hormonales sanguíneas, se han desarrollado técnicas para la determinación de esteroides urinarios y fecales como métodos no invasivos [6]. En cautividad es posible detectar la condición reproductiva y la gestación en cérvidos mediante métodos invasivos, ya sea por los signos clínicos, laparoscopia (LP), ultrasonido (US) y medición de los niveles de progesterona sanguínea [7-9]; sin embargo, el primer procedimiento implica efectuar el diagnós-

tico tardíamente, en el último tercio de gestación. La utilización de LP y US implica la sujeción de los animales y, por lo tanto, el riesgo de causar lesiones a la VCB o perder la gestación por efecto del estrés debido a sujeción; además que el procedimiento de manejo es complicado, principalmente en instalaciones donde los animales se pueden desplazar libremente en áreas relativamente grandes. A partir de estas limitaciones, la alternativa factible es efectuar el diagnóstico de gestación mediante el monitoreo remoto de la actividad ovárica de VCB (método no invasivo).

El objetivo que se plantea en este trabajo es estimar la eficiencia del diagnóstico de gestación en venadas cola blanca (*Odocoileus virginianus*) fuera de la época reproductiva, mediante la determinación de los niveles de metabolitos de progestinas fecales.

2. Metodología

Sitio de estudio. El estudio se realizó en la Hacienda Poxilá, del estado de Yucatán, México, con una temperatura media anual de 26,5 °C; allí se confinaron nueve VCB en corrales individuales, con una superficie de 12 m² cada uno. Los encierros contenían sombreadero, comedero, saladero y bebedero. Los animales se alimentaron con forraje de ramón (*Brosimum alicastrum*) y frutas de la temporada, en una cantidad aproximada de 4 kg diarios. El agua fue administrada a libertad, se suplementó la dieta con sales minerales. Las VCB fueron sedadas el mis-

mo día de cada semana, durante dos meses, con una combinación de Xilacina:Ketamina (1,5mg/kg:4,0 mg/kg), utilizando una pistola de dardos con cámara de aire. Una vez aplicada la inyección se esperó 30 min para obtener la sangre por punción yugular. Después de colectar la muestra de sangre se administraron 10 mg de Yohimbina por vía intravenosa como antídoto, para la recuperación rápida de los animales. Se obtuvo el plasma sanguíneo de la muestra y se procesó con la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), para determinar los niveles de progesterona sanguínea de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Diagnostic Products, USA), en el laboratorio de RIA de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, México [10]. Se colectaron heces de cada venada al día siguiente de la punción. Las muestras fecales para diagnosticar gestación fueron colectadas dos veces para cada venada, con un intervalo mínimo de una semana, durante los meses de abril a junio. Las excretas fueron secadas en horno, a 60 °C, durante dos días. Posteriormente, se efectuó la extracción de esteroles con éter etílico (Merck); el extracto etéreo se evaporó y resuspendió en metanol al 99 % (Merck); el extracto metanólico se procesó de acuerdo con la técnica de Larter *et al.* [11]. La estimación de metabolitos de progestinas fecales se efectuó mediante RIA en fase sólida, utilizando los tubos recubiertos con antiprogesterona, trazador de progesterona unida a I-125 del mismo estuche comercial de RIA, y los calibradores fueron preparados en solución de metanol al 100 % (Merck) y progesterona reactivo analítico (Merck).

Análisis de datos. Se aplicó la correlación lineal de Pearson a los valores de progesterona sanguínea y metabolitos fecales. Se determinó la zona de valor de corte para asignar gestación con los niveles de metabolitos fecales de acuerdo con la metodología de Galen [12], y con esa misma metodología se determinó la eficiencia, valor predictivo positivo y negativo para diagnosticar gestación, tomando como referencia el evento de parto en las venadas diagnosticadas.

3. Resultados y discusión

Los valores de progesterona plasmática fluctuaron entre 0,01 y 6,43 ng/ml. Se detectaron claramente las fases folicular y luteal en todas las venadas es-

tudiadas. Los niveles de metabolitos de progestinas fecales fluctuaron entre 700 y 10000 ng/g de heces. Las correlaciones individuales entre los niveles de progesterona sanguínea y los metabolitos de progestinas también fluctuaron entre 0,04 y 0,99 (tabla 1). La correlación total entre todos los valores fue de 0,37 ($p < 0,01$).

Tabla 1. Correlaciones individuales entre los niveles de progesterona sanguínea y los metabolitos de progestinas fecales de nueve venadas cola blanca (*Odocoileus virginianus*), medidos mediante radioinmunoanálisis en fase sólida.

Nombre de la venada	Correlación entre progesterona plasmática y metabolitos de progestinas fecales fecales
Bombón	0,18
Gorda	0,104
Mocha	0,0357
Rosita	0,884
Beatriz	0,765
Conchita	0,237
Nena	0,538
Panchita	0,956
Susan	0,995

De los cuatro valores de corte que se probaron para evaluar la eficiencia, valor predictivo positivo y negativo del diagnóstico de gestación en venadas cola blanca, se determinó que para asignar gestación a través de los niveles de metabolitos de progestinas, estos deben ser de 4000 ng/g heces. Se asignó gestación positiva cuando en las dos muestras fecales de la misma venada los niveles de metabolitos de progestinas fueron iguales o mayores a 4000 ng/g. Una vez ocurrido el parto se obtuvieron los siguientes resultados: tres diagnósticos verdaderos positivos, un diagnóstico falso positivo, cuatro diagnósticos verdaderos negativos y un diagnóstico falso negativo. En la figura 1 se muestran los resultados.

Los niveles de progestinas registrados en las muestras fecales de todas las venadas en estudio tuvieron una correlación baja, aunque altamente significativa; sin embargo, al analizar los resultados de manera individual, se encontró que hubo animales que presentaron correlaciones muy altas y altamente significativas, teniendo uno de ellos una correlación de 0,9952 y otro de 0,9563, aunque otros animales presentaron correlaciones no significativas. Resultados similares fueron obtenidos por Ramírez *et al.* [13] al trabajar con seis ovejas Rambouillet, ya que al correlacionar los niveles de progesterona sanguínea

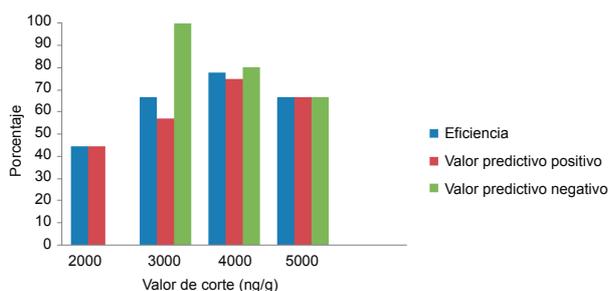


Figura 1. Asignación de la eficiencia y valores predictivos para el diagnóstico en venadas cola blanca (*Odocoileus virginianus*), usando cuatro valores de corte de niveles de metabolitos de progestinas en heces.

con heces obtuvo en un animal una correlación altamente significativa, en otros dos la correlación fue significativa y en los tres animales restantes no fue significativa, llegando inclusive a obtener un valor negativo, concluyendo que los niveles de progestinas fecales fueron buen indicador de la actividad ovárica en solo tres de las ovejas estudiadas, y que el valor negativo pudo deberse a un error experimental. También consideró necesario realizar la investigación con un número de animales que sea estadísticamente significativo.

Los resultados obtenidos pueden deberse a varios factores, uno de ellos son las variaciones individuales en la excreción y metabolización de progesterona, las cuales pueden influir en los perfiles hormonales [14]; este hecho debe ser tomado en cuenta con cuidado, ya que se encontró gran variación en los resultados analizados de manera individual; si este hecho se debiera a las variaciones individuales, estas serían demasiado grandes para considerar que las progestinas fecales reflejan de manera indirecta la actividad lútea; sin embargo, estos metabolitos han sido considerados buenos indicadores de la actividad ovárica en felinos, primates, ungulados y especialmente en *Mazama americana* [15] y *M. gouazoubira* [16] y otras especies, tanto domésticas como de zoológico [14]. Brousset *et al.* [17] reportan que las variables que afectan la concentración hormonal contenida en los excrementos son: constipación, diarrea, restricción de alimentos, cantidad de fibra en la dieta, tratamientos con antibióticos que afecten la microbiota intestinal y las características metabólicas de cada individuo, lo cual también ha sido reportado por Palme *et al.* [18].

Otro de los factores que debe ser considerado es el tipo de anticuerpos utilizados para medir la concentración de progestinas, ya que el que se utilizó para la medición de estos metabolitos presenta 100 % de especificidad para la progesterona, siendo muy baja su reacción cruzada con otras progestinas, aunque ha sido utilizado anteriormente para medir progestinas fecales en rumiantes [11]. Cuando se ha medido la excreción de progesterona en las heces de caballos, felinos, primates, rinocerontes negros y otros mamíferos, se han encontrado varias progestinas presentes, y al separarse los metabolitos fecales mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se han detectado ocho metabolitos de progesterona [14]. Estos metabolitos presentan un patrón similar al de las progestinas, y la presencia de progesterona únicamente se ha detectado en cantidades limitadas o no ha sido detectada. Por lo anterior, y siendo el estuche utilizado tan específico para progesterona, pudieron haberse subestimado las cantidades reales de progestinas, tal como lo mencionan Schwarzenberger *et al.* [19]; así mismo, Möstl, citado por Graham *et al.* [20], recomienda usar un antisuero menos específico, debido a la variedad de progestinas observadas en diferentes especies, y sugiere utilizar un anticuerpo que pueda tener reacción cruzada con varias progestinas. Las aseveraciones anteriores serían aplicables en el caso de las venadas; Kapke *et al.* [21] demostraron que en heces se encuentran cantidades mayores de progestinas que de progesterona, siendo el pregnenediol la progestina más abundante.

Otro de los factores que pudo haber influido en los resultados es el tiempo en el cual se realizaba la colecta de las heces; Williams [22] determinó, en vacas, que 12 horas después de la infusión de hidroxiprogesterona radiactiva ya se había recuperado la mayor parte de las progestinas excretadas por las heces; Palme *et al.* [18] reportaron que en las ovejas el pico de excreción de esteroides fecales ocurre 12 horas después de la infusión de esteroides radiactivos, y Kapke *et al.* [21] encontraron que los picos de excreción en heces ocurrían 24 horas después de haber sido inyectada progesterona radioactiva en venadas.

Por otra parte, las progestinas de las hembras que se encontraban fuera de la estación reproductiva, y que no parieron, mostraron valores de 2544 ng/g a 12596 ng/g, y aquellas que parieron tuvieron niveles

de progestinas que iban de 3600 ng/g hasta 37656 ng/g. Aunque la cantidad mayor presentada por las venadas gestantes es casi cuatro veces más alta que el nivel de progestinas encontradas en venadas que se encuentran en la fase lútea del ciclo, el nivel menor está dentro de los valores para fase lútea, por lo que claramente se nota que los valores se traslapan.

En la literatura se encuentran pocos registros de valores de progesterona sanguínea para venadas. Plotka *et al.* [23] registran un rango amplio, que va de 4,5 ng/ml a 13,5 ng/ml, el cual presenta valores similares a los encontrados en venadas que estaban en la fase luteal del ciclo estral. Los niveles de progesterona permanecen elevados durante la gestación y declinan una semana antes del parto, tendiendo a ser más altos cuando la venada tiene más fetos o es múltipara, ocurriendo traslape de estos valores. Estos datos nos indican los factores que influyen en el amplio rango de niveles de progestinas encontradas en las venadas y el traslape que ocurre entre ellos.

Se presentaron cuatro casos en los cuales se realizó el diagnóstico positivo y resultaron verdaderos positivos, con lo cual se confirmó que las progestinas medidas correspondían a la progesterona producida por el cuerpo lúteo de la preñez. En otros cuatro casos, el primer muestreo tuvo niveles altos de progestinas; posiblemente, estas venadas todavía presentaban ciclos estrales, puesto que para el segundo muestreo ya habían bajado las cantidades de progestinas a niveles considerados negativos a la presencia de gestación. En el caso de una venada que fue separada de este trabajo, se le colectó sangre durante la fase de inducción, en dos ocasiones a que fue sometida a contención química, y en los dos muestreos presentó cantidades elevadas de progestinas, sin estar gestante, esto podría deberse a la producción extraovárica de progesterona, debido al estrés que le causa estar adaptándose a un nuevo medio, estableciendo su territorio y jerarquía, ya que es la única que para el mes de mayo tenía elevados los niveles de progestinas.

Estos resultados son similares a los mencionados por Polegato [24], quien registra que en estas situaciones de estrés la corteza suprarrenal libera cortisol, que actúa mediante la movilización de reservas de energía de acuerdo con las necesidades fisiológicas durante el estrés, y la progesterona suprarrenal estimula la inhibición del pico preovulatorio de LH. Ello

indica que en estos procesos los eventos reproductivos pueden ser fisiológicamente modificados, lo que podría afectar los valores registrados de los análisis y la información obtenida, lo cual es coincidente con lo reportado por Lasley *et al.* [25], Morrow & Monfort [26] y Hamasaki *et al.* [27]. Los niveles sanguíneos de progesterona en venadas sometidas a contención física y química son la suma de lo originado por los ovarios y la corteza suprarrenal; la depuración media de los niveles de progesterona sanguínea es de aproximadamente 30 a 40 minutos después de que el animal alcanza el estado de sedación; sin embargo, los niveles de progesterona ovárica y extraovárica se depuran por vías renal y vesícula biliar, de manera que los niveles de metabolitos de progestinas fecales expresan la suma de ambas secreciones [28, 29]. A partir de este proceso se puede inferir que las correlaciones altas entre progesterona sanguínea y fecales en algunas VCB corresponden a animales que soportan el estrés y producen pequeñas cantidades de progesterona suprarrenal, y que las correlaciones bajas corresponden a animales con los cuales sucede lo contrario.

En cuanto a la eficiencia en la determinación de preñez en hembras fuera de la época reproductiva, se encontró que era del 77,7% en la determinación de la presencia o ausencia de la gestación. Esta eficiencia es inferior a los resultados obtenidos en trabajos similares. Montfort *et al.* [30] trabajaron en alces (*Alces alces*), y obtuvieron un 85% de efectividad al determinar la preñez en estos por medio de los niveles de progestinas en heces, cuantificados por RIA. Por su parte, Berkeley *et al.* [31], al medir los niveles de progestinas por medio de ELISA para determinar la gestación en 13 rinocerontes negros (*Diceros bicornis*), obtuvieron 92% de exactitud para confirmar la preñez.

En relación con trabajos anteriores, la eficiencia es un poco menor y puede deberse a la especificidad de anticuerpos antiprogesteronas para cuantificar metabolitos de progesterona; sin embargo, fue eficiente para diagnosticar la gestación, probablemente, por la mayor cantidad de progestinas presentes en las heces de los animales gestantes, lo cual aumenta la competencia del antígeno por el sitio de unión [32].

Knox *et al.* [33] encontraron que la variación entre los niveles de progesterona sanguínea y sus metabolitos en orina de VCB también es muy alta. Los

valores se extienden de 0,37 hasta 0,78, y el valor total de correlación es de 0,10. Probablemente la vía de metabolización y depuración de los metabolitos de progestinas puedan variar entre diferentes especies, por lo que no se podrían utilizar los mismos compuestos químicos como indicadores de progesterona sanguínea; sin embargo, los niveles de pregnanediol-glucurónido en heces y orina se han tomado como indicador de actividad ovárica en algunos primates, rinoceronte y okapi [14].

El valor de eficiencia del diagnóstico de gestación es relativamente bajo; sin embargo, el valor predictivo negativo supera al de eficiencia y al valor predictivo positivo; ello indica que la técnica del seguimiento remoto empleado en el presente estudio tiene mayor probabilidad de diagnosticar la no gestación que la gestación positiva; tal resultado es el esperado, puesto que las técnicas de RIA para estimar los niveles de progesterona sanguínea en animales domésticos son más eficientes para diagnosticar la no gestación. En esos estudios la eficiencia del diagnóstico oscila entre 76 y 94 %; los valores de eficiencia superiores al 50 %, como el alcanzado en este trabajo, indican que la probabilidad de diagnosticar gestación exitosamente es significativamente mayor que el obtenido mediante el azar; entre más cercanos sean al 100 %, son más confiables [34].

4. Conclusiones

Es posible diagnosticar gestación fuera de la época de reproducción mediante los niveles de metabolitos de progestinas fecales en VCB en cautiverio, tomando 4000 ng/g de heces como valor de corte.

Referencias

- [1] F. Carrillo, "Políticas sobre la administración del venado cola blanca en cautiverio", *Rev. Univ. Yuc.*, vol. 2, no. 162, pp. 78-85, Mayo, 1987.
- [2] L. C. Galindo y M. Weber, "El venado de la Sierra Madre Occidental". México, D.F. Comisión Nacional para el Estudio y Uso de la Biodiversidad, México D. F., 1997, pp. 108-110.
- [3] E. D. Plotka, U. S. Seal, L. J. Verme, and J. J. Ozoga, "Reproductive steroids in deer. III. Luteinizing hormone, estradiol and progesterone around estrus", *Biol. Reprod.*, vol. 22, pp. 576-581, 1980.
- [4] E. L. Cheatum, "The use of corpora lutea for determining ovulation incidence and variations in fertility of White-tailed deer", *Cornell Vet.*, vol. 39, no. 3, pp. 282-291, 1949.
- [5] E. D. Plotka, U. S. Seal, L. J. Verme, and J. J. Ozoga, "Reproductive Steroids in White-Tailed Deer. IV. Origin of progesterone during pregnancy" *Biol. Reprod.*, vol. 26, pp. 258-262, 1982.
- [6] F. Riveros, *Métodos de estudio de la reproducción en hembras de ungulados silvestres*. [online] Laboratorio de Biotecnología Animal. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Carillanca, 2010. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101010/101009.pdf>
- [7] A.T. Nelson, and A. Woolf, "Field laparoscopy of female white-tailed deer", *J. Wildl. Manage.*, vol. 47, no. 4, pp. 1213-1216, 1983.
- [8] R. B. Smith, and F. G. Lindzey, "Use of ultrasound for detecting pregnancy in mule deer", *J. Wildl. Manage.*, vol. 46, pp. 1089-1092, 1982.
- [9] A. Wood, R. E. Short, A. E. Darling, G. L. Dusek, R. G. Sasser, and C. A. Ruder, "Serum assays for detecting pregnancy in mule and white-tailed deer", *J. Wildl. Manage.*, vol. 50, no. 4, pp. 684-687, 1986.
- [10] R. C. Montes-Pérez, "Validación de un radioinmunoanálisis en fase sólida para medir progesterona en plasma sanguíneo", *Rev. Biomed.*, vol. 5, no. 1, pp. 23-32, 1994.
- [11] N. C. Larter, R. Rajamahendran, and K. Sivakumaran, "Immunoreactive faecal progestins as indicators of reproductive status", *Vet. Rec.*, vol. 134, no. 18, pp. 474-475, 1994.
- [12] S. R. Galen, "New math in the lab. Predictive value theory", *Diag. Med.*, vol. 2, pp. 31-39, February, 1979.

- [13] A. Ramírez, M. Urrutia, and U. Vázquez, U., "Progesterona en heces como indicador de actividad ovárica en ovejas Rambouillet", En *Memorias de XII Reunión Nacional sobre Caprinocultura*, A. Moreno-Reséndez, Ed. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro: Torreón, Coahuila, México, pp. 177-180, 1997.
- [14] B. L. Lasley, and J. F. Kirkpatrick, "Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids", *J. Zoo Wildl. Med.*, Vol. 22, no. 1, pp. 23-31, 1991.
- [15] V. G. Krepschi, B. F. Polegato, E. S. Zanetti, and J. M. B. Duarte, "Fecal progestins during pregnancy and postpartum periods of captive red brocket deer (*Mazama americana*)", *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 137, no. 1-2, pp. 62-68, 2013.
- [16] R. J. Pereira, B. F. Polegato, S. De Souza, J. A. Negrao, and J. M. Duarte, "Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites", *Theriogenology*, vol. 65, no. 2, pp. 387-399, 2006.
- [17] D. M. Brousset, F. Maldonado, R. Valdes, M. Romano, and A. Schuneman de Aluja, "Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres", *Vet. Méx.*, vol. 36, no. 3, pp. 325-337, 2005.
- [18] R. Palme, P. Fischer, H. Schildorfer, and M. Ismail, "Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via feces and urine in domestic livestock", *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 43, no. 1, pp. 43-63, 1996.
- [19] F. Schwarzenberger, K. Tomášová, D. Holečková, B. Matern, and E. Möstl, "Measurement of fecal steroids in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme immunoassays for 20-oxo-pregnanes", *Zoo Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 159-171, 1996.
- [20] L. H. Graham, K. L. Goodrowe, J. I. Raeside, and R. M. Liptrap, "Non-invasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β and progestins", *Zoo Biol.*, vol. 14, no. 3, pp. 223-237, 1995.
- [21] C. A. Kapke, P. Arcese, T. E. Ziegler, and G. R. Scheffler, "Estradiol and progesterone metabolite concentration in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) feces", *J. Zoo Wildl. Med.* vol. 30, no. 3, pp. 361-371, 1999.
- [22] W. F. Williams, "Excretion of progesterone and its metabolites in milk, urine and feces", *J. Dairy Sci.*, vol. 45, no. 12, pp. 1541-1542, 1962.
- [23] E. D. Plotka, U. S. Seal, L. J. Verme, and J. J. Ozoga, "Reproductive steroids in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*). II. Progesterone and estrogen levels in peripheral plasma during pregnancy", *Biol. Reprod.*, vol. 17, no. 1, pp. 78-83, 1977.
- [24] B. Polegato, "Determinação dos perfis de estrógenos e progestinas fecais durante o ciclo estral, gestação e período pós-parto em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em cativo", Sao Paulo, Brasil: Dissertação do título de Mestrado em Medicina Veterinária (Reprodução Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp. Campus de Jaboticabal, 2008.
- [25] B. L. Lasley, M. Toedsson, W. Bravo, and M. A. Haggerty, "Estrogen conjugate measurements to monitor ovarian activity", *Theriogenology*, vol. 31, no. 1, pp. 127-139, 1989.
- [26] C. J. Morrow, and S. L. Montfort, "Ovarian activity in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) determined by faecal steroid analysis", *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 53, no. 1-4, pp. 191-207, 1998.
- [27] S. Hamasaki, K. Yamauchi, T. Ohki, M. Murakami, Y. Takahara, Y. Takeuchi, and Y. Mori Y., "Comparison of various reproductive status in sika deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis", *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 63, no. 2, pp. 195-198, 2001.
- [28] E. D. Plotka, U. S. Seal, L. J. Verme, and J. J. Ozoga, "Reproductive steroids in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*). IV. Origin of progesterone during pregnancy", *Biol. Reprod.*, vol. 26, no. 2, pp. 258-262, 1982.

- [29] G. W. Asher, A. J. Peterson, and D. Duganzich, "Adrenal and ovarian sources of progesterone secretion in young female fallow deer, *Dama dama*", *J. Reprod. Fert.*, vol. 85, pp. 667-675, 1989.
- [30] S. L. Monfort, C. C. Schwartz, and S. K. Wasser, "Monitoring reproduction in captive moose using urinary and fecal steroid metabolites", *J. Wildl. Manage.*, vol. 7, no. 2, pp. 400-407, 1993.
- [31] . E. V. Berkeley, J. F. Kirkpatrick, N. E. Schaffer, W. M. Bryant, and W. R. Threlfall, "Serum and fecal steroid analysis of ovulation, pregnancy, and parturition in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*)", *Zoo Biol.*, Vol. 16, no. 2, pp.121-132, 1997.
- [32] R. Montes-Pérez, R. Delgado-León, and V. Pech-Martínez, "Diagnóstico temprano de gestación en vacas lecheras por radioinmunoanálisis para medir progesterona", *Agrociencia*, vol. 31, no. 2, pp. 237-240, 1997.
- [33] W. M. Knox, K. V. Miller, D. C. Collins, P. B. Bush, T. E. Kiser, and R. L. Marchinton, "Serum and urinary levels of reproductive hormones associated with the estrous cycle in White-tailed deer", *Zoo Biol.*, vol. 11, no. 2, pp. 121-131, 1992.
- [34] J. Escrig-Sos, D. Martínez-Ramos, and J. M. Miralles-Tena, "Pruebas diagnósticas: nociones básicas para su correcta interpretación y uso", *Cir. Esp.*, vol. 79, no. 5, pp. 267-273, 2006.