



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**RELACIÓN ENTRE CORTISOL E IgA EN HECES DE  
LOBO MEXICANO (*Canis lupus baileyi*) Y JAGUAR  
(*Panthera onca*) EN CAUTIVERIO**

**T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MARÍA DEL CARMEN VALLE LIRA**

**TUTOR PRINCIPAL  
FERNANDO GUAL SILL**

**COMITÉ TUTORAL  
ALFREDO SAHAGÚN RUIZ  
FERNANDO GARCÍA TAMAYO**

**México, D. F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

**A todas las personas que me apoyaron y estuvieron conmigo**

**A Tewa, Yuma, Kailuma, Tulum, Ikbal, Tikal, Yumká y Pedro**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Saúl Soto Mendoza del Laboratorio de Reproducción “MVZ Juan Téllez Girón” de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre de la Ciudad de México por su ayuda durante todo el proceso.**

**Al personal del Zoológico de Chapultepec por las facilidades otorgadas, especialmente a Carlos Olivera, Javier Ojeda, Rogelio Campos, Ángeles Pintado e Itzel Yañez por su apoyo y al personal de los Biomas Templado y Tropical por su ayuda en la toma de muestras.**

**A Héctor Castillo de la Universidad Autónoma Metropolitana y a Guadalupe Sánchez de la FMVZ por su ayuda en análisis estadístico**

## CONTENIDO

Dedicatoria .....	I
Agradecimientos .....	II
Resumen .....	III
Abstract .....	IV
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	2
2.1 Biología del jaguar .....	2
2.2 Biología del lobo mexicano .....	3
2.3 Cortisol en heces .....	4
2.4 Inmunoglobulina A en heces .....	12
2.5 Relación entre cortisol e IgA .....	20
2.6 Prueba de inmunoensayo enzimático .....	27
3. Justificación .....	28
4. Objetivos .....	29
4.1 Objetivos generales .....	29
4.2 Objetivos particulares .....	29
4.3 Hipótesis .....	30
5. Material y métodos .....	30
5.1 Individuos y su localización .....	30
5.2 Obtención y manejo de muestras .....	32
5.3 Determinación de cortisol en heces .....	33
5.3.1 Extracción de cortisol en heces .....	33
5.3.2 Validación del sistema .....	34
5.3.3 Cuantificación del cortisol fecal .....	34
5.4 Determinación de IgA en heces .....	34
5.4.1 Recuperación de IgA en heces .....	34

5.4.2 Validación del sistema .....	35
5.4.3 Cuantificación de IgA en heces .....	35
5.5 Análisis estadístico .....	36
6. Resultados .....	37
6.1 Análisis no paramétrico .....	44
6.2 Análisis paramétrico de los datos normalizados .....	46
6.3 Correlación entre los niveles de cortisol e IgA fecales .....	49
6.4 Variaciones en los niveles de IgA en las muestras expuestas al medio ambiente.....	50
7. Discusión y conclusiones .....	51
8. Anexos .....	59
8.1 Anexo I. Efectos generales de los glucocorticoides .....	59
8.2 Anexo II. Apoptosis linfocitaria .....	60
8.3 Anexo III. Cuadros estadísticos.....	64
9. Literatura citada .....	69

## RESUMEN

La medición de cortisol fecal se ha usado como una forma de medir estrés, relacionándolo con parámetros conductuales; sin embargo poco se ha hecho para relacionar de esta hormona con otro tipo de indicadores fisiológicos. La medición de IgA en heces se ha postulado como una manera de evaluar el estado inmunológico, aunque este tipo de análisis sólo se ha realizado en animales de laboratorio. A través de este trabajo se determinó la relación entre cortisol e IgA fecales en lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) y jaguar (*Panthera onca*) en el Zoológico de Chapultepec. El proceso de muestreo se llevó a cabo del 13 de Marzo al 19 de Mayo de 2006, la elección de las fechas incluyó la semana santa durante la cual la afluencia de visitantes se incrementa. Para establecer valores de referencia para IgA fecal se realizó un muestreo de cuatro semanas, previo a semana santa obteniendo en las lobas valores promedio de  $9,878 \pm 6723 \mu\text{g/g}$  heces (n=3) y  $2,485 \pm 1071 \mu\text{g/g}$  (n=5) de heces para los jaguares. Los valores de IgA en las lobas en el periodo después de semana santa fueron significativamente menores en comparación con los periodos anteriores ( $P < 0.005$ ). Los datos de cortisol no mostraron diferencias significativas en lobos y en jaguares en ninguno de los periodos. Respecto a los valores de IgA, se encontraron diferencias marginales ( $P < 0.01$ ) para una hembra de jaguar entre los periodos antes y durante semana santa. Considerando el hecho de que el efecto hormonal pudiera ser retardado, los datos de IgA de las lobas se desfasaron 3 días respecto a los valores de cortisol obteniendo un coeficiente de 0.10 para la etapa anterior a semana santa, de -0.21 para el periodo de alta afluencia y de -0.5 para el último periodo. Fue posible realizar mediciones de IgA en heces de jaguar y lobo mexicano usando equipos comerciales para IgA de cánidos y felinos domésticos, siendo posible cuantificar valores basales de IgA en estas especies en condiciones de cautiverio en el Zoológico de Chapultepec, así como detectar diferencias significativas en su patrón de secreción, las cuales pudieron relacionarse con la secreción de cortisol.

## **ABSTRACT**

Cortisol measurement in feces has been used for stress assessment, in relation with behavioral parameters; however, it has not been related to other physiological parameters. It has been suggested that immunological status can be assessed by measuring fecal IgA, but this kind of analysis has only been done in laboratory animals and dogs. The aim of this study was to determine the relationship between cortisol and IgA in feces of Mexican wolves (*Canis lupus baileyi*) and jaguars (*Panthera onca*) at Chapultepec Zoo. Sampling was done from March 13<sup>th</sup> to May 19<sup>th</sup> 2006. Dates were chosen to include Easter, when visitor's affluence increases. In order to obtain reference values for fecal IgA, a four-week-sampling period was done before Easter. Mean IgA values were  $9,878 \pm 6723$   $\mu\text{g/g}$  of feces (n=3) and  $2,485 \pm 1071$   $\mu\text{g/g}$  of feces (n=5) for wolves and jaguars, respectively. IgA values after Easter were significantly lower than those before and during Easter ( $P < 0.005$ ) for wolves. Cortisol data showed no significant differences for wolves or jaguars. Marginal differences were found for the IgA values for a female jaguar ("Tulum") between the periods before and during Easter ( $P < 0.01$ ). Considering that the hormonal effect is delayed, a time lag of three days was applied to the IgA data from the wolves in regard to the cortisol values, obtaining a 0.10 coefficient for the period before Easter, while during and after Easter coefficients were -0.21 and -0.5, respectively. It was possible to measure IgA in feces from jaguars and Mexican wolves using commercial kits for IgA from domestic canids and felines. Furthermore, it was possible to assess basal values in these species kept under captive conditions at Chapultepec Zoo, and detect significant differences in their secretion pattern which could be related to cortisol levels.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los programas de conservación requieren del trabajo interdisciplinario para ser realmente efectivos. En este sentido, la medicina veterinaria en el área de la fauna silvestre, ha dejado de ser un área confinada al diagnóstico y tratamiento de animales silvestres en cautiverio convirtiéndose en una herramienta importante para monitorear y evaluar, no sólo el estado de salud de un individuo o población en particular, sino de todo un ecosistema.

Los grandes carnívoros, al estar en la cima de la cadena trófica, son un buen indicador del estado en que se encuentra su hábitat, por lo cual podemos inferir que si estos carnívoros presentan problemas, también los tiene su propio ecosistema.

El estudio médico de la fauna silvestre tradicionalmente requiere de la captura de diferentes individuos, lo cual conlleva numerosos riesgos e inconvenientes<sup>(¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)</sup>. Afortunadamente nuevas técnicas de laboratorio nos permiten realizar estudios por métodos no invasivos que carecen de una retroalimentación negativa, trabajando principalmente con muestras de heces. Estos trabajos se llevan a cabo inicialmente bajo condiciones controladas para ser aplicadas posteriormente en vida libre<sup>(¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)</sup>.

Con el fin de conocer con más certeza el estado de salud de individuos o poblaciones es necesaria la obtención en conjunto de datos fisiológicos y epidemiológicos.

Desde hace algún tiempo se ha utilizado la medición de cortisol en heces como una forma no invasiva de medir estrés<sup>(iError! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)</sup>. Algunos de los estudios han relacionado los niveles de cortisol con parámetros conductuales<sup>(iError! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)</sup>, sin embargo poco se ha hecho para relacionar los niveles de esta hormona con otro tipo de indicadores fisiológicos, como aquellos relacionados con el sistema inmune.

La medición de IgA en heces se ha postulado como un parámetro importante para evaluar el estado inmunológico de un animal, aunque este tipo de análisis sólo se ha utilizado en humanos, animales de laboratorio y perros<sup>(iError! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)</sup>.

Tampoco se han realizado las evaluaciones necesarias para traspolar estas mediciones en animales en vida libre, donde las muestras de heces pueden pasar algún tiempo expuestas a diferentes condiciones climáticas que degradan su contenido proteico. En los trabajos de campo no siempre se cuenta con las facilidades para procesar rápidamente las muestras ni para recolectar muestras frescas, además en ocasiones las expediciones tardan varios días o incluso semanas<sup>(iError! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.)</sup>.

En este trabajo se propone establecer valores de referencia para la determinación de IgA fecal en lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) y jaguar

(*Panthera onca*) en cautiverio en el Zoológico de Chapultepec y detectar variaciones en su secreción; así como determinar la relación entre cortisol e IgA fecales en lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) y jaguar (*Panthera onca*) en cautiverio. Por otro lado se pretende evaluar los cambios en la determinación de IgA en muestras de heces por efectos del ambiente y el tiempo en dichas especies, con el fin de establecer si estos factores tienen una influencia importante al momento de trabajar con animales en vida libre.

## **2. ANTECEDENTES**

### ***2.1 Biología del Jaguar***

El jaguar es el felino más grande de América y el menos estudiado, a pesar de encontrarse en peligro de extinción<sup>(60)</sup>. Los ejemplares adultos de jaguar pueden medir de 1.5 a 2.4 m de longitud total y su peso puede variar

entre 31 y 158 Kg. Habita en bosques tropicales y subtropicales, pantanos y sabanas. Se localiza desde ambas costas de México, a través de Centroamérica y hasta el norte de Argentina. Se ha registrado de países como Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guayana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam y Venezuela. Hasta el siglo pasado, estuvo presente en el extremo sur de los Estados Unidos de América (California, Arizona, Nuevo México y Texas). En zonas tropicales se aparea durante todo el año, pero en zonas más templadas sólo se reproduce durante la primavera. Su gestación dura de 93 a 113 días, los cachorros permanecen 2 años junto a la madre<sup>(7, 72)</sup>.

Respecto a su estatus como especie en peligro de extinción, además de la protección de la CITES en el apéndice I, la ESA de los Estados Unidos de Norteamérica considera al jaguar en peligro<sup>(2, 72)</sup>, mientras que en México la NOM-059 ECOL 1994 considera al jaguar como especie en peligro de extinción<sup>(59)</sup>.

## ***2.2 Biología del lobo mexicano***

*Canis lupus baileyi* es una subespecie del lobo gris que habitaba bosque húmedos y templados principalmente al norte de México y sur de Estados Unidos. La época reproductiva ocurre de enero a abril, siendo febrero el mes más importante. Sus núcleos sociales son más pequeños que en otras especies de lobos, conformados por una pareja reproductora y sus crías, las cuales abandonan la manada a los pocos años de edad<sup>(63)</sup>.

El lobo mexicano desapareció de su hábitat natural debido a la caza exhaustiva por considerársele una amenaza para la ganadería. En 1970 se cazó el último lobo en vida libre en el estado de Texas. A finales de los años 70 se estableció el "Plan de preservación de especies" por parte de la

Asociación de Zoológicos de América y la oficina de United States Fish and Wildlife Service. En 1982 se realizó un convenio México – Estados Unidos que dio origen al Mexican Wolf Recovery Team iniciando el programa de reproducción *ex situ* con el propósito a largo plazo de reintroducir la subespecie en zonas aptas<sup>(63)</sup>.

La NOM-059 ECOL 1994 considera al lobo mexicano como especie probablemente extinta en el medio silvestre y se ha declarado como la “necesidad de más alta prioridad para la conservación de lobos en todo el mundo”<sup>(59, 63)</sup>.

### ***2.3 Cortisol en heces***

El estrés se refiere a cambios en un organismo ante una amenaza, real o solo percibida, que activan los mecanismos de enfrentamiento a través de procesos neuroendócrinos<sup>(29)</sup>. Esta respuesta para enfrentar un reto está subordinada por un umbral de detección para dicho reto, así como por la capacidad de respuesta que varía dependiendo de la intensidad y duración de la amenaza<sup>(29)</sup>.

Ante un estímulo estresor agudo el sistema nervioso simpático activa al eje simpático – médula adrenal (SMA) que estimula a la médula adrenal que en respuesta secreta catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) en cuestión de segundos<sup>(12, 24, 29, 65, 74, 91)</sup>.

Después de la descarga adrenérgica inicial, se activa la secreción de glucocorticoides (GCs), la cual se regula a nivel hipotalámico, principalmente en el núcleo paraventricular, donde se produce y secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH por sus siglas en ingles) minutos después del estímulo estresor inicial. El núcleo paraventricular se conecta con vías nerviosas de los núcleos amigdaloides, los cuales se relacionan con estados de temor y ansiedad. La CRH viaja a la hipófisis a través de un sistema porta,

ahí estimula la producción y liberación de péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC), como la hormona adrenocorticotropa (ACTH por sus siglas en inglés), encefalinas y endorfinas<sup>(4, 12, 24, 29, 32, 57, 65, 73, 74, 78, 91)</sup>.

Los cambios en la actividad del eje HHA se establecen a través de mediciones de cortisol, mientras que la actividad cardiovascular es usada para determinar la actividad del eje SAM<sup>(4, 12, 32, 65)</sup>.

La ACTH es un polipéptido de 39 aminoácidos, se sintetiza a partir de la POMC, la cual es hidrolizada a ACTH y  $\beta$ -endorfina. La ACTH estimula la secreción y producción de GCs principalmente en la zona fasciculata y en menor grado en la zona reticular de la corteza adrenal creando el llamado eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). La ACTH no solo aumenta la secreción de GCs, también incrementa la sensibilidad de la glándula adrenal aumentando su respuesta. La reducción en los niveles de cortisol sérico estimula la secreción de ACTH<sup>(4, 12, 24, 32, 57, 65, 73, 78)</sup>.

El cortisol se sintetiza a partir del colesterol, el cual se almacena en gránulos intracelulares, la hidrolasa de éster colesterol lo libera de los gránulos y se transporta a la mitocondria donde se convierte en pregnolona por acción de la desmolasa de colesterol por escisión de la cadena lateral. La pregnolona se transporta al retículo endoplásmico liso donde se deshidrogena a progesterona, la cual se hidroxila a 11-desoxicortisol; este se transporta de nuevo a la mitocondria donde la 11- $\beta$ hidroxilasa lo transforma en cortisol<sup>(12, 24)</sup>.

En la circulación sanguínea el cortisol se encuentra de manera libre o unido a proteínas transportadoras como la transcortina y en menor grado a la albúmina; después es metabolizado en el hígado de manera irreversible a hidrocortisol y luego a tetrahidrocortisol, el cual se conjuga con ácido glucurónico aumentando su hidrosolubilidad y se elimina a través de la bilis u orina. Las hormonas excretadas por la bilis no son totalmente eliminadas de

inmediato, una pequeña parte entra la circulación enterohepática que retarda su eliminación. La parte que se excreta por heces sufre un segundo metabolismo llevado a cabo por las bacterias del intestino que lo desconjugan y oxidan, este proceso es el responsable de que los metabolitos que se encuentran en heces estén principalmente libres, mientras que los eliminados en la orina aún están conjugados<sup>(4, 12, 24, 32, 57, 65, 73, 78)</sup>.

La secreción de GCs se regula por una retroalimentación negativa del cortisol y corticotropina tanto a nivel hipotalámico como al hipofisario<sup>(12, 24)</sup>. En situaciones estresantes, la respuesta de los GCs es proporcional a la gravedad del estrés<sup>(12)</sup>; por otro lado, la velocidad de desactivación de GCs en el hígado disminuye en estas situaciones, lo que aumenta el tiempo que permanece en la circulación<sup>(24)</sup>.

Los glucocorticoides también pueden ser secretados ante situaciones que normalmente no se consideran como estresantes como pueden ser el apareamiento y la caza<sup>(57)</sup>, e incluso se ha encontrado una correlación positiva entre el cuidado maternal y los niveles de cortisol en humanos<sup>(29)</sup>.

Aunque los efectos de los GCs parecen contradictorios a diferentes dosis, en los últimos años se ha encontrado que estos dependen de las concentraciones y el tipo de receptores. Cuando los niveles son bajos, la hormona se une a los receptores de mineralocorticoides (RM o Tipo I) con efectos "permisivos proactivos" para los mecanismos de defensa, mientras que las actividades "supresivas reactivas" se dan a altas concentraciones de corticoides o inducidos por estrés, al activar los receptores de glucocorticoides (RG o Tipo II)<sup>(29, 74)</sup>, debido a que los RM tienen una afinidad diez veces mayor para los GCs que los RG<sup>(74)</sup>. Las manifestaciones de los efectos de los GCs después de unirse a su receptor tardan en presentarse de unos minutos a varios días, y el efecto de la hormona tarda en decaer desde varias horas hasta semanas<sup>(74)</sup>.

Existen una gran cantidad de moduladores de la actividad de los GC, entre los que se encuentran el tipo de GC, concentración, ambiente extracelular, contexto intracelular entre otros<sup>(77)</sup>. Los efectos biológicos de los GCs se encuentran mediados por el receptor de GCs intracelular (RG o RM), un miembro de la familia de los receptores nucleares de hormonas esteroides que funcionan como factores de transcripción activados por su ligando. El receptor se encuentra principalmente en el citoplasma formando heterocomplejos, una vez que se activa se transforma y se disocia creando un monómero que es capaz de unirse a las estructuras nucleares. El RG puede modular la expresión genética a través de dos caminos distintos: uno al unirse como homodímero a secuencias específicas de ADN, llamadas elementos responsivos a GCs (ERG); y la segunda a través de una ruta independiente de ERG, en la cual el RG interactúa como un monómero con otros factores de transcripción unidos al ADN<sup>(45, 74, 77)</sup>.

Muchas veces los receptores activados no necesitan unirse a los RGs, ni siquiera al ADN, en estos casos se usa un mecanismo como un "diálogo" a través de un factor restrictivo de transcripción. Entre los más conocidos están las proteínas activadoras 1 (AP-1), cJun y cFos, el factor nuclear  $\kappa$ -B (NF $\kappa$ -B) y el factor de transcripción Oct-1. Las interacciones funcionales entre estos factores son recíprocas, los RGs reprimen la actividad del factor y el factor reprime la actividad de los RGs. Además del uso de diferentes receptores, los efectos de los GCs se encuentran mediados por la acción de la enzima 11 $\beta$ -HSD2, que inactiva cortisol y corticosterona si se encuentra en grandes cantidades en la célula<sup>(74)</sup>.

Algunos de los efectos generales de los GCs son: gluconeogénesis, midriasis, broncodilatación, aumento en la tensión arterial, vasoconstricción cutánea, vasodilatación muscular, inhibición en la liberación de esteroides sexuales, neutrofilia, linfopenia, apoptosis de tejido linfóide, entre otros<sup>(12, 65)</sup>.

Para la mayor parte de los efectos de los GCs no se ha caracterizado su mecanismo de acción a nivel molecular; además se debe considerar que muchas de las acciones sobre la transcripción de un gen tal vez no sean una respuesta primaria, sino secundaria a la activación o inhibición de otros genes dentro de la misma célula<sup>(74)</sup>.

Algunos de los efectos generales de los GCs se encuentran en el Anexo I.

Considerando que la vida media del cortisol en sangre es de aproximadamente 80 a 120 minutos y que estas hormonas se afectan por el ritmo circadiano, las mediciones sanguíneas resultan poco convenientes en cuanto al manejo de animales silvestres<sup>(4, 12, 24, 32, 57, 60, 65, 73, 78)</sup>. Los niveles de cortisol en heces reflejan una medida integral de los niveles en sangre y no solo en un momento en particular, lo cual da una estimación más acertada del estrés crónico que la obtenida a través de muestras de sangre<sup>(54, 79, 92)</sup>. La medición de hormonas fecales es útil tanto a nivel de población como a nivel individual, para determinar el bienestar de cada individuo o de una población en particular<sup>(55, 79)</sup>.

Las vías de excreción de las hormonas esteroidales varían considerablemente entre especies<sup>(78)</sup>. Los gatos domésticos excretan el cortisol principalmente en heces (82%), mientras que los perros eliminan una cantidad menor por esta vía (23%)<sup>(76)</sup>. Las diferencias entre perros y gatos pueden deberse a diferencias de metabolismo o a la flora intestinal; las bacterias y sus enzimas también juegan un papel importante, ya que son capaces de metabolizar los esteroides fecales<sup>(42)</sup>.

En un estudio en el cual se administró cortisol radiomarcado a cánidos (*Canis familiaris*) y felinos domésticos (*Felis catus*) se encontró el pico de concentración en heces a las  $22 \pm 6$  h en gatos y a las  $24 \pm 4$  h en perros. Otros picos de menor intensidad observados posteriormente se explicaron por

la recirculación enterohepática del cortisol<sup>(28, 76)</sup>. Otro estudio reporta que el tiempo transcurrido entre la administración de ACTH y el pico de cortisol en heces es de 16 a 20 h en lobos, por lo cual los eventos estresantes se relacionan con los niveles de cortisol fecal del día siguiente<sup>(73)</sup>.

Una de las ventajas de la medición de cortisol en heces de gatos en lugar de orina, es que varias especies orinan por aspersion limitando las oportunidades de recolectar muestras, además de que en animales en vida libre las muestras de orina resultan muy difíciles de obtener, por lo que las heces son una opción más práctica<sup>(28, 78)</sup>.

Algunas de las principales fuentes de error en la medición de esteroides fecales ocurren durante la recolección y el almacenamiento de las muestras previo al inmunoanálisis<sup>(3)</sup>. Por ejemplo en algunos estudios se ha determinado que los estrógenos y la progesterona no se encuentran distribuidos homogéneamente en las heces de guepardo (*Acinonyx jubatus*), pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*), leopardo de las nieves (*Panthera uncia*) y venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), así como en especies domésticas como el caballo y el cerdo<sup>(54, 78)</sup>. Otras fuentes de variación pueden ser la hora en que se toma la muestra, la edad y el estado fisiológico del individuo. El procesamiento de las muestras también tiene un efecto en la evaluación final de las hormonas; en las muestras homogenizadas se han detectado concentraciones significativamente mayores (21.82%) que cuando no se lleva a cabo este procedimiento<sup>(3)</sup>. Aún no se conocen con exactitud todos los factores que influyen en la determinación de GCs fecales; tampoco hay consenso en lo referente a los procedimientos o precauciones necesarias para el almacenamiento de las muestras<sup>(48)</sup>.

La mayoría de los estudios que han validado análisis esteroidales han usado etanol al 70%, congelación y/o liofilización como medios de conservación<sup>(28, 48, 87)</sup>. Algunos autores han probado el uso de etanol para

estabilizar estrógenos y progesterona en heces por periodos de 21 h a temperatura ambiente, incluso lo recomiendan para periodos mucho más largos<sup>(42)</sup>. Terio (2002) menciona que no hay cambios significativos en heces de guepardo después de 14 días usando este mismo método. Otras técnicas de almacenamiento mencionadas en la literatura son secado en horno, extracción en campo<sup>(42)</sup>, deshidratación por calor, congelación en hielo húmedo, seco y nitrógeno líquido<sup>(87)</sup>. En otro estudio realizado con babuinos la extracción con metanol alcanza niveles de aproximadamente 85%<sup>(48)</sup>.

Se ha reportado un aumento en la concentración de GCs en heces de guepardo que fueron expuestas a tratamientos deshidratantes<sup>(54)</sup>. Por otro lado los métodos de deshidratación han resultado en variaciones diversas (incrementos y decrementos) de las concentraciones de esteroides fecales, excepto los andrógenos<sup>(87)</sup>. Schwarzenberger (1996) concluye que la desecación de las muestras fecales no es necesaria para la evaluación de hormonas esteroidales, además de que los cambios en las dietas no afectan este tipo de mediciones.

El tiempo que transcurre entre la defecación y el análisis es una importante fuente de variación, así como las condiciones ambientales en las cuales permanece la muestra<sup>(84, 92)</sup>. En un estudio en el cual se simulaban las condiciones ambientales de manera controlada en laboratorio se encontró que el tratamiento en donde se incluye la simulación de lluvia tiene efectos más significativos que las variaciones de temperatura ya que la concentración casi se duplicó después de 7 días, mientras que la temperatura tuvo un efecto menos significativo. Se determinó que los principales cambios en la concentración de GCs ocurren durante las primeras 24 h, la variación es menor en los siguientes días<sup>(92)</sup>.

Mediciones de cortisol fecal ya se han hecho previamente en una gran variedad de animales silvestres. Pifarré (2004) calculó el promedio de cortisol

fecal en lobos mexicanos (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio por medio de la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), el cual tuvo una media  $202.51 \pm 9.02$  en machos y  $214.47 \pm 14.98$  hembras, sin encontrar diferencias significativas entre albergues o sexos. En este estudio se informa que los niveles de cortisol son significativamente mayores en los días en que la afluencia de público a los zoológicos se incrementa. Ojeda (2002) estudió las variaciones en niveles de cortisol fecal en jaguares como respuesta a manipulaciones ambientales; en sus resultados las respuestas de los individuos al enriquecimiento ambiental fueron muy variables, algunos disminuyeron o aumentaron sus niveles de cortisol. Por otro lado Hernández (2006) en un estudio realizado en cánidos (lobo mexicano y coyotes) y felinos (león africano y ocelote) reporta que las hembras podrían tener mayor dificultad para afrontar situaciones estresantes debido a que después del estímulo los niveles de cortisol en heces tardan más en regresar a niveles basales.

Los niveles hormonales pueden no ser importantes en la producción de resultados significativos y adaptativos. Elevaciones relativas o inhibiciones, resultado de experiencias previas, pueden ajustar centros neurales específicos que responden específicamente al contexto ambiental en que se encuentra el individuo<sup>(29)</sup>. Los errores de interpretación pueden prevenirse hasta cierto grado cuando se miden simultáneamente varios parámetros fisiológicos, endocrinológicos y/o etológicos<sup>(4, 28, 76)</sup>.

#### ***2.4 Inmunoglobulina A en heces***

Básicamente existen dos formas de evaluar el estado del sistema inmune:

a) Enumerativa – esta incluye conteos celulares en sangre (linfocitos T, B, células NK o natural killer), lo cual es importante ya que cierto número en cada tipo de célula es necesario para responder adecuadamente ante un desafío antigénico. El problema en este tipo de evaluaciones es que la interpretación de las pruebas se dificulta pues los conteos celulares no se relacionan necesariamente con la funcionalidad del sistema inmune, ya que las variaciones en la cantidad de células pueden explicarse por una variedad de mecanismos como la migración celular hacia linfonodos o bazo<sup>(6)</sup>.

Además de células pueden hacerse conteos de inmunoglobulinas, ya sea en la circulación periférica o en secreciones mucosas (saliva, lágrima, secreciones intestinales). Esto puede hacerse de manera general para un cierto tipo de inmunoglobulina en total o midiendo la cantidad de anticuerpos contra un antígeno específico<sup>(6)</sup>.

b) Funcional – para este fin se utilizan, entre otros, dos tipos de ensayos, la respuesta proliferativa de linfocitos y la actividad citotóxica de las células NK contra células alteradas o dañadas. En el primer caso los linfocitos se estimulan incubándolos con sustancias mitogénicas inespecíficas que estimulan la proliferación tanto de linfocitos T como B, como la fitohemaglutinina. En el segundo caso la actividad citotóxica de las células NK se estima incubándolas con células neoplásicas, determinando la relación entre células NK y las células neoplásicas eliminadas al final del ensayo<sup>(6)</sup>.

Las inmunoglobulinas son proteínas solubles secretadas por células plasmáticas; esta característica facilita su estudio en gran medida. Las inmunoglobulinas están compuestas por cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras acomodadas en forma de “Y” unidas

por puentes disulfuro con dos sitios idénticos de unión al antígeno. La clase y la función efectora están dadas por las cadenas pesadas<sup>(37, 83)</sup>.

Se han identificado cinco tipos de inmunoglobulinas en humanos y roedores: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las que se encuentran en grandes concentraciones en sangre son IgG e IgM. A pesar de que también se encuentra en sangre, IgA es la inmunoglobulina predominante en las secreciones corporales (saliva, leche, fluido intestinal, lágrimas)<sup>(37, 83, 88)</sup>. Las concentraciones de IgE en sangre son normalmente bajas en relación con IgG, pero se elevan ante procesos alérgicos y parasitarios<sup>(66, 88)</sup>; esta inmunoglobulina es muy sensible al calor moderado, igual que la IgD, la cual además es muy susceptible a la proteólisis<sup>(66, 88)</sup>. Las inmunoglobulinas que son cuantificables en heces son IgA, IgM e IgG sin reactividad cruzada, sin embargo tanto IgM como IgG son más fácilmente degradadas que IgA<sup>(9, 40, 88)</sup>.

El intestino es la superficie mucosa más grande, además de estar expuesta a la carga más fuerte de antígenos en el organismo. Cada día las células plasmáticas del intestino producen más anticuerpos que aquellas presentes en el resto de los órganos linfoides<sup>(52, 68)</sup>; en humanos se ha calculado una producción de 3 – 5 g/ml de IgA secretora (IgAs) por día en el fluido intestinal<sup>(40, 52)</sup>, o bien de 166 mg/kg/día, con una vida media de 3 a 6 días<sup>(53)</sup>.

La presencia de inmunoglobulinas en heces es una combinación de secreciones del tracto gastrointestinal y el hígado (bilis) por lo cual es posible que representen un buen indicador de los niveles de inmunoglobulinas en esta mucosa<sup>(62)</sup>. Por otro lado, IgG e IgM son muy inestables en relación a la IgA, esto dificulta su estudio y aplicaciones clínicas<sup>(37, 88)</sup>.

La IgA es producida principalmente por las células plasmáticas localizadas en la lamina propia (tejido linfóide asociado a mucosas); una

pequeña parte se difunde hacia el torrente sanguíneo, mientras que la mayor parte pasa a través de las células epiteliales hacia las secreciones externas como dímero (unido por una cadena J), aunada a un componente secretor que la protege de la acción de las proteasas que se encuentran en el lumen intestinal<sup>(9, 13, 37, 41, 83, 88)</sup>. El componente secretor es el receptor de inmunoglobulinas poliméricas en las células epiteliales, pertenece a la familia de las inmunoglobulinas; al momento de ser liberada, la IgA no se desprende de su receptor por lo que quedan unidas ambas proteínas<sup>(9, 41, 83)</sup>. A diferencia de la IgA y la cadena J que se sintetizan en los linfocitos, el componente secretor se produce en las células epiteliales; otra de sus funciones es estabilizar la estructura de la IgA y aumentar su resistencia a la proteólisis<sup>(41, 83)</sup>.

La IgA no activa el complemento de manera directa y su efecto opsonizante es muy reducido debido a la interferencia causada por el componente secretor, tiene la capacidad de aglutinar partículas y neutralizar virus; su principal modo de acción es impedir la adherencia de los antígenos a las superficies mucosas; otra cualidad de la IgA es que es la única inmunoglobulina capaz de actuar de manera intracelular uniéndose a proteínas virales recién sintetizadas interrumpiendo la replicación viral, después los complejos inmunes son eliminados por células fagocíticas, absorbidos por el sistema vascular o se transportan a través del epitelio, de la misma manera en que se excreta la IgA<sup>(37, 40, 68, 83, 88)</sup>. Debido a que es una molécula hidrofílica, cargada negativamente, hace que los elementos a los que se une sean rechazados por la mucosa<sup>(83)</sup>. Su mecanismo de acción por exclusión inmune es principalmente no inflamatorio con el fin de preservar la integridad de la mucosa<sup>(9, 83)</sup>.

Otra de las funciones de la IgA es la excreción de antígenos transportándolos directamente a través de las células epiteliales, usando el

mismo mecanismo que transporta a las globulinas libres hacia la luz intestinal, evitando con esto enfermedades causadas por la acumulación de complejos inmunes<sup>(68)</sup>.

Aunque la IgA tiene funciones comunes en las diferentes especies, existen variaciones en el número de genes, alotipos y formas moleculares, sin embargo, estas solo se han caracterizado en humanos y animales de laboratorio<sup>(83)</sup>. Las relaciones filogenéticas no garantizan homología en este tipo de proteínas, por lo que se deben de hacer pruebas para determinar las posibles reacciones cruzadas entre distintas especies<sup>(83)</sup>. La mayoría de los estudios se han hecho han sido en roedores y humanos<sup>(31, 41, 85)</sup>; sin embargo se ha visto que el sistema inmune de perros y gatos tiene muchas semejanzas con aquellos de humanos y cerdos<sup>(19, 85)</sup>.

El sistema inmune de los perros domésticos (*Canis familiaris*) ha sido estudiado principalmente para ser usado como modelo de inmunodeficiencias y casos de intoxicación<sup>(19)</sup>. En perros se han caracterizado 5 tipos de inmunoglobulinas, IgA, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2ab</sub> e IgG<sub>2c</sub>. La IgA tiene un peso molecular de 310,000 considerada como un dímero, aparentemente en esta especie no se secreta al intestino junto con el componente secretor<sup>(90)</sup>. Sólo se ha descrito un gen C $\alpha$  en perros, con cuatro formas de alelos que difieren de la longitud de la región de la bisagra; la distribución de los alelos parece ser dependiente de la raza, dado que las razas puras presentan una sola forma de alelo<sup>(83)</sup>. En el perro, al igual que en humanos, cerdos y borregos, la IgA que se secreta en la bilis es producida localmente en su mayoría, y no es proviene del suero<sup>(83)</sup>.

Por otro lado, una porción de los linfocitos intraepiteliales de los gatos expresan IgM, pero aún no se aclara si esto representa alguna diferencia significativa en comparación con otras especies<sup>(85)</sup>. En este mismo sentido se reporta que en el sistema inmune felino, mientras que en el intestino delgado

la principal inmunoglobulina es IgA, en colon se observa una mayor cantidad de células productoras de IgG que de IgA o IgM<sup>(85)</sup>. Se ha reportado que gatos con gingivitis tienen altas concentraciones de IgG e IgM en saliva, pero concentraciones de IgA más bajas que la saliva de gatos sanos; casos similares se han reportado en humanos, los cuales se han explicado como resultado de una disminución de la producción de IgA junto con una baja en el flujo de saliva<sup>(85)</sup>.

Existe una comunicación inmunológica entre las mucosas lo que las convierte en un sistema inmunosecretor independiente, por lo que las especificidades de inmunoglobulinas en una mucosa pueden ser consideradas como representativas de otras secreciones<sup>(27, 40)</sup>; en este contexto German (1998) encontró cierto grado de correlación entre la secreción de inmunoglobulinas en saliva y lágrima. Sin embargo la tasa de secreción de una globulina específica sí presenta variaciones, en estudios recientes no se ha encontrado correlación entre las concentraciones de IgA en saliva, suero y duodeno, por lo que se sugiere que su secreción, en este aspecto, es independiente siendo mayor la secreción en la región expuesta al antígeno que en otras zonas <sup>(40, 66)</sup>.

En el suero humano, las concentraciones de IgA son una quinta parte de las de IgG. A diferencia de la IgA secretora, en sangre esta globulina es monomérica, producida principalmente en médula ósea <sup>(41)</sup>. Las concentraciones de IgA en plasma no son indicativas del estado de salud de un individuo o de la producción local en mucosas, de hecho se pueden encontrar niveles bajos de IgA en plasma de perros clínicamente sanos y sin una disminución significativa en los niveles de IgA en mucosas, incluso se ha llegado a la conclusión de que, en el caso particular de la parvovirus canina, la inmunidad local en el intestino es más importante que la sistémica<sup>(25, 27, 41, 85)</sup>. La medición de IgA en saliva se puede utilizar como forma de evaluación

del sistema inmune, ya que no sólo se evalúa la función de los linfocitos B, sino que indirectamente también se evalúan a los linfocitos T, pues estos últimos son necesarios para la activación y cambios de clase en los linfocitos B <sup>(40, 53)</sup>. Las heces contienen altas concentraciones de IgA, sin embargo, dadas las condiciones ambientales en la luz intestinal, son más inestables que en otras mucosas, con esto se podría explicar la variación encontrada entre diferentes muestras, así como las variaciones dentro de muestras de ratas <sup>(31)</sup>.

La densidad en la producción de IgA es reducida en animales mantenidos en ambientes libres de patógenos; estos animales, al ser expuestos a algún antígeno bacteriano responden con una rápida infiltración de células plasmáticas en el intestino <sup>(52)</sup>. En este sentido se ha visto que en felinos la cantidad de agregados linfoides puede ser un reflejo de la carga bacteriana, siendo mayores en áreas donde las heces permanecen por más tiempo; sin embargo, no se encuentra la misma distribución de perros y cerdos <sup>(85)</sup>.

Peters *et al.* (2004), encontraron una correlación significativa entre las concentraciones de IgA en heces y las encontradas en los sobrenadantes de cultivos duodenales, por lo que las mediciones fecales son un buen indicador de los niveles de IgA en el interior del intestino.

Las concentraciones de IgA pueden dar información acerca del estado inmunológico del individuo<sup>(30, 66)</sup>, pero debido a la existencia de diferencias intraindividuales en la secreción de IgA salival y fecal, se recomienda tomar muestras repetidas del mismo individuo con la finalidad que poder determinar con mayor exactitud el estado inmunológico<sup>(25)</sup>. En un estudio en el cual se trató de determinar la utilidad de la medición de inmunoglobulinas en heces de perros se llegó a la conclusión de que esta utilidad es muy limitada, sin

embargo, en este caso sólo se tomó una muestra por cada individuo<sup>(62)</sup>, lo cual puede llevar a conclusiones erróneas.

Se ha reportado que los niveles de IgA son mayores en las lágrimas y plasma de perros viejos, pero aún no se han hecho estudios para probar si hay un decremento en la especificidad de estas inmunoglobulinas como ocurre en humanos<sup>(8, 25, 27)</sup>. En gatos se reporta una reducción en los valores absolutos de linfocitos T, B y células NK en gatos viejos, mientras que las concentraciones séricas de IgA e IgM se incrementaron<sup>(11)</sup>. En un estudio realizado en saliva de humanos se encontró que tanto las concentraciones de IgA como el flujo de saliva eran significativamente menores en personas ancianas que en jóvenes. En este mismo estudio se reporta que las concentraciones de IgA en saliva son independientes de la concentración total de proteínas, pero sí guardan relación con el flujo de saliva<sup>(53)</sup>. Aún no se ha podido establecer si es que existen diferencias entre machos y hembras<sup>(27)</sup>.

Peters (2004) reporta que las concentraciones de inmunoglobulinas en heces de perro no se afectan si se almacenan congeladas a -20° C; en este mismo artículo notifica la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones de IgA en heces de perros de diferentes razas.

Las inmunodeficiencias primarias o congénitas son defectos genéticos que afectan uno o más componentes del sistema inmune<sup>(86)</sup>. Deficiencias específicas en IgA pueden estar asociadas a infecciones o enfermedades inmunomediadas. Las inmunodeficiencias severas no permiten que los pacientes lleguen a edades adultas, ya que además de la predisposición a infecciones, también se asocian con autoinmunidad, alergias y crecimiento celular incontrolado<sup>(21, 67, 86)</sup>. En los animales domésticos como el perro, en que la selección ha resultado en decrementos en la diversidad genética, este tipo de enfermedades congénitas se presentan con mayor frecuencia<sup>(67)</sup>.

Estas características hacen que en animales salvajes sea difícil encontrar pacientes con inmunodeficiencias severas, la selección natural evita la supervivencia de estos individuos, sin embargo, los animales en cautiverio y/o en peligro de extinción sufren de importantes descensos en su variabilidad genética.

Algunas inmunodeficiencias sí son compatibles con la vida, permitiendo a los individuos llegar a edades adultas con una buena calidad de vida, especialmente aquellas que afectan exclusivamente la inmunidad humoral<sup>(30, 41, 67, 86)</sup>.

En humanos la deficiencia selectiva de IgA (DSIgA) es una de las inmunodeficiencias más comunes afectando aproximadamente a 1/600 a 1/700 personas; puede estar asociada con enfermedades autoinmunes, infecciones recurrentes y atopia, sin embargo no todos los casos son sintomáticos, muchos de los pacientes humanos son asintomáticos, pero otros sufren de infecciones respiratorias y digestivas recurrentes<sup>(18, 30, 41, 86)</sup>. En estos pacientes la inmunidad celular funciona de manera normal, mientras que la producción de IgA se encuentra notoriamente disminuida o totalmente ausente<sup>(18, 30, 86)</sup>. Se ha demostrado la existencia de un factor hereditario en 20 % de los casos, aparentemente con un patrón de transmisión dominante autosomal, sin embargo aún no se ha caracterizado completamente<sup>(18, 30, 86)</sup>. Algunos estudios sugieren que los hombres heredan la enfermedad a sus hijos con una menor frecuencia que las mujeres<sup>(30)</sup>; sin embargo, el hecho de haber encontrado a gemelos homocigóticos, de los cuales solo uno presentaba la enfermedad, sugiere un posible origen externo, ya sea ambiental, infeccioso o de otro tipo<sup>(30)</sup>. Esta inmunodeficiencia se origina en un bloqueo en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgA, pero la caracterización molecular se desconoce<sup>(86)</sup>.

Específicamente, la DSIgA se asocia con infecciones por *Giardia lamblia*, *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium parvum*; en el caso de *G. lamblia* la IgA se une a los trofozoitos afectando su movilidad y capacidad de adhesión. Aunque la inmunidad celular juega un papel central contra *T. gondii* y *C. parvum*, se ha visto que la inmunidad humoral ayuda a disminuir los niveles de infección. Aproximadamente 20% de los pacientes con DSIgA también presentan deficiencias en la producción de IgG, lo que los hace especialmente propensos a infecciones por microorganismos piógenos. Las discrepancias entre la presencia de infecciones puede deberse al hecho de que en algunos casos la ausencia de IgA no es total<sup>(86)</sup>.

Rivas (1995) informa de un síndrome de inmunodeficiencia en una familia de perros Shar-pei, en los que se encontraron bajos niveles de inmunoglobulinas M y A en suero, además de una baja respuesta proliferativa de células mononucleares *in vitro*. Perros con deficiencias en la producción de IgA son susceptibles a enfermedad inflamatoria del intestino o algún sobrecrecimiento bacteriano, parasitario o micótico<sup>(18, 21, 25, 30, 41, 86)</sup>.

También se ha reportado esta enfermedad en pollos, pero no se tiene aún un modelo animal en roedores que asemeje a la enfermedad en humanos. En cualquiera de los casos no se han esclarecido las bases moleculares de esta inmunodeficiencia<sup>(30)</sup>. Es posible que la DSIgA evolucione hacia una inmunodeficiencia variable común, en la cual no sólo se encuentran disminuidos los niveles de IgA, también se afectan los niveles de IgG, probablemente por malfuncionamiento de los procesos de cambios de clase en los linfocitos B<sup>(30)</sup>.

### ***2.5 Relación entre cortisol e IgA***

A pesar de que los efectos inmunodepresores del cortisol son conocidos desde hace muchos años aún no se conoce con exactitud su

mecanismo de acción<sup>(1, 4, 5, 14, 15, 12, 34, 74, 77, 80)</sup>. Se ha llegado al consenso de que el estrés agudo (niveles basales que estimulan RM) tiene efectos positivos en el sistema inmune, mientras que el estrés crónico (niveles altos que estimulan RG) tiene efectos depresores sobre este sistema<sup>(16, 74, 80)</sup>.

Algunos autores han postulado que este efecto inmunodepresor sirve para controlar al sistema inmune evitando reacciones exacerbadas que pudieran llegar a ser patológicas<sup>(1, 74)</sup>. En los últimos años se han hecho investigaciones en las cuales se ha encontrado que existe una comunicación bidireccional entre los sistemas neuroendocrino e inmunológico<sup>(1, 15, 74)</sup>. En estos se propone que las citocinas (específicamente IFN $\gamma$ , FNT $\alpha$  y las interleucinas (IL) - 1 y 6) son capaces de inducir la producción y secreción de GCs como forma de autorregulación a través de la estimulación del núcleo paraventricular del hipotálamo, además la IL - 1 también puede estimular directamente la liberación de ACTH en la hipófisis<sup>(1, 15, 74)</sup>.

Entre los efectos positivos de los GCs sobre el sistema inmune se reporta que aumentan la resistencia a las infecciones estimulando la síntesis de inmunoglobulinas y la proliferación de linfocitos T a través de los RM<sup>(74)</sup>. Se ha sugerido que los GCs moderan selectivamente la respuesta inmune inhibiendo la selección de componentes superfluos o con tendencia autoinmune, ya que tienen preferencia por los linfocitos que son menos activos o producen anticuerpos con baja afinidad por los antígenos. Se ha visto que los niveles de GCs se elevan junto con la respuesta antiantigénica, al igual que la ACTH y la IL - 6<sup>(74)</sup>.

Se cree que el efecto inmunodepresor y antiinflamatorio es el resultado de la habilidad del RG de reprimir al factor inhibidor del activador del plasminógeno tipo I (IAP-1) y al factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ -B, principalmente<sup>(45)</sup>.

El efecto negativo más general de los GCs es la inhibición de la síntesis, liberación y/o eficacia de las citocinas, tales como IL – 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF por sus siglas en inglés), IFN $\gamma$ , FNT $\alpha$ , así como algunos mediadores y enzimas como la histamina, bradicininas, eicosanoides, óxido nítrico y colagenasas, ya sea por la inhibición de AP-1 ó NF $\kappa$ -B. La inhibición de IL – 1 ocurre al suprimir la transcripción y secreción, así como por desestabilización del ARNm. El efecto específico sobre IL – 2 y el FNT $\alpha$ , ocurre al inhibir el factor de transcripción NF $\kappa$ -B a través de I $\kappa$ -B, su molécula inhibidora, lo que reduce su producción en monocitos y linfocitos<sup>(12, 24, 74, 77)</sup>.

Los GCs reducen la síntesis de eicosanoides al inhibir a la ciclooxigenasa 2 (COX – 2) y a la fosfolipasa A2 y provocando la estabilización de membranas lisosomales lo que disminuye la liberación de ácido araquidónico de fosfolípidos tisulares, con lo cual se reduce la formación de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas; también impiden la presentación de antígenos al disminuir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II), reduciendo la activación y proliferación de linfocitos<sup>(12, 24, 74)</sup>.

Por otro lado, el efecto de los GCs sobre la actividad del factor de transformación del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), una citosina antiproliferativa, no son muy claros, pues mientras algunos autores reportan un aumento en sus efectos al inhibir la activación de linfocitos T y macrófagos<sup>(74)</sup>, otros informan una inhibición en otros de sus efectos, como son la expresión de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, colágeno, inhibidores tisulares de metaloproteinasas y de IAP-1, de manera que los GCs y TGF- $\beta$  en este caso son vistos como reguladores opuestos de los procesos de fibrosis y reparación de heridas<sup>(45)</sup>.

En la circulación, los glucocorticoides disminuyen los niveles de linfocitos, principalmente T CD4, células NK, eosinófilos, basófilos y macrófagos, pero aumentan los niveles de neutrófilos. Estos efectos se deben a una alteración en moléculas de adhesión celular, suprimiendo la quimiotaxis de linfocitos, monocitos y granulocitos, además del secuestro esplénico y pulmonar<sup>(12, 24, 74)</sup>.

A pesar de la importancia de la inducción de apoptosis en células del sistema inmune, poco se sabe sobre ello, pero numerosos estudios han reportado la apoptosis linfocitaria como efecto de los GCs<sup>(10, 14, 17, 34, 46, 77, 80)</sup>. Otros tipos de células y tejidos no linfoides también sufren apoptosis por efecto de los GC, como son hueso, hipocampo, eosinófilos, fibroblastos y algunas células neoplásicas; en contraste, promueven la supervivencia de eritroblastos, neutrófilos, glándula mamaria y ovario e hígado<sup>(10)</sup>.

Una explicación más detallada el proceso de apoptosis se encuentra en el Anexo II.

Se cree que los linfocitos T son más susceptibles que los B a los efectos de los GCs; sin embargo ante un estímulo estresante se incrementa el número de linfocitos T circulantes, lo que sugiere un efecto en la migración que puede confundirse con un decremento celular<sup>(80)</sup>.

Otros estudios han analizado los efectos *in vitro* de GCs en linfocitos B de médula ósea de humanos, después de ser incubadas con GCs, las células mostraron signos de apoptosis. En este estudio se encontró una mayor susceptibilidad en células inmaduras, especialmente aquellas con marcadores de superficie CD19<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> (precursores de linfocitos B); los linfocitos maduros mostraron menor susceptibilidad. Al mismo tiempo se observó apoptosis en 60 al 80 % de linfocitos B inmaduros en un periodo de 12 a 16 h tanto en ratones como en humanos<sup>(46)</sup>. Un dato interesante es que la susceptibilidad de linfocitos B presenta variaciones entre los individuos, desde

los altamente sensibles hasta los resistentes, quienes solo tuvieron decrementos del 20%; estas diferencias se atribuyeron a las diferentes proporciones de linfocitos inmaduros<sup>(46)</sup>.

Igarashi (2005) observó los efectos de GCs en la médula ósea de ratones y humanos, concluyendo que los progenitores linfoides más primitivos son más afectados que las células con un grado mayor de diferenciación.

La resistencia de linfocitos B maduros a los efectos apoptóticos de los GCs se explica por la mayor expresión del gen Bcl-2, la cual es casi indetectable en las células precursoras<sup>(37, 46)</sup>. Failla (2003) menciona numerosos estudios que han demostrado la susceptibilidad de los linfocitos T a los GCs en roedores y primates, mientras que este efecto no se encuentra tan claro en el caso de los linfocitos B. En este escrito también se hace referencia a un experimento en el cual se expusieron cultivos celulares a dexametasona, los resultados fueron muy variables: las células CD 19 tuvieron decrementos de 20 a 50%, las variaciones se atribuyeron a las diferencias de edad y género. Al final se llega a la conclusión de que las formas inmaduras son más susceptibles que los linfocitos B maduros.

Vissoci (2004) menciona que los GCs, norepinefrina, epinefrina e histamina inhiben la producción de IL – 12 en las células presentadoras de antígenos (monocitos, macrófagos, dendríticas, etc.) mientras que la producción de IL – 10 no se ve afectada. La IL – 12 es una pieza clave para la inducción de la inmunidad celular (Th1), mientras que la IL – 10 juega un papel importante en la inmunidad humoral (Th2). En este mismo artículo se habla de varios estudios sobre estrés e inmunidad con resultados contradictorios, algunos sugieren que el estrés afecta principalmente la actividad Th1, mientras que otros afirman que se afectan por igual tanto a

Th1 como Th2; así mismo el efecto sobre la actividad de las células NK tiene resultados variables.

Se reportan algunos efectos inmunodepresores que se presentan incluso en animales adrenalectomizados; en tales casos se sugiere una participación más importante del sistema nervioso<sup>(15)</sup>. Las catecolaminas y neuropéptidos de nervios periféricos tienen como blanco a diferentes tejidos: 1) estroma linfoide (epitelio y fibroblastos), 2) tejido vascular (incluyendo al músculo liso de arteriolas y vasos linfáticos y células endoteliales) y 3) células efectoras (monocitos y linfocitos). Este patrón indica que el control neural se involucra en distintas fases de la activación inmunológica que van desde la inducción, activación, funciones efectoras y la inactivación del proceso de reparación de heridas<sup>(15)</sup>. Estudios hechos en la mucosa entérica han encontrado que las repuestas ante la toxina del cólera y la enterotoxina A de *Clostridium difficile* involucran ciertos neurotransmisores, como la serotonina o prostaglandinas, relacionadas con la secreción de agua y NaCl; al mismo tiempo se ha visto que al bloquear las vías nerviosas estas respuestas inflamatorias se ven abolidas o disminuidas. Se concluye que la inervación de la mucosa intestinal contribuye con la amplificación de las señales de reconocimiento bacteriano, a la supresión de la inflamación relacionada con células cebadas y a la divergencia en las respuestas inmunes a diferentes patógenos<sup>(15)</sup>.

Estudios en humanos han relacionado la depresión con aumento de los neutrófilos circulantes y con una disminución de las células NK y de los linfocitos T y B<sup>(5)</sup>. Existen escasas publicaciones sobre la actividad inmune en perros estresados; un estudio hecho en perros Beagle transportados en automóvil encontró que la cuenta total de leucocitos se había elevado significativamente 3 h después de su arribo, esta leucocitosis se caracterizó por neutrofilia y linfopenia<sup>(4)</sup>.

Estudios retrospectivos hechos en humanos reportan que el estrés se relaciona negativamente con la capacidad proliferativa de los linfocitos (-0.2) y con la actividad de las células NK (-0.24). Otra relación negativa se encontró entre estrés y la cantidad de células B (-0.24) y T (-0.26) en circulación<sup>(6)</sup>. En este mismo estudio se analizó si la duración del estrés tiene influencia sobre estos parámetros, encontrándose que la cantidad de células T citotóxicas se incrementa durante estrés agudo (+3.2), pero decrece con estrés crónico (-0.66)<sup>(6)</sup>. Por otro lado el estrés se relacionó negativamente con los niveles de IgA en saliva (-0.22), sin embargo esta relación no se encontró con los niveles de IgA en sangre, mientras que los niveles séricos de IgM sí sufrieron un decremento (-0.13)<sup>(6)</sup>. Bennett y Cohen (1993), llegan a la conclusión de que no existe un proceso de habituación al estrés, ya que entre más tiempo esté un individuo expuesto a un agente estresante, es más probable que existan cambios en los valores basales del sistema inmune.

En otro estudio hecho en humanos se reportó que las concentraciones de IgA en saliva disminuyeron durante situaciones estresantes como son estudiantes en exámenes, estrés físico intenso y mujeres después de parir<sup>(31)</sup>.

En este mismo sentido Royo (2004) estudió el efecto de la cateterización en ratas, reportando una correlación negativa entre corticosterona e IgA fecales antes de la cirugía ( $r=-0.53$ ), pero esta relación no se encontró después de la cirugía, por lo que concluye que la corticosterona es un mejor indicador del estrés agudo que las inmunoglobulinas A, mientras que ambos son buenos indicadores de estrés crónico. En este mismo estudio se reporta una gran variabilidad entre individuos, obteniendo valores hasta diez veces mayores de una rata a otra.

Por otro lado Eriksson (2004) reporta en un estudio en que se evaluó el efecto del confinamiento en ratas, que las concentraciones medias diarias

de corticosterona secretadas no se afectaron, mientras que la excreción fecal de IgA fue significativamente menor los 3 días siguientes al periodo de confinamiento.

### ***2.6 Prueba de inmunoensayo enzimático***

El ensayo inmunoenzimático (EIA) se realiza en fase sólida utilizando microplacas de plástico. El EIA puede ser realizado de dos maneras, competitiva y no competitiva<sup>(36)</sup>. En el ensayo no competitivo, también conocido como "sándwich", la placa se recubre con un anticuerpo se agrega la muestra que contiene el antígeno y después se agrega el anticuerpo marcado, el cual se detecta al adicionar el sustrato. La cantidad de sustrato utilizado es directamente proporcional a la cantidad de los estándares o muestras, por lo cual permite hacer una estimación cuantitativa del sustrato presente en la muestra<sup>(36, 38)</sup>. Los ensayos competitivos son menos precisos ya que ya que más de un componente se presenta en una concentración limitante. En el ensayo competitivo con antígeno marcado con una enzima se fija el anticuerpo a la fase sólida, mientras que cuando en anticuerpo es el que se marca con la enzima, el antígeno es el que se fija en la placa; la muestra tiene que competir con la contraparte marcada, en ambos casos la cantidad de sustrato usado es inversamente proporcional a la cantidad presente en los estándares o muestras. En este caso la cantidad del antígeno sólo se estima de forma cualitativa, ya que es una medición indirecta<sup>(36, 38)</sup>.

Cuando se recubren las placas con un anticuerpo, la concentración del mismo es muy importante ya que a altas concentraciones las proteínas tienden a unirse unas a otras; en la práctica se usan concentraciones de 1 a 10 µg/ml. Para reducir las uniones no específicas de las muestras a la placa algunos autores recomiendan añadir un paso de bloqueo; para esto se usan pequeñas moléculas como la caseína<sup>(38)</sup>.

Los productos de las reacciones enzimáticas se estiman con un espectrofotómetro en el que la absorbancia es inversa o directamente proporcional a la concentración del antígeno. Para crear la curva de calibración las lecturas de absorbancia se transforman en unidades logarítmicas. Con esta curva es posible determinar la validez de los datos<sup>(36)</sup>.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las mediciones de cortisol han sido un gran avance para evaluar el estrés, ya sea de un individuo o de una población. La concentración de cortisol fecal provee información acerca de la secreción y producción de la hormona, pero no acerca de sus efectos en el organismo<sup>(64)</sup>. Es conocido que altas dosis de GCs reducen los niveles de IgG e IgM en sangre, mientras tratamientos con dosis bajas incrementan estos niveles<sup>(64, 80)</sup>. Otros estudios han encontrado niveles disminuidos de IgA en saliva ante situaciones estresantes en diversas especies<sup>(6, 31, 64)</sup>.

Se han relacionado los niveles de cortisol con parámetros conductuales<sup>(32, 60, 63)</sup>, pero poco se han asociado a parámetros fisiológicos que podrían dar información más objetiva acerca del estado fisiológico del individuo<sup>(28, 76)</sup>. La medición de inmunoglobulinas en heces podrá proveer de información acerca de los efectos de la producción de cortisol sobre el sistema inmune de una forma objetiva y no invasiva. Es importante remarcar que este tipo de estudios, hasta la fecha, no se han realizado en fauna silvestre.

Al llevar a cabo este tipo de mediciones en animales en cautiverio será posible establecer valores de referencia que puedan ser empleados en trabajos subsecuentes, ya sean en cautiverio o con animales en vida libre para poder evaluar el efecto del estrés sobre el sistema inmune de manera no invasiva.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos generales

- Validar la prueba de ensayo inmunoenzimático para la medición de IgA fecal en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca* en cautiverio.
- Establecer valores de referencia para la medición de IgA fecal en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca* en cautiverio.
- Evaluar la influencia del estrés sobre la concentración de IgA fecal en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca* en cautiverio.
- Evaluar los factores que pudieran afectar la concentraciones de IgA en muestras fecales de *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca* en cautiverio.

### 4.2 Objetivos particulares

- 1) Validar la prueba de ensayo inmunoenzimático para la medición de IgA fecal en *Canis lupus baileyi* utilizando kits comerciales para perro doméstico (*Canis familiares*)
- 2) Validar la prueba de ensayo inmunoenzimático para la medición de IgA fecal en *Panthera onca* utilizando kits comerciales para gato doméstico (*Felis catus*)
- 3) Evaluar la relación cortisol:IgA fecal en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca*
- 4) Evaluar la diferencia entre la relación cortisol:IgA fecal en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca*
- 5) Evaluar el efecto del tiempo en los cambios en las concentraciones de IgA fecal en heces de *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca*

- 6) Evaluar el efecto del estrés causado por el número de visitantes en las concentraciones de IgA fecal en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca*

### 4.3 Hipótesis

- Es posible medir los valores de IgA fecal en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca* usando equipos para cuantificar IgA de perros y gatos domésticos
- Existe una relación negativa entre los niveles de cortisol e IgA fecales en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca* en cautiverio
- Existen diferencias entre especies en la relación cortisol:IgA fecal entre *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca* en cautiverio
- El tiempo desde la defecación al procesamiento de la muestra produce decrementos en la concentración de IgA fecales en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca*
- La afluencia de visitantes influye en los niveles de IgA fecal en *Canis lupus baileyi* y *Panthera onca* en cautiverio al aumentar la secreción de glucocorticoides

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***5.1 Individuos y su localización***

Los animales se encontraban albergados en el Zoológico de Chapultepec, el cual se localiza en la Delegación Miguel Hidalgo de la Ciudad de México. Su ubicación geográfica se encuentra a 19° 25´ latitud norte y 99° 12´ longitud oeste, con una altitud de 2250 msnm. En esta región el clima

es templado subhúmedo con lluvias en verano (CW1), la temperatura media anual es de 15° C con una precipitación pluvial anual de 801 mm <sup>(35)</sup>.

Se recolectaron muestras de tres hembras (0.3) de lobo mexicano y cinco jaguares, cuatro machos y una hembra (4.1). Las lobas se encuentran albergadas juntas en el bioma templado del zoológico; tienen completa libertad de permanecer en el exhibidor o entrar a la casa de noche. Las lobas son hijas de Tasha (No. registro 537) y Joy (517), dos de ellas nacieron el 17 de abril de 2002, Tewa (777) y Yuma (778) y la tercera nació el 23 de abril de 2003, Kailuma (849). Tewa es la hembra dominante, mientras que Kailuma es el individuo omega (Cuadro 1).

Los jaguares se albergan individualmente; la mayor parte del tiempo se encuentran en las casas de noche y se turnan para salir a los exhibidores. La hembra, llamada Tulum, fue comprada junto con Tikal en 2002; no se tienen registro de sus edades. El macho llamado Pedro nació el 17 de agosto de 1987 en el zoológico, fue criado en el hospital. Yumká nació en el Zoológico de Aragón en abril de 1979; se trasladó a Chapultepec el 20 de Julio de 1999. Se calcula que la fecha aproximada del nacimiento de Ikkal fue en mayo de 1999, llegó por donación de un particular (Cuadro 1).

Cabe hacer mención que los lunes el zoológico se encuentra cerrado al público en general, aunque existen grupos pequeños de visitantes programados que visiten al mismo.

**Cuadro 1. Características de los individuos de estudio**

<i>Individuo</i>	<i>Especie</i>	<i>No. registro/ Microchip</i>	<i>Sexo</i>	<i>Fecha de nacimiento o adquisición</i>	<i>Observaciones</i>
Tewa	<i>Canis lupus baileyi</i>	777	Hembra	17 Abril 02	Hembra alfa
Yuma	<i>Canis lupus baileyi</i>	778	Hembra	17 Abril 02	
Kailuma	<i>Canis lupus baileyi</i>	849	Hembra	23 Abril 03	Hembra omega
Ikbal	<i>Panthera onca</i>	020581862	Macho	Mayo 99 (donación)	
Tikal	<i>Panthera onca</i>	021070082	Macho	Adquirida 13 Octubre 00 con aprox. 8 años	Permanece casi todos los días en exhibición
Pedro	<i>Panthera onca</i>	020632306	Macho	17 Septiembre 87	
Yumká	<i>Panthera onca</i>	020780360	Macho	Abril 1979	
Tulum	<i>Panthera onca</i>	021296258	Hembra	Adquirido 13 Octubre 00 con aprox. 10 años	Sólo sale al exhibidor los lunes

### ***5.2 Obtención y manejo de muestras***

El proceso de muestreo se llevó a cabo diariamente del 13 de Marzo al 19 de Mayo de 2006. La elección de las fechas comprende al muestreo durante semana santa en que la afluencia de público se incrementa

notablemente. Se compararon valores basales (antes de semana santa) contra un periodo de estrés (semana santa) y con el objeto de ver si estos efectos son transitorios o prolongados también se comparó el periodo posterior (después de semana santa).

Las muestras se obtuvieron durante el proceso de limpieza de los albergues, a las 8:00 en el caso de los jaguares y con las lobas se obtuvieron dos veces al día, a las 9:00 y 16:00 h. En el caso de las lobas en el cual se requirió de la identificación de las muestras, se utilizaron colorantes vegetales suministrados junto con el alimento el día anterior a la toma de muestras.

Las muestras se homogenizaron manualmente y dividieron en 3 partes iguales (dependiendo del tamaño de la muestra), de las cuales una se almacenó de inmediato, dejando las otras a la intemperie, una hasta el día 2 y la última hasta el día 3. Las heces fueron conservadas por medio de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el caso de la determinación de IgA y con etanol al 70% a temperatura ambiente para la determinación de cortisol.

### ***5.3 Determinación de cortisol en heces***

#### ***5.3.1 Extracción de cortisol en heces***

La extracción total de esteroides con éter dietílico se realizó de acuerdo a Salame-Méndez (2003). En esta técnica se mezclan 1 g de la parte sólida de las heces más 1 g del etanol en que se conservan y se les agregan 2 ml de agua destilada, luego se centrifuga 10 minutos a 1,500 rpm. El sobrenadante se separa y se guarda para su uso posterior, a las heces se les agregan 3 ml de éter, se agita en vortex por 10 s y se pasa la parte etérea a un tubo en baño María a  $50^{\circ}\text{C}$  hasta la evaporación total; este procedimiento se repite una vez más con las heces y otra vez con el sobrenadante previamente obtenido.

### *5.3.2 Validación del sistema*

Para verificar la estimación de cortisol se construyeron dos curvas a base de dos muestras, una de lobo y otra de jaguar. Las curvas de las muestras se correlacionaron con la curva estándar del kit de cortisol para evaluar el paralelismo. <sup>(55, 75)</sup>

### *5.3.3 Cuantificación del cortisol fecal*

La determinación de los niveles de cortisol en heces se realizó por medio de la técnica de ensayo inmunoenzimático (EIA por sus siglas en inglés). Se utilizaron equipos de la empresa Diagnostic System Laboratories Inc. DSL-10-2000 Active<sup>®</sup> para medición de cortisol; siguiendo la metodología propuesta por el fabricante, aplicando 50 µl de cada estándar, control y muestras en los pozos correspondientes y agregando 100 µl de la solución enzimática conjugada en cada pozo. Se adicionan 100 µl del antisuero de cortisol y se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos. Cada pozo se lava y aspira y se agregan 100 µl de la solución TMB cromógena, incuban a temperatura ambiente por 10 a 15 min. Al final se adicionan 100 µl de la solución ácida para detener la reacción. Las lecturas se hicieron con un fotolorímetro ELX 800 de Biotek con longitud de onda de 450 nm y software Ridawin ver. 1.42 de Biopharm.

## **5.4 Determinación de IgA en heces**

### *5.4.1 Recuperación de IgA en heces*

El procesamiento de las muestras para la extracción de proteínas se efectuó de acuerdo a lo descrito por Peters (2004). En esta técnica 1 g de heces se diluye en 10 ml de PBS (fosfato 0.01 M, pH 7.4, 0.5% Tween) y se agita en Vortex por 10 s. Centrifugar a 1,500 g por 20 minutos; a 2 ml del sobrenadante se le agregan 20 µl de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich), se agita en Vortex y se centrifuga de nuevo a 10,000 g por

10 minutos. El sobrenadante se almacenó en tubos eppendorf estériles congelados a - 20° C hasta su procesamiento.

#### *5.4.2 Validación del sistema*

Se evaluó el paralelismo de los estándares y las muestras al diluirlos en el amortiguador utilizado para procesar las muestras de heces, ya que el material está diseñado para muestras de suero.<sup>(55, 75)</sup>

Para verificar la eficacia de los reactivos, se trabajaron muestras de perro (*Canis familiaris*) y gato (*Felis catus*) aunadas al resto de las muestras de lobo y jaguar.

#### *5.4.3 Cuantificación de IgA en heces*

Para la determinación de IgA en heces se utilizaron equipos de Bethyl Laboratories Inc. E40-104<sup>®</sup> y E20-101<sup>®</sup>, para cuantificar IgA de perro y gato por medio de un ensayo inmunométrico. Se siguió la metodología propuesta por el fabricante diluyendo 1 µl de anticuerpo capturado en 100 µl del amortiguador de recubrimiento por cada pozo e incubar la placa por 60 minutos, aspirar la solución y lavar. Agregar 200 µl de la solución bloqueadora e incubar por 30 minutos, remover la solución de bloqueo y lavar. Transferir 100 µl de las muestras y estándares por duplicado a los pozos asignados e incubar por 60 min. Remover las muestras y los estándares y lavar las placas. Diluir el conjugado HRP y transferir 100 µl a cada pozo, incubar por 60 minutos. Remover el conjugado HRP de cada pozo, poniendo 100 µl de la solución de sustrato, incubar la placa por 30 minutos; para detener la reacción de TMB agregar 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M a cada pozo. Las lecturas se hicieron con un fotocolorímetro ELX 800 de Biotek con una longitud de onda de 450 nm y software Ridawin ver. 1.42 de Biopharm.

### ***5.5 Análisis estadístico***

En virtud del tipo de datos y el número de observaciones relativamente reducido, se realizó la prueba de bondad de ajuste para normalidad de Kolmogorov-Smirnov<sup>(81)</sup> a los valores de cortisol e IgA, cuyo resultado indicó que no presentan una distribución normal ( $P < 0.01$ ). Por esa razón, se llevó a cabo un análisis no paramétrico (Kruskal-Wallis)<sup>(81)</sup>, así como una transformación logarítmica de los datos. En ambos casos, teniendo claro que el principio de independencia entre las muestras no se cumple. Una vez transformados los datos, se analizaron con un diseño lineal mixto de mediciones repetidas que considera esta falta de independencia<sup>(47)</sup>; además se estimó la correlación lineal de Pearson<sup>(39)</sup> entre los datos transformados de cortisol y de IgA.

Los periodos comparados fueron: 1) antes de semana santa, 2) durante semana santa y 3) después de semana santa. Las comparaciones no paramétricas entre periodos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para análisis de varianza por rangos, seguidos de un análisis de comparaciones múltiples no paramétrico. En el caso de los jaguares, dado que se tenía la totalidad de las muestras identificadas, fue posible emplear un modelo mixto de mediciones repetidas<sup>(47)</sup> para analizar el efecto del cortisol sobre los niveles de IgA fecales a través del tiempo. En dicho modelo se consideró el efecto del tiempo como un efecto fijo, y el efecto del animal y el del residuo como efectos aleatorios. El análisis estadístico se realizó empleando el paquete estadístico SAS (Versión 9.1., 2004. SAS Institute Inc., Cary NC. USA).

## 6. RESULTADOS

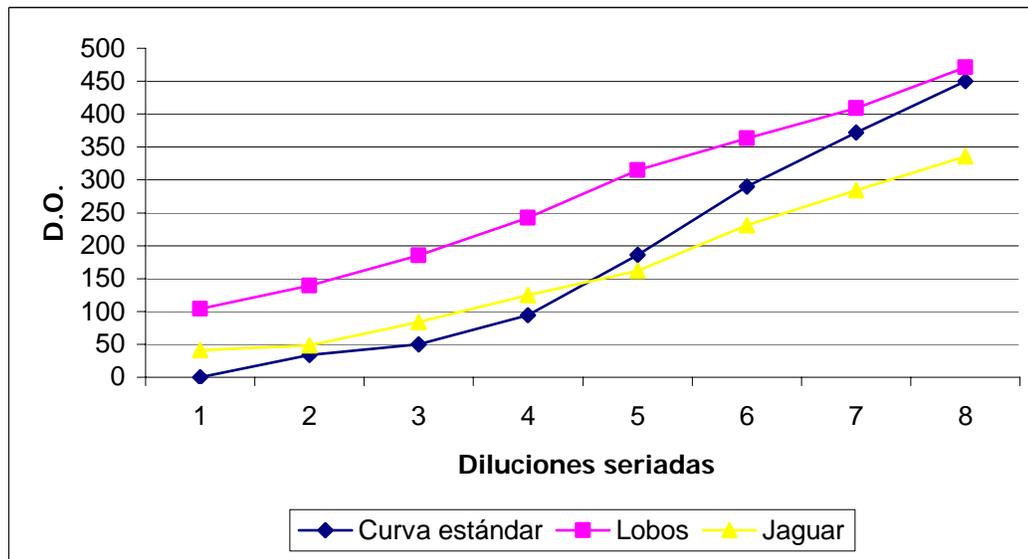
### *Lobo Mexicano*

El promedio de cortisol en heces de obtenido para todas las muestras (156 muestras) de las lobas durante el periodo de estudio fue de  $11,061 \pm 9,003$  pg/g de heces. Con respecto a los valores de IgA el promedio general para las lobas fue de  $7,746 \pm 9,042$   $\mu$ g/g de heces.

Los ensayos de IgA para lobos tuvieron un coeficiente de variación intra e interensayo de 0.16 y 0.15 respectivamente. Los ensayos de cortisol tuvieron un coeficiente de variación interensayo de 0.20; debido a que éstos no se hicieron por duplicado debido a la poca cantidad de equipos, la variación intraensayo no pudo ser calculada.

La validación de los kits de cortisol obtuvo una correlación de 0.98 para lobos al relacionar las densidades ópticas obtenidas para las diluciones seriadas de las curvas de los estándares y las muestras (Figura 1).

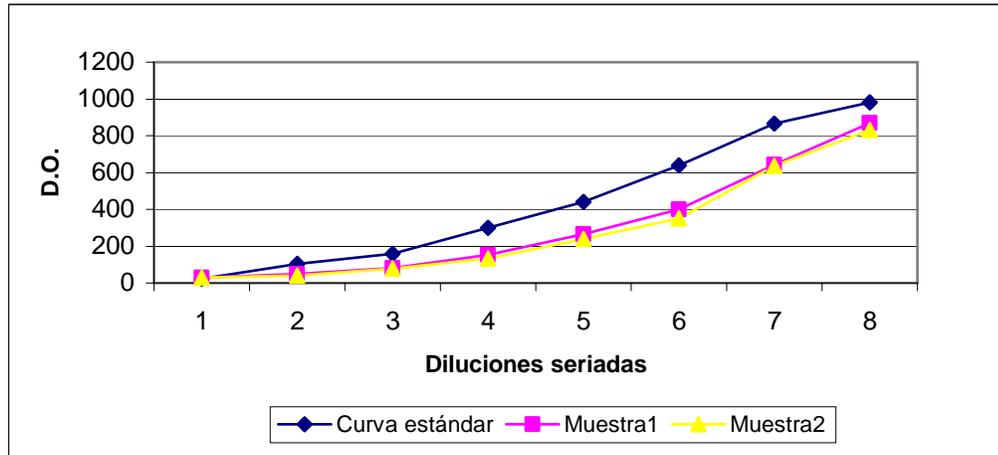
**Figura 1. Curva de validación de los equipos comerciales de cortisol**



D.O. = Densidad Óptica

Mientras que la validación de las curvas de IgA obtuvo correlación de 0.98 para lobos (Figura 2).

**Figura 2. Curva de validación de los equipos comerciales para IgA en heces de lobo mexicano**

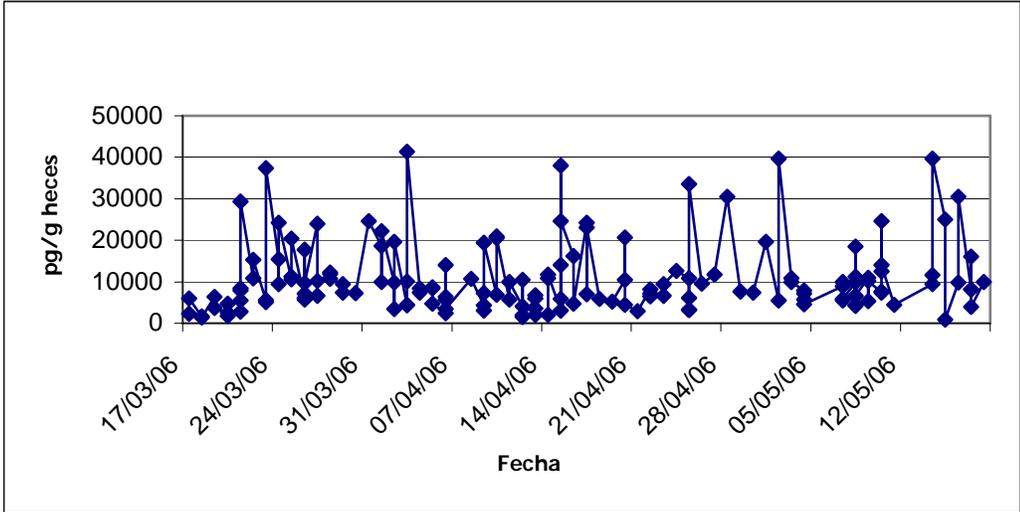


D.O. = Densidad Óptica

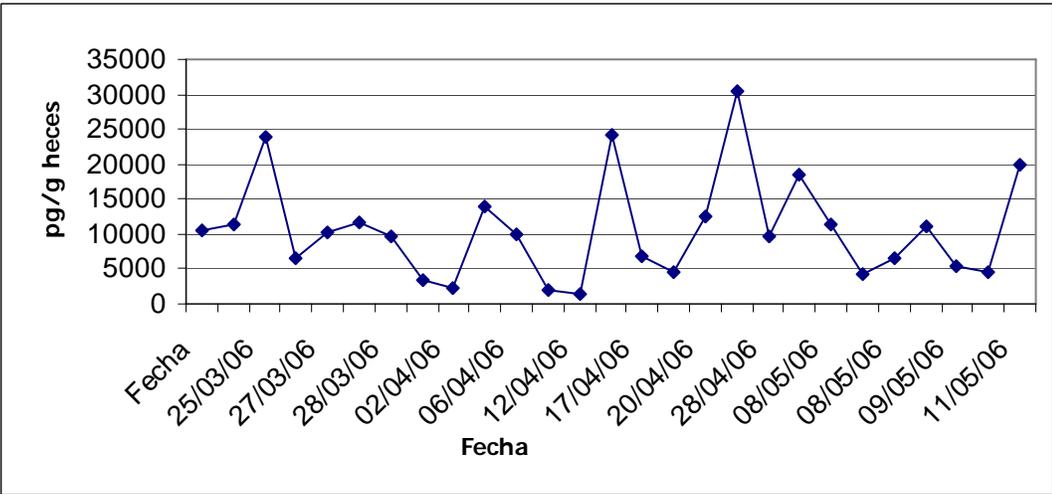
Para establecer valores de referencia para IgA fecal se realizó un muestreo de cuatro semanas, previo a semana santa. Para las lobas se obtuvo un promedio de  $9,878 \pm 9,988 \mu\text{g/g}$  heces (78 muestras).

Los niales de cortisol agrupados en las tres hembras de lobo mexicano se observan en la Figura 3. En los datos de la hembra dominante graficados en la Figura 4 se observa un incremento en sus niveles de cortisol que se podrían relacionar con los bajos niveles de IgA (Figura 5) presentados durante las últimas semanas del estudio. No se pudieron obtener suficientes muestras identificadas individualmente de las otras lobas debido a que la dominante era quien comía o enterraba los colorantes la mayor parte del tiempo, o en ciertos días no comían.

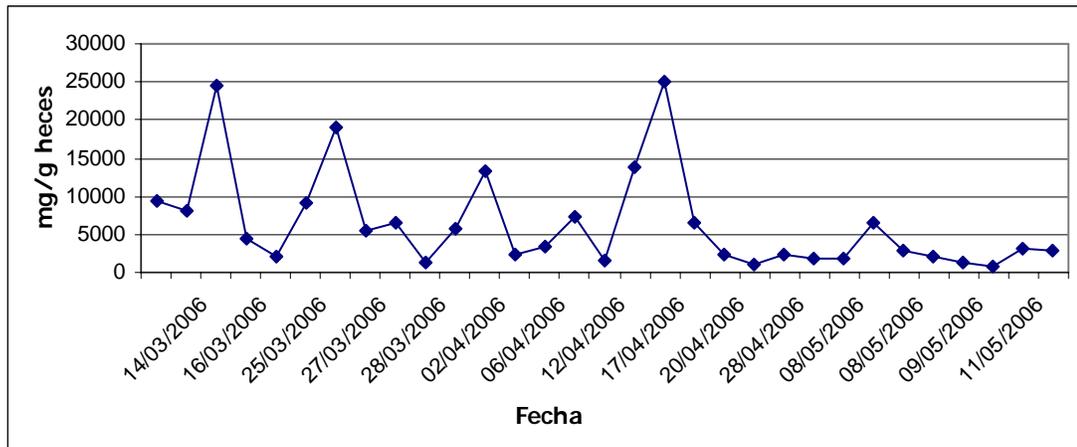
**Figura 3. Niveles de cortisol fecal en tres hembras de lobo mexicano**



**Figura 4. Niveles de cortisol fecal en la hembra dominante de lobo mexicano**

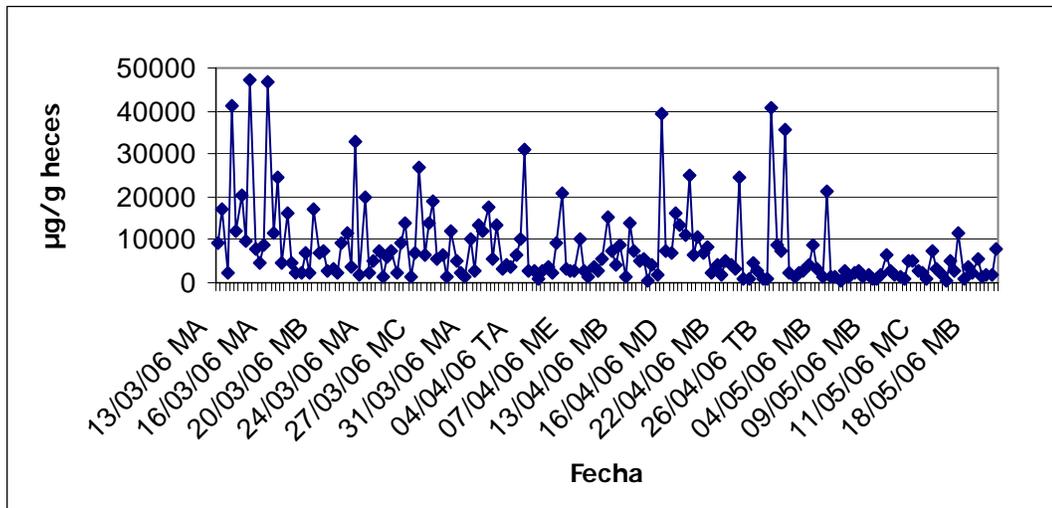


**Figura 5. Niveles de IgA fecal en la hembra dominante de lobo mexicano**



Estos efectos son un poco menos evidentes cuando se toman en conjunto los datos de las tres hembras, pero aún así se nota un decremento en los valores de IgA durante el mes de mayo (Figura 6) pues en los periodos anteriores se observan picos de 25,000  $\mu\text{g}$ , mientras que después de semana santa el valor máximo es de 6,000  $\mu\text{g/g}$  heces.

**Figura 6. Niveles de IgA fecal en tres hembras de lobo mexicano**



### *Jaguar*

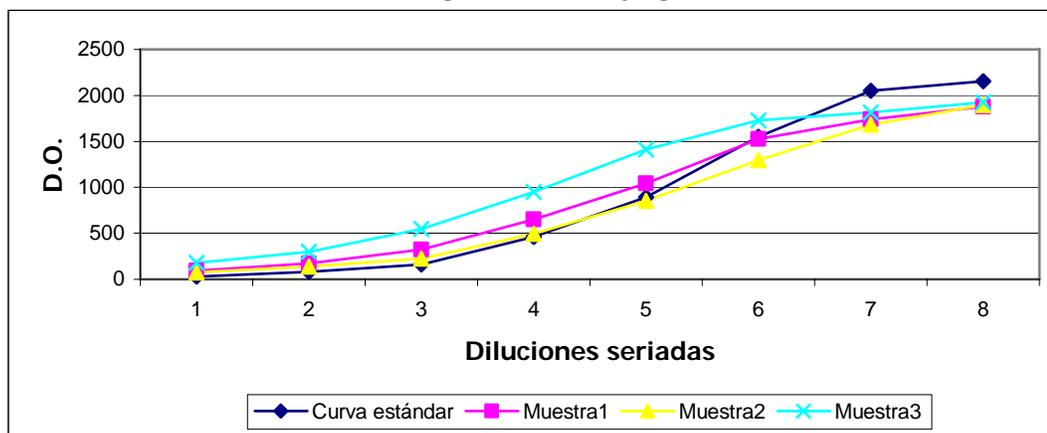
El promedio de cortisol de obtenido para todas las muestras (50 muestras) fue de  $36,413 \pm 98,392$  pg/g de heces. Con respecto a los valores de IgA el promedio general fue de  $2,484 \pm 2,476$   $\mu$ g/g de heces en los jaguares.

Los ensayos de IgA para los jaguares fueron de 0.18 y 0.20. Los ensayos de cortisol tuvieron un coeficiente de variación interensayo de 0.20; debido a que éstos no se hicieron por duplicado debido a la poca cantidad de equipos, la variación intraensayo no pudo ser calculada como se mencionó anteriormente.

La validación de los kits de cortisol obtuvo una correlación de 0.99 para jaguares al relacionar las densidades ópticas obtenidas para las diluciones seriadas de las curvas de los estándares y las muestras (Figura 1).

Mientras que la validación de las curvas de IgA obtuvo correlación de 0.99 para jaguares (Figura 7).

**Figura 7. Curva de validación de los equipos comerciales para IgA fecal de jaguar**



D.O. = Densidad Óptica

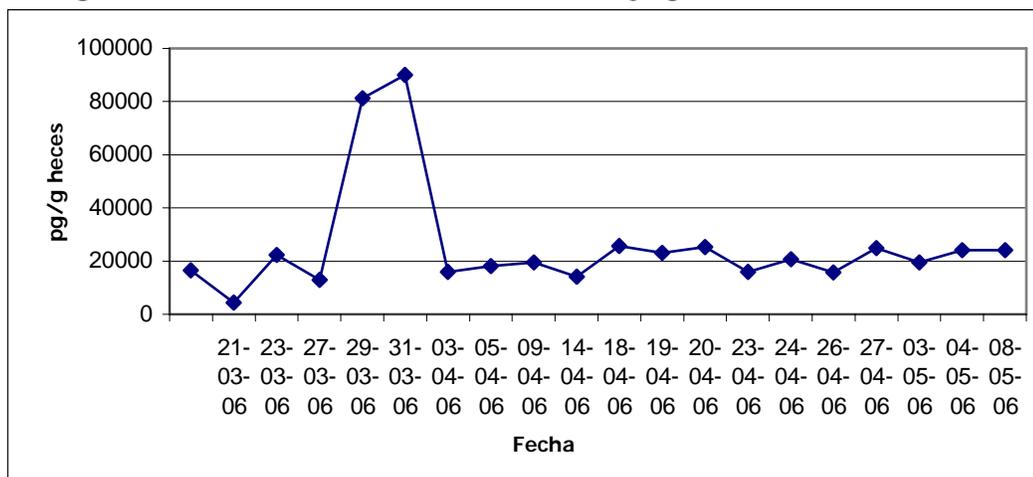
Para establecer valores de referencia para IgA fecal en jaguar y lobo mexicano se realizó un muestreo de cuatro semanas, previo a semana santa.

Para las lobas se obtuvo un promedio de  $9,878 \pm 9,988 \mu\text{g/g}$  heces (78 muestras) y  $2,484 \pm 1,071 \mu\text{g/g}$  de heces (22 muestras) para los jaguares.

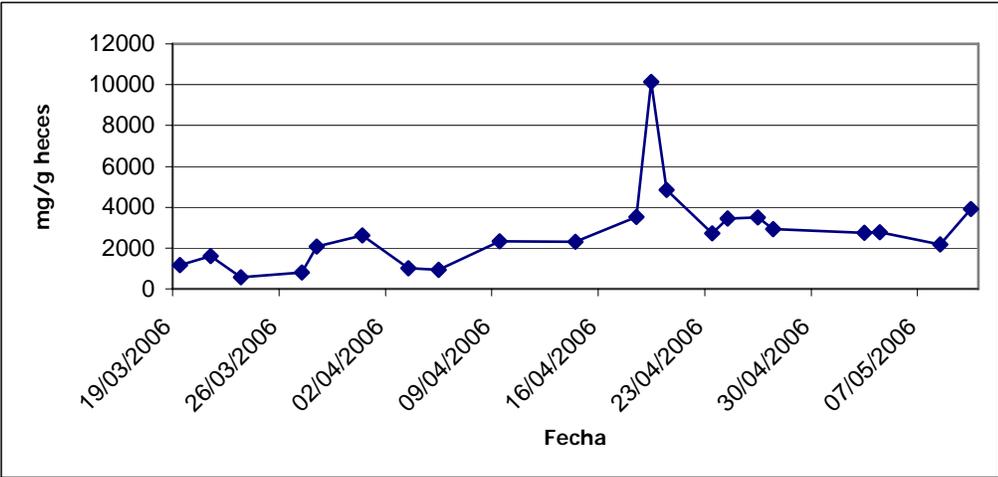
Los niveles de cortisol agrupados en las tres hembras de lobo mexicano se observan en la Figura 4. En los datos de la hembra dominante graficados en la Figura 5 se observa un incremento en sus niveles de cortisol que se podrían relacionar con los bajos niveles de IgA (Figura 6) presentados durante las últimas semanas del estudio. No se pudieron obtener suficientes muestras identificadas individualmente de las otras lobas debido a que la dominante era quien comía o enterraba los colorantes la mayor parte del tiempo, o en ciertos días no comían.

En el caso de los jaguares, gráficamente se observa un incremento en los niveles de cortisol de la hembra Tulum en el periodo previo a la semana santa (Figura 8), pero no se observan variaciones importantes en la gráfica de los niveles de IgA (Figura 9). No se detectaron variaciones en los niveles de cortisol en las gráficas de otros jaguares (Figuras 10 y 11).

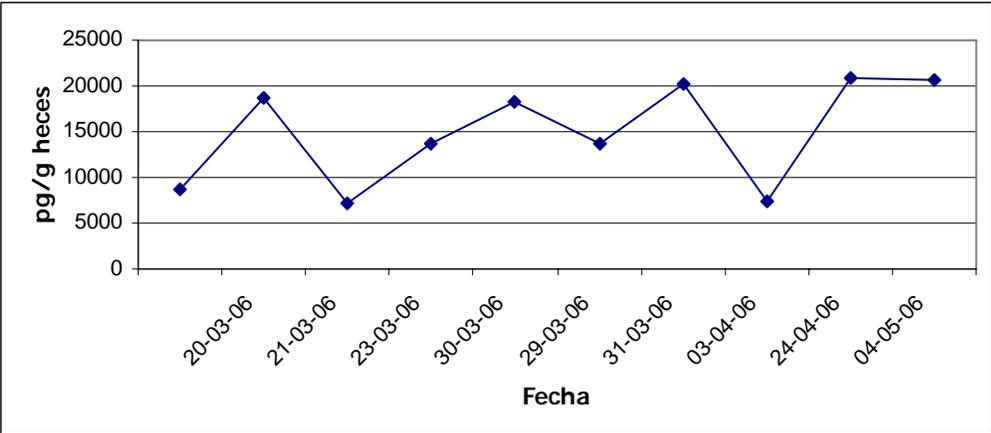
**Figura 8. Niveles de cortisol fecal en jaguar hembra "Tulum"**



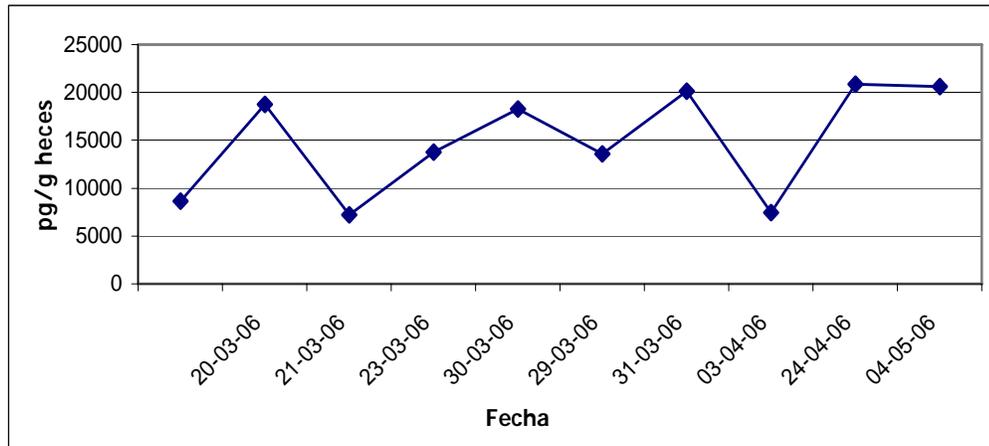
**Figura 9. Niveles de IgA fecal en jaguar hembra "Tulum"**



**Figura 10. Niveles de cortisol en jaguar macho "Ikbal"**



**Figura 11. Niveles de cortisol en jaguar macho Tikal**



### ***6.1 Análisis no paramétrico***

#### ***Lobo mexicano***

A través de la prueba de Kruskal-Wallis se encontraron diferencias significativas entre los diferentes periodos estudiados en las lobas tanto para cortisol ( $P < 0.025$ ) e IgA ( $P < 0.005$ ), pero no cuando se hizo la división entre días de alta y baja afluencia de público ( $P > 0.50$ ). Estas diferencias se mantuvieron al analizar los datos de la hembra dominante por separado encontrando diferencias en los diferentes periodos en los niveles de IgA ( $P < 0.01$ ), así como diferencia marginal en el caso de cortisol ( $P < 0.09$ ).

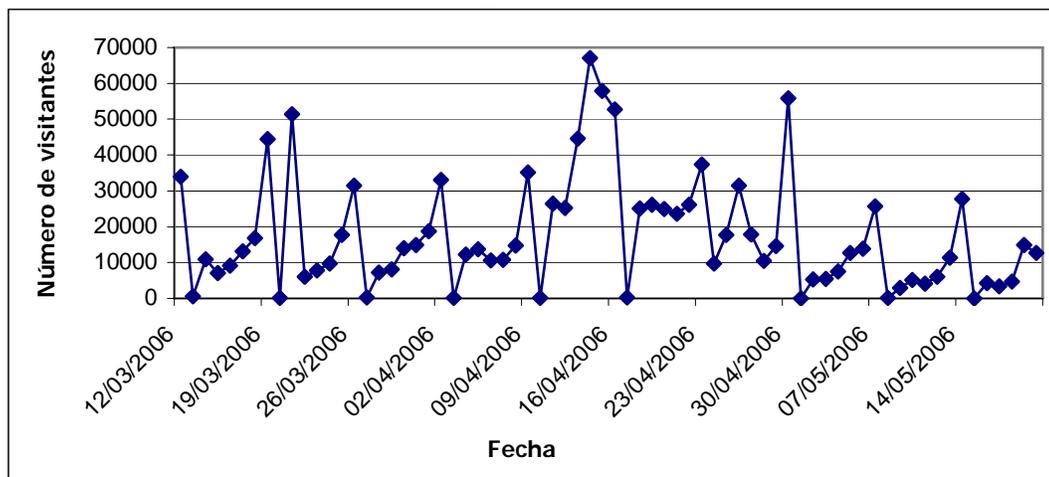
Respecto a los valores de IgA de las tres lobas, evaluados a través de los promedios de los rangos, el periodo después de semana santa es significativamente menor (56.4 – valor derivado de los cálculos de los rangos de los valores – ), mientras que los periodos antes y durante semana santa no presentan diferencias entre sí (101 y 94.9 respectivamente) (Cuadro A del Anexo III). No se encontraron diferencias entre días de alta y baja afluencia de público (Cuadro B en el Anexo III). En el caso de la hembra dominante se presentó el mismo comportamiento, después de semana santa (8.8) fue

menor que antes y durante (19 y 18.2 respectivamente) (Cuadro C del Anexo III).

En cuanto a los valores agrupados de cortisol en las lobas, el periodo después de semana santa (84.6) fue significativamente mayor que durante semana santa (71); antes (76) y después no tuvieron diferencias significativas (Cuadro D del Anexo III). No se encontraron diferencias entre días de alta y baja afluencia de público (Cuadro E del Anexo III). En el caso de la hembra dominante, el periodo de semana santa fue significativamente menor (7.1) que antes y después (14.3 y 15.3 respectivamente) (Cuadro F del Anexo III).

Al analizar la afluencia de público al zoológico de Chapultepec se observa que el periodo de alta afluencia no se limita a la semana santa (9 al 23 de abril), sino que se extiende hasta el 30 de abril (Figura 12).

**Figura 12. Número de visitantes al Zoológico de Chapultepec durante el periodo de estudio**



Tomando en cuenta lo anterior se analizaron los niveles de cortisol en la hembra dominante, pero dividiendo las etapas de acuerdo a la cantidad de visitantes del 20 de marzo al 8 de abril, del 9 al 30 de abril (periodo de mayor afluencia) y del 1 al 20 de mayo, obteniendo como resultado un aumento

significativo en los niveles de cortisol durante el periodo de mayor afluencia (17.1), mientras que el primer y tercer periodos no tuvieron diferencias significativas (11.7 y 10.9 respectivamente) (Cuadro I del Anexo III).

Sin embargo los resultados de cortisol varían cuando se aplica este mismo criterio en los valores agrupados de las tres hembras, obteniendo que el primer periodo es significativamente menor (67), mientras que el segundo y tercer periodos no presentan diferencias entre si (71.7 y 71.8 respectivamente) (Cuadro J del Anexo III).

No se encontraron diferencias en los valores de IgA al hacer la nueva división de los periodos.

### ***Jaguar***

Los datos de cortisol en jaguares no mostraron diferencias significativas entre los periodos del estudio. Respecto a los valores de IgA, se encontraron diferencias para Tulum entre los periodos antes (6.6) y durante semana santa (15.7), durante y después (12), así como antes y después no presentaron diferencias, ( $P < 0.01$ ) (Cuadro G del Anexo III).

Para Tikal los valores de IgA durante de semana santa (4.3) fueron significativamente menores que los obtenidos después de semana santa (8.7), pero no difirieron de antes (6.5) ( $P < 0.005$ ) (Cuadro H del Anexo III).

## ***6.2 Análisis paramétrico de los datos normalizados***

### ***Lobo mexicano***

Los datos se normalizaron mediante una conversión logarítmica y se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar los tres periodos; se tomó la división corregida de los días aumentando el periodo de alta afluencia hasta el 30 de abril. En el Cuadro 2 se observan los promedios por periodo.

**Cuadro 2. Valores promedio de cortisol e IgA fecal en las tres Lobas mexicanas durante los diferentes periodos**

Variable	Antes de semana santa	Periodo de alta afluencia	Periodo después de semana santa
Cortisol*	11,351 ± 6,320	11,062 ± 7,944	12,763 ± 7,851
IgA**	9,324 ± 6723	7,471 ± 6,508	3,581 ± 2,805
Cortisol (Logaritmo)	9.16 ± 0.66	9.10 ± 0.68	9.22 ± 0.82
IgA (Logaritmo)	8.87 ± 0.78	8.54 ± 0.92	7.95 ± 0.68

Valores expresados como media ± desviación estándar

\* pg/g heces

\*\* µg/g heces

No se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de cortisol entre periodos ( $P > 0.80$ ). Para los niveles de IgA sí se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.0010$ ); el periodo previo a semana santa no es diferente al periodo de alta afluencia, pero ambos son estadísticamente diferentes del periodo después de semana santa (Cuadro K del Anexo III).

Sólo se pudo analizar individualmente a la hembra alfa, ya que no se obtuvieron suficientes muestras identificadas de las otras dos sin encontrar diferencias significativas tanto para los niveles de cortisol, como para los de IgA.

### *Jaguar*

Los valores promedio de cortisol e IgA en jaguares se encuentran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Valores promedio de cortisol e IgA fecal en los jaguares durante los diferentes periodos**

Variable	Antes de semana santa	Periodo de alta afluencia	Después de semana santa
Cortisol*	20,328 ± 17,881	24,995 ± 18,840	22,443 ± 7,430
IgA*	1,300 ± 1,212	2,961 ± 4,469	1,758 ± 913
Cortisol(logaritmo)	9.66 ± 0.73	9.95 ± 0.56	9.97 ± 0.33
IgA (logaritmo)	6.81 ± 0.89	7.47 ± 0.96	7.35 ± 0.55

Valores expresados como media ± desviación estándar

\*(pg/g heces)

\*\* (µg/g heces)

Al igual que en los lobos, no se encontraron diferencias significativas para los niveles de cortisol ( $P > 0.05$ ), pero sí se encontró una diferencia marginal para los niveles de IgA ( $P = 0.0508$ ), siendo el periodo previo a la semana santa menor que los subsecuentes (Cuadro L del Anexo III).

El análisis individual sólo pudo efectuarse en Ikbal, Tikal y Tulum debido a que no se obtuvieron suficientes de Pedro y Yumká (Cuadros 4, 5 y 6).

**Cuadro 4. Valores promedio totales de cortisol e IgA fecal en jaguar hembra "Tulum"**

Variable	Antes de semana santa	Periodo de alta afluencia	Después de semana santa
Cortisol*	24913 ± 25539	19796 ± 4202	2320 ± 2424
IgA**	1599 ± 1128	4969 ± 5755	2406 ± 1031
Cortisol (Logaritmo)	9.79 ± 0.86	9.87 ± 0.21	10.05 ± 0.11
IgA (Logaritmo)	7.18 ± 0.65	8.20 ± 0.70	7.73 ± 0.38

Valores expresados como media ± desviación estándar

\* pg/g heces

\*\* µg/g heces

**Cuadro 5. Valores promedio totales de cortisol e IgA fecal en jaguar macho "Tikal"**

Variable	Antes de semana santa	Periodo de alta afluencia	Después de semana santa
Cortisol*	25804 ± 0711	16752 ± 4815	28880 ± 10321
IgA**	638 ± 632	872 ± 466	1252 ± 569
Cortisol (Logaritmo)	9.54 ± 1.73	9.68 ± 0.35	10.23 ± 0.35
IgA (Logaritmo)	6.06 ± 1.15	6.66 ± 0.54	7.03 ± 0.58

Valores expresados como media ± desviación estándar

\* pg/g heces

\*\* µg/g heces

**Cuadro 6. Valores promedio totales de cortisol e IgA fecal en jaguar macho "Ikbal"**

Variable	Antes de semana santa	Periodo de alta afluencia	Después de semana santa
Cortisol*	14332 ± 5042	7432 ± NC	20760 ± 170
IgA**	1509 ± 1643	618 ± NC	978 ± NC
Cortisol	9.51 ± 0.40	8.91 ± NC	9.94 ± 0.01

(Logaritmo)			
IgA (Logaritmo)	6.83 ± 1.08	6.43 ± NC	6.89 ± NC

Valores expresados como media ± desviación estándar; NC = no calculado

\* pg/g heces

\*\* µg/g heces

No se encontraron diferencias significativas entre periodos para los niveles de cortisol en los tres jaguares ( $P > 0.23$ ). Respecto a los niveles de IgA no hubo diferencias para Ikbal y Tikal, pero sí para Tulum ( $P < 0.01$ ) (Cuadro M del Anexo III).

Debido a que en este caso sí se contaba con la identificación de todas las muestras, fue posible correr un análisis de varianza utilizando un modelo mixto, en el que se observó que los niveles de cortisol varían dependiendo del tiempo ( $P < 0.048$ ), más que del individuo ( $P < 0.24$ ), mientras que para los niveles de IgA el caso es inverso, las variaciones dependen principalmente del individuo ( $P < 0.003$ ) y no del tiempo ( $P < 0.39$ ).

### ***6.3 Correlación entre los niveles de cortisol e IgA fecales***

Se observó una correlación lineal de los valores normalizados de cortisol y de IgA de 0.06 para las lobas y 0.28 para los jaguares; ambos coeficientes son bajos.

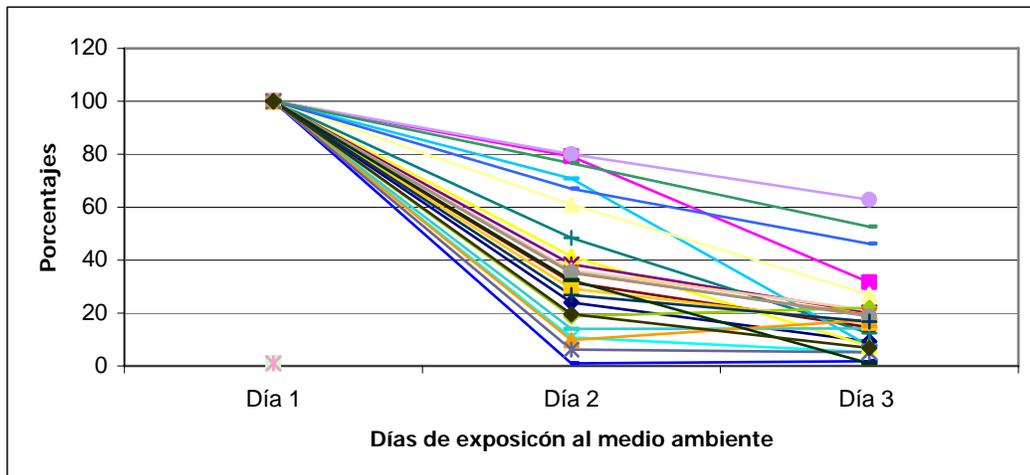
Considerando el hecho de que el efecto hormonal pudiera ser retardado, se hicieron correlaciones desfasando los datos de IgA de 0 a 6 días sólo de los periodos durante y después. Cuando los datos de IgA se desfasaron 3 días se obtuvo un coeficiente de -0.21 para el total de tiempo del estudio, pero, analizando por separado la etapa anterior a semana santa se obtiene un coeficiente de 0.1, mientras el coeficiente para el periodo de alta afluencia es de -0.21 y de -0.5 para el último periodo.

No se obtuvieron diferencias significativas al hacer los desfases en las muestras de jaguar.

#### ***6.4 Variaciones en los niveles de IgA fecal en las muestras expuestas al medio ambiente***

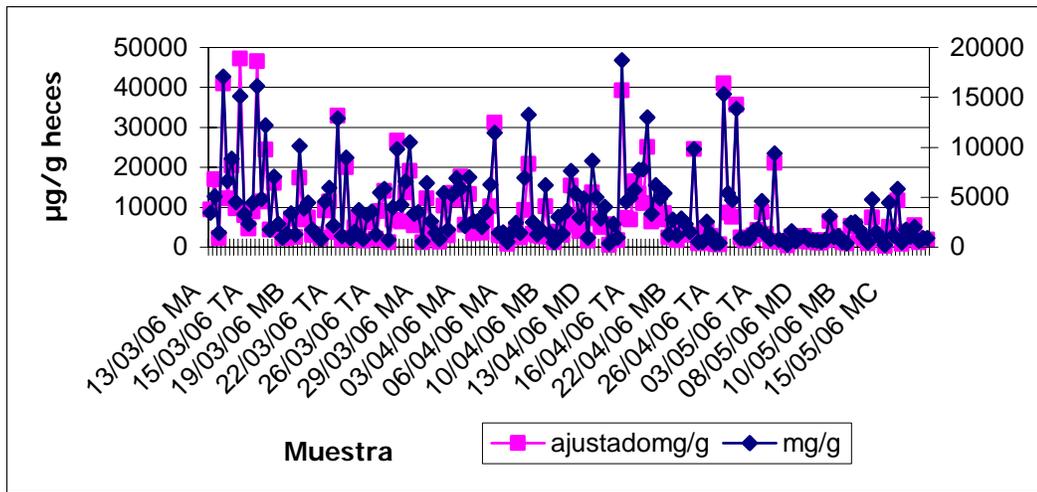
En las muestras que se expusieron al medio ambiente se aprecia una reducción promedio del 62 % en los niveles de IgA después de un día, mientras que para las muestras expuestas durante 2 días la reducción promedio fue de 81 % (Figura 13).

**Figura 13. Porcentajes de reducción en los valores de IgA fecal en muestras expuestas al medio ambiente por 2 y 3 días**



Según datos en la literatura los niveles de humedad no tienen un efecto significativo en las mediciones de cortisol en heces<sup>(73, 78)</sup>; sin embargo no se encontró algún estudio previo que evaluara el efecto de este tipo de ajustes para IgA, por lo cual se hizo el experimento de obtener el peso seco de las muestras y ajustar los valores obtenidos de IgA al peso seco (Figura 14). Después se realizó una correlación entre los valores calculados con peso húmedo y seco obteniendo una correlación de 0.96.

**Figura 14. Comparación de los valores de IgA fecal calculados en base seca (ajustados) y en base húmeda (no ajustados)**



ajustado µg/g = valores ajustados al peso seco  
 µg/g = valores calculados en base húmeda

## 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

A través de los estudios realizados fue posible realizar mediciones de IgA en heces de jaguar y lobo mexicano usando kits comerciales para inmunoglobulina A de cánidos y felinos domésticos, obteniendo curvas de validación 0.99 para jaguares y 0.98 para lobos; este tipo de validación también ha sido usada por otros autores como Schäfer-Somi (2005) y Morato (2004). Con esto fue posible cuantificar valores basales de IgA en estas especies para las condiciones en el Zoológico de Chapultepec, así como detectar diferencias significativas en su secreción, las cuales podrían relacionarse con otros factores como son la secreción de GCs o la cantidad de visitantes al zoológico.

Al comparar a las dos especies, en este estudio se observó que mientras que los niveles de cortisol fueron más altos para los jaguares ( $36,413 \pm 98,392$  pg/g de heces) que para los lobos ( $11,061 \pm 9,003$  pg/g de heces), las concentraciones de IgA tienen un comportamiento invertido, siendo

mayores las concentraciones en lobos ( $7,746 \pm 9,042 \mu\text{g/g}$  de heces) que en las heces de jaguares ( $2,484 \pm 2,476 \mu\text{g/g}$  de heces).

Pifarré (2004) estimó el promedio de cortisol fecal en lobos mexicanos en varios zoológicos por medio de la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), en  $203.74 \text{ ng/g}$  de heces, mientras que Ojeda (2002), usando la misma técnica, reporta una media de  $0.497 \text{ ng/g}$  de heces para la población de jaguares estudiada en el Zoológico de Chapultepec; sin embargo estos valores no se pueden comparar, pues aunque la técnica era la misma, Pifarré utilizó como anticuerpo anticortisol de conejo, mientras que Ojeda lo hizo con suero de rata contra corticosterona. Por otro lado Hernández (2006) encontró niveles de cortisol en felinos (león africano y ocelote) alrededor de  $400 \text{ ng/g}$  de heces, mientras que en cánidos (lobo mexicano y coyotes) los niveles se encontraron alrededor de  $300 \text{ ng/g}$  de heces, ambos también usando RIA con anticuerpos anticortisol. En Brasil Morato (2004) midió la respuesta adrenocortical a estrés agudo a través de las heces, también por RIA, usando anticuerpos contra cortisol, reportando valores basales de  $307.8 \text{ ng/g}$  heces, los cuales se elevaron hasta un pico de  $820.9 \text{ ng/g}$  heces secas después de electroeyacularlos.

A pesar de las diferencias técnicas, se puede observar que en los felinos los niveles de cortisol fecal son usualmente más altos que para los cánidos, lo cual puede explicarse por las diferentes vías de excreción, ya que se ha demostrado previamente que los felinos excretan esta hormona principalmente por heces, a diferencia de los cánidos que eliminan la mayor parte a través de la orina<sup>(76)</sup>.

Por otro lado, se observó que la producción de IgA fue mayor en los lobos que en los jaguares. Además de las diferencias biológicas que pudieran existir, la selectividad de los alimentos puede tener un efecto en este aspecto, siendo los cánidos mucho más propensos a probar todo tipo de

cosas, aún aquellas que no representan alimento. Al hacer las extracciones de esteroides y las solubilizaciones de proteínas, se encontró una gran cantidad de piedras, ramas, plásticos y otros materiales en las heces de las lobas; las heces de jaguares no contenían este tipo de objetos. Esto se refuerza con las observaciones que se han hecho en roedores aislados de agentes patógenos que no desarrollan placas de Peyer visibles macroscópicamente hasta que son expuestos a ambientes contaminados<sup>(52)</sup>. Otra posible explicación podría ser una mayor participación de IgM dentro del intestino de felinos, pues se ha visto que tienen una cantidad mayor de linfocitos intraepiteliales expresando IgM que en otras especies, por lo que se requieren estudios posteriores que aclaren la participación de cada tipo de inmunoglobulina en esta familia de carnívoros<sup>(85)</sup>.

Es importante mencionar que durante el periodo de estudio no se presentaron ningún tipo de patologías en los animales, tampoco se reportaron casos en los cuales se haya alterado su manejo zootécnico.

De los dos tipos de análisis estadístico que se hicieron, se decidió considerar al modelo lineal mixto como el válido, debido a que este toma en cuenta la condición de no independencia de las muestras, a diferencia de la prueba de Kruskal Wallis.

En cuanto a las mediciones de inmunoglobulinas, se encontró un marcado decremento en los niveles de IgA en las lobas después del periodo de alta afluencia de público. En el caso de cortisol en las lobas, el análisis paramétrico de los valores normalizados no reveló ninguna diferencia significativa.

Los niveles de cortisol no mostraron diferencias significativas en los jaguares, pero los niveles de IgA sí mostraron diferencias significativas en un caso (Tulum). Respecto a los jaguares, para los niveles de IgA se encontraron diferencias marginales ( $P = 0.0508$ ) que muestran que los

niveles de IgA antes de semana santa fueron menores que en los periodos posteriores. En el caso individual de la hembra Tulum el análisis estadístico mostró diferencias significativas con la misma tendencia, la cual no pudo relacionarse a niveles altos de cortisol ya que no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, gráficamente se observó una tendencia positiva en los niveles de cortisol durante el mismo periodo. Lamentablemente no fue posible relacionar esto con alguna situación estresante, ya que Tulum sólo sale al exhibidor los lunes, el día de menor afluencia de público y los registros médicos no reportan ningún acontecimiento fuera de la rutina.

El hecho de encontrar resultados más consistentes en las lobas puede atribuirse a la homogeneidad de los individuos, pues las lobas eran hermanas, del mismo sexo, todas eran individuos jóvenes, alojadas en el mismo albergue y con el mismo manejo; mientras que los jaguares presentaban mucha variabilidad en edades, origen, manejo, además de que de los cinco sólo uno era hembra.

El caso del sexo de los individuos cobra mayor importancia, pues aunque Pifarré (2004) no encontró diferencias entre sexos evaluando niveles de cortisol fecal en lobo mexicano, Hernández (2006) reporta que en varias especies de cánidos (lobo mexicano y coyotes) y felinos (león africano y ocelote) es posible que las hembras tengan mayor dificultad para afrontar situaciones estresantes debido a que después del estímulo estresante, los niveles de cortisol tardan más en regresar a niveles basales en comparación con los machos. El hecho de que los niveles de cortisol se mantengan altos por un periodo prolongado tendría un mayor efecto en los parámetros inmunológicos estimulando principalmente a los RG, lo cual podría explicar el marcado descenso en los niveles de IgA fecal en las lobas y Tulum y, al mismo tiempo, justificaría parcialmente la falta de este en el caso de Ikbal, así como la rápida recuperación de Tikal después de semana santa.

---

Es importante considerar que en este estudio la medición de cortisol se realizó utilizando la técnica de extracción con éter dietílico, que resulta menos eficiente que aquellas en las que se usan etanol o metanol<sup>(48, 60)</sup>; la técnica fue elegida debido a la disponibilidad de recursos en el laboratorio. Otro punto a considerar es que la técnica de inmunoensayo competitivo utilizada para medir cortisol es menos precisa que el radioinmunoensayo, pero tiene la ventaja de no usar elementos radioactivos y por tanto se puede realizar en laboratorios no autorizados para este tipo de productos<sup>(36, 38)</sup>. Se recomienda al Laboratorio de Reproducción realizar otras técnicas de extracción de esteroides que sean más eficientes.

Por otro lado, los niveles de IgA fueron medidos a través de un inmunoensayo directo (ELISA Sándwich), el cual tiene mucha más precisión que el ensayo competitivo usado para cortisol<sup>(36, 38)</sup>.

Se encontró una correlación entre los niveles de IgA y cortisol desfasando los valores tres días, considerando que los efectos de la hormona sobre las concentraciones fecales de IgA pudieran ser retardados. Durante el periodo anterior a semana santa, durante el cual se considera que las condiciones en cuanto al público visitante son las habituales, el coeficiente fue de -0.21, el cual es denota un efecto muy leve. En las siguientes dos etapas analizadas en conjunto esta relación negativa se incrementó a -0.35, lo cual pudiera atribuirse a los efectos estresantes causados por la gran cantidad de visitantes al zoológico. Estos coeficientes no distan mucho de lo reportado por Bennett (1993), quien encontró una relación de -0.22 entre cortisol e IgA en saliva de humanos. Por otro lado Royo (2004) reporta un coeficiente de -0.53 entre corticosterona e IgA en ratas cateterizadas, sin embargo, no encontró ninguna relación entre estos parámetros en ratas sometidas a cirugía, por lo que concluyó que la corticosterona es un mejor indicador del estrés agudo que las inmunoglobulinas A, mientras que ambos

son buenos indicadores de estrés crónico. Sin embargo aún es necesario evaluar si es que existen diferencias por especie o sexo.

Eriksson (2004) reporta en un estudio en que se evaluó el efecto del confinamiento en ratas, que las concentraciones medias diarias de corticosterona secretadas no se afectaron de manera considerable, mientras que la excreción fecal de IgA fue significativamente menor 3 días después del periodo de confinamiento, lo cual coincide con los hallazgos de este estudio.

Al no encontrarse correlación entre los niveles de cortisol e IgA fecales en jaguares, no fue posible hacer la comparación entre especies.

Los niveles de IgA presentaron una gran variabilidad entre individuos, mientras que la loba dominante presentó concentraciones de 1,000 a 25,000  $\mu\text{g/g}$  heces, los de la hembra omega se encontraban entre 500 y 8,000  $\mu\text{g/g}$  heces. En el caso de los jaguares, los valores de IgA de Tulum se encontraban entre 500 y 10,000  $\mu\text{g/g}$  heces, para Ikbal entre 200 a 5,000  $\mu\text{g/g}$  heces y Tikal de 400 a 1,500  $\mu\text{g/g}$  heces. Esto concuerda con los resultados del análisis del modelo mixto en el cual se encontró que en los jaguares los niveles de IgA variaron principalmente dependiendo del individuo, a diferencia de la secreción de cortisol que se afectó primordialmente por los efectos del tiempo transcurrido durante el estudio.

Estas variaciones entre individuos concuerdan con Royo (2004) quien reporta una gran variabilidad entre individuos, obteniendo valores hasta diez veces mayores de una rata a otra.

Durante el tiempo que duró el estudio no se presentaron casos de ninguna enfermedad en ninguno de los individuos. Es posible que la reducción en secreción de IgA no fuera suficiente para causar problemas clínicos, sino sólo un factor predisponente que, gracias a las buenas condiciones en que se encuentran alojados los individuos, no se relacionó con ninguna complicación.

El manejo de las heces para la determinación de cortisol no incluyó tratamientos deshidratantes, ya que algunos autores reportan variaciones en los niveles de esteroides debidos a estos procedimientos<sup>(54, 87)</sup>, además de concluir que la desecación de las muestras fecales no es necesaria para la evaluación de hormonas esteroidales<sup>(73, 78)</sup>. En este estudio se observó que el porcentaje de humedad en las heces no implica variaciones considerables en las mediciones de IgA, encontrando una correlación de 0.98 entre los valores calculados con base en el peso seco y húmedo.

El hecho de haber obtenido reducciones tan marcadas en los niveles de IgA en las muestras expuestas al medio ambiente por 2 ó 3 días (62 y 81 %, respectivamente) nos hace concluir que para aplicar esta técnica es necesario tener un buen nivel de control sobre los animales para poder asegurarse de que las muestras obtenidas sean lo más frescas posibles ya que, al igual que con los niveles de cortisol, los principales cambios ocurren durante las primeras 24 h<sup>(92)</sup>.

El reducido número de individuos muestreados en este estudio impide hacer generalizaciones sobre los resultados, por lo que sólo se reportan como hallazgos de un caso particular en el Zoológico de Chapultepec.

Tomando en cuenta los resultados preliminares obtenidos en este estudio se recomienda realizar estudios posteriores a mayor escala que adicionalmente podrían relacionarse otro tipo de indicadores fisiológicos o procesos patológicos. Además de la evaluación de los efectos del estrés, la medición de inmunoglobulinas podría tener otras aplicaciones, como son:

- Influencia de otras hormonas sobre el sistema inmune, una de las más estudiadas es el estradiol, en este aspecto se encuentran varios estudios sobre los efectos de la hormona sobre el proceso de maduración de linfocitos B y los cambios debidos al ciclo estral<sup>(23, 51, 61)</sup>, de hecho se ha visto que la linfopoesis se ve disminuida en

hembras gestantes o en individuos tratados con estrógenos, mientras que esta se eleva en machos castrados, hembras ovariectomizadas y ratones deficientes en receptores de andrógenos<sup>(51)</sup>; pero aún no se han hecho estudios sobre estos efectos en animales silvestres.

- Efectos y evaluación de vacunas, especialmente para el desarrollo de vacunas nasales y orales que ya se usan en animales domésticos<sup>(23, 18, 50, 70)</sup> pues se ha visto la respuesta inmune en mucosas se estimula de manera más eficaz con la aplicación local del antígeno<sup>(85)</sup>
- Alteraciones inmunes por medicamentos que generalmente no se consideran como inmunodepresores, como el caso de pacientes epilépticos que deben tomar anticonvulsivos (carbamacepina y zonisamida) o aquellos que requieren de antirreumáticos (sulfasalazina) por periodos prolongados en los cuales se ha encontrado hipogamaglobulinemia<sup>(30, 56)</sup>
- Variaciones en la respuesta inmune debidas a la edad, no sólo en comparaciones con pacientes geriátricos, también se ha visto que los perfiles de inmunoglobulinas varían en las primeras etapas de desarrollo, dependiendo del tipo de mucosa<sup>(8, 11, 44, 75)</sup>, los niveles de IgA pueden tardar en alcanzar niveles adultos en perros hasta un año<sup>(19)</sup>
- Alteraciones inmunes por tóxicos como los metales pesados<sup>(89)</sup>
- Diagnóstico de enfermedades. La deficiencia selectiva de IgA es la inmunodeficiencia primaria más común en el hombre y se atribuye una condición similar a los perros<sup>(18, 21, 25, 30, 41)</sup>, pero este tipo de diagnósticos aún son muy escasos en medicina veterinaria

## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo I. Efectos generales de los glucocorticoides

De una forma más específica los efectos de los GCs en el aparato cardiovascular incluyen aumento en la presión sanguínea y el gasto cardiaco por un efecto positivo inotrópico estimulando la síntesis de epinefrina, además de prolongar las acciones de las catecolaminas en las placas neuromusculares al inhibir la recuperación y degradación de catecolaminas; también promueven la sensibilidad cardiovascular a las catecolaminas al aumentar la capacidad de unión y la afinidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el músculo liso de las arterias<sup>(74)</sup>.

Se considera que algunos efectos de los niveles basales de los GCs son preparativos para una situación estresante posterior, entre ellos se pueden mencionar un aumento en las concentraciones de glucosa circulante al estimular el apetito, aumento de la glucogenolisis y gluconeogénesis, así como la movilización de lípidos a través de la lipólisis en los adipocitos. De esta manera se asegura que la respuesta ante un estresante pueda ser más duradera<sup>(12, 65, 74, 77)</sup>.

El sistema nervioso también se ve afectado durante una situación estresante aumentando el flujo sanguíneo y la utilización cerebral de glucosa por un efecto del eje SMA en los primeros segundos, pero después los GCs inhiben el transporte de glucosa en las neuronas y células de la glia translocando los transportadores de glucosa de la superficie hacia lugares de almacenamiento intracelular. La formación de la memoria también es afectada, pues los estresantes agudos la aumentan, un fenómeno posiblemente mediado por las catecolaminas al aumentar el flujo sanguíneo; los efectos de los GCs en este aspecto son más complejos y se centran en el hipocampo que posee tanto RMs como RGs. Se ha visto que los niveles

basales promueven la excitabilidad del hipocampo, mientras que los niveles altos tienen efectos opuestos causando hiperpolarización prolongada; a lo anterior hay que sumar la disminución en el transporte de glucosa, por lo que el estrés prolongado causa atrofia de los procesos neurales del hipocampo e incluso muerte neuronal<sup>(12, 65, 74)</sup>.

En cuanto a la fisiología reproductiva las situaciones estresantes causan un decremento en las concentraciones portales de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés) y por consiguiente en la liberación de gonadotropinas. Estos efectos son provocados por la CRH, opioides y GCs. Fuera del sistema nervioso, los GCs reducen la respuesta gonadal a la hormona luteinizante (LH) al disminuir sus receptores, además de actuar directamente en los testículos inhibiendo la síntesis de testosterona y la espermatogénesis, aunque algunas células son capaces de protegerse por la acción de  $11\beta$ -HSD2<sup>(28, 55, 74)</sup>.

## **8.2 Anexo II. Apoptosis linfocitaria**

La definición molecular de apoptosis puede basarse en la actividad proteolítica de ciertas caspasas dado que estas enzimas son las mediadoras del proceso de muerte celular programada; en este caso no se requiere de un proceso inflamatorio previo<sup>(20)</sup>. Tanto los linfocitos T como B expresan la molécula receptora Fas, la cual al unirse con su ligando (FasL) induce muerte celular por apoptosis; esta unión se puede dar de manera directa al entrar en contacto dos células, o por difusión del ligando, ya que tanto Fas como el factor de necrosis tumoral (FNT) pueden ser liberados de la superficie celular<sup>(80, 88)</sup>. La interacción ligando-receptor de esta molécula induce apoptosis activando a una familia de enzimas llamadas caspasas iniciadoras (ejem. Caspasas 8 y 9), las cuales son responsables de los primeros eventos proteolíticos que degradan el citoesqueleto. Al mismo tiempo provocan otro

tipo de cambios celulares como el traslado de fosfatidilserina del lado interno al externo de la membrana celular por alteraciones en el funcionamiento de las translocasas que mantienen la asimetría membranal; se cree que este cambio es una señal de fagocitosis para los macrófagos. El punto de no retorno ocurre cuando se activan las caspasas ejecutoras (ejem. 1, 3, 6), ya sea directamente o a través de la disfunción mitocondrial; este último proceso se encuentra regulado por las proteínas mitocondriales de la familia bcl – 2, las cuales tienen la capacidad de promover o inhibir la apoptosis dependiendo de su concentración. La manera en que estas proteínas actúan aún no se define, algunas hipótesis son: 1) la homodimerización de las proteínas es una acción promotora, mientras que la heterodimerización es inhibitoria; 2) la habilidad de formar dímeros depende de la presencia de detergentes; 3) ejercen un control sobre la liberación de las preformas de las caspasas ejecutoras de la mitocondria; 4) control de la liberación de otras moléculas promotoras como la citocromo C oxidasa, la cual al ser liberada activa a las caspasas ejecutoras. Finalmente las caspasas ejecutoras son las responsables de la degradación del material genético activando a las endonucleasas (ej. factor de degradación de ADN) al tiempo que se inhabilitan los mecanismos de reparación del ADN como la poli (ADP-ribosa) polimerasa<sup>(14, 33)</sup>.

La expresión de FasL se ha observado en linfocitos T activados y células NK<sup>(80, 88)</sup> y se ha visto que en linfocitos puede ser activado por GC, involucrando moléculas como caspasa 8, APAF – 1, Bax y Bak<sup>(77)</sup>. Cabe mencionar que naturalmente se produce una alta tasa de apoptosis en los linfocitos inmaduros como forma de selección para evitar enfermedades autoinmunes<sup>(37, 80, 88)</sup>. Brunnetti (1995) reporta que los linfocitos T recién activados son inmunes a los efectos de los GCs, pero se volvían sensibles después de cultivarlos por siete días, especialmente los CD 8<sup>+</sup>.

Probablemente los linfocitos T recién activados se encuentran protegidos por la acción de las IL – 2, 4 y 10; sin embargo, el mecanismo de acción no se detalla en este artículo, pero Schmidt (2004) reporta que el efecto protector de IL – 6 está relacionado con la tirosin-cinasa relacionada con adhesión focal (RAFTK). En este estudio no se encontró relación entre el grado de sensibilidad y el número de RG en los linfocitos, lo cual también es mencionado por Schmidt (2004) quien explica que el mantener altos niveles de RG es necesario, pero no suficiente para el proceso de muerte celular.

El proceso de apoptosis inducido por GCs, se encuentra mediado por la acción represora del RG. Un ejemplo de esto es la interferencia que ejerce sobre AP-1, factor que regula la expresión de genes involucrados en el crecimiento, diferenciación y transformación celular. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la acción activadora del RG también se requiere en este proceso, cuando la proteína asociada a la muerte (PAM3) se une con el RG promoviendo la apoptosis<sup>(14)</sup>.

El proteasoma multicatalítico (PM) es un complejo de proteasas que se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo que degradan proteínas marcadas para su destrucción por el proceso de poliubiquitinización, recientemente se le ha relacionado con los procesos de muerte celular, posiblemente al degradar proteínas que inhiben la apoptosis como AP-1, NFκ-B e IAPs (proteínas que bloquean caspasas); su acción es antagonizada por la sobreexpresión de Bcl – 2 y los antioxidantes<sup>(14)</sup>.

Las IL – 9, 4, 6 y 15, así como factores de crecimiento semejantes a la insulina contrarrestan los efectos de los GCs al aumentar la expresión de factores de transcripción relacionados con los genes de supervivencia (AP-1, NFκ-B); en respuesta, en las células expuestas a GCs se induce la expresión de Iκ-B, factor involucrado en la inhibición de la síntesis de citocinas<sup>(14, 34)</sup>.

La apoptosis inducida por GCs se encuentra regulada, tanto positiva como negativamente, por las proteínas de la familia Bcl – 2, pero su mecanismo exacto no se conoce. Existe evidencia de que la sobreexpresión de los miembros antiapoptóticos de Bcl – 2 evita que el PM degrade a cFos y aumenta la unión de NFκ-B al ADN, pero no previene la inducción de Iκ-B<sup>(14, 34)</sup>. Entre los miembros proapoptóticos se encuentran Bax y Bak (Bid, Bad, Bim), que se ha visto que son capaces de iniciar la disfunción mitocondrial y la liberación del citocromo C<sup>(14)</sup>.

A pesar de la evidencia de la regulación mediada por el receptor sobre la activación o represión genética, aún no se ha podido identificar la red o redes de genes que se involucran en el proceso de muerte celular. Alrededor de 900 genes se han reportado como regulados por GC, pero de estos solo aproximadamente 70 aparecen en más de una publicación; esto hace aparecer la posibilidad de que existan múltiples caminos para el ejercicio de estos efectos<sup>(14, 77)</sup>. Entre los más reportados están la regulación positiva de Iκ-B, del receptor de TGF-β y Bim<sup>(77)</sup>.

Por otro lado, existe un conocimiento considerable sobre las caspasas involucradas en la apoptosis y su secuencia de activación, sin embargo no se conoce el mecanismo que lo inicia, aunque se han implicado algunos miembros proapoptóticos de la familia de proteínas Bcl – 2. Probablemente el balance entre la acción pro-supervivencia de los factores de crecimiento y la acción proapoptótica de los GCs lo que finalmente define el destino de la célula. Aparentemente los GCs se oponen a la acción de los factores de crecimiento. Los factores de crecimiento aumentan la actividad de ciertos factores de transcripción que median la expresión de genes involucrados en la proliferación celular, estos mismos factores son afectados de manera negativa por los GCs y por el PM<sup>(14)</sup>.

Otros reportes indican que en el timo y otros tejidos linfoides inducen apoptosis en linfocitos inmaduros, probablemente a través de ERGs activando los "genes de la muerte"<sup>(74)</sup>.

De una forma alternativa, los GC inducen apoptosis por (dis)regulación de genes relacionados con estrés y daño celular, como aquellos que afectan procesos metabólicos o de respuesta a radicales de oxígeno (inducción del inhibidor de tioredoxina), control de pH y volumen intracelular (represión del transportador de lactato) y que finalmente activan la cascada apoptótica<sup>(77)</sup>.

Los opioides (también producidos en situaciones estresantes) inducen apoptosis e hipoplasia en timo y bazo, así como reducción en la tasa de proliferación en la médula ósea; esto podría explicarse con el hecho de que la aplicación *in vivo* de opioides incrementa la expresión de Fas en linfocitos, efecto que se bloquea con la aplicación de naltrexona (antagonista opioide). Algunos autores han reportado que los linfocitos T inmaduros son más susceptibles a los efectos de los opioides, por otro lado estudios con roedores reportan que la apoptosis de linfocitos causada por contención física requiere de opioides endógenos<sup>(80)</sup>.

Aunque se ha demostrado el papel de Fas en la apoptosis linfocitaria, el origen de FasL aún no se ha determinado con exactitud. Revisiones de literatura sugieren que la muerte celular de linfocitos inmaduros se encuentra mediada por el eje HHA, mientras que la muerte celular de linfocitos maduros probablemente se relaciona con la acción de opioides endógenos<sup>(80)</sup>.

### 8.3 Anexo III. Cuadros estadísticos

<b>Cuadro A. Niveles de IgA fecal por épocas en tres hembras de lobo mexicano</b>			
	R1	R2	R3
Sumatoria	7977	3511	3047
Ri <sup>2</sup>	63,632,529	12,327,121	9,284,209

ni	79	37	54
Ri <sup>2</sup> /ni	805,475.1 <sup>a</sup>	333,165.4 <sup>a</sup>	17,1929.8 <sup>b</sup>
Hc	28	(P<0.005)	

R1= antes de semana santa

R2= durante semana santa

R3= después de semana santa

Valores con diferente literal son significativamente diferentes

<b>Cuadro B. Niveles de IgA fecal en tres hembras de lobo mexicano días altos y bajos</b>		
	R1	R2
Sumatoria	6046	8489
Ri <sup>2</sup>	36,554,116	72,063,121
ni	69	101
Ri <sup>2</sup> /ni	529769.8	713496.3
Hc	0.2	(No es significativo)

R1= días de alta afluencia de público

R2= días de baja afluencia de público

<b>Cuadro C. Niveles de IgA fecal en la hembra dominante</b>			
	R1	R2	R3
Sumatoria	229	109	97
Ri <sup>2</sup>	52,441	11,881	9,409
ni	12	6	11
Ri <sup>2</sup> /ni	4,370.1 <sup>a</sup>	1,980.2 <sup>a</sup>	855.4 <sup>b</sup>
Hc	9.4	(P<0.01)	

R1= antes de semana santa

R2= durante semana santa

R3= después de semana santa

Valores con diferente literal son significativamente diferentes

<b>Cuadro D. Niveles de cortisol fecal en tres hembras de lobo mexicano</b>			
	R1	R2	R3
Sumatoria	4561	2,976	4,398
Ri <sup>2</sup>	20,802,721	8,856,576	19,342,404
ni	60	42	52
Ri <sup>2</sup> /ni	346,712 <sup>ab</sup>	210,871 <sup>a</sup>	371,969 <sup>b</sup>
Hc	8.4	(P<0.025)	

R1= antes de semana santa

R2= durante semana santa

R3= después de semana santa

Valores con diferente literal son significativamente diferentes

<b>Cuadro E. Niveles de cortisol fecal en tres hembras de lobo mexicano días altos y bajos</b>		
	R1	R2
Sumatoria	5270	6665
Ri <sup>2</sup>	27772900	44422225
ni	71	83
Ri <sup>2</sup> /ni	391167.6	535207.5
Hc	0.7	(No es significativo)

R1= días de alta afluencia de público

R2= días de baja afluencia de público

<b>Cuadro F. Niveles de cortisol fecal en la hembra dominante</b>			
	R1	R2	R3
Sumatoria	114	43	168
Ri <sup>2</sup>	12996	1849	28224
ni	8	6	11
Ri <sup>2</sup> /ni	1624.5 <sup>a</sup>	308.2 <sup>b</sup>	2565.8 <sup>a</sup>
Hc	5.04	(P<0.09)	

R1= antes de semana santa

R2= durante semana santa

R3= después de semana santa

Valores con diferente literal son significativamente diferentes

<b>Cuadro G. Niveles de IgA fecal en jaguar "Tulum"</b>			
	R1	R2	R3
Sumatoria	53	94	84
Ri <sup>2</sup>	2,809	8,836	7,056
ni	8	6	7
Ri <sup>2</sup> /ni	351.1 <sup>a</sup>	1472.7 <sup>b</sup>	1008 <sup>ab</sup>
Hc	7.6	(P<0.01)	

R1= antes de semana santa

R2= durante semana santa

R3= después de semana santa

Valores con diferente literal son significativamente diferentes

<b>Cuadro H. Niveles de IgA fecal en jaguar "Tikal"</b>			
	R1	R2	R3
Sumatoria	26	13	52
Ri <sup>2</sup>	676	169	2704

ni	4	3	6
Ri <sup>2</sup> /ni	169 <sup>ab</sup>	56.3 <sup>a</sup>	450.7 <sup>b</sup>
Hc	13	(P<0.005)	

R1= antes de semana santa

R2= durante semana santa

R3= después de semana santa

Valores con diferente literal son significativamente diferentes

<b>Cuadro I. Niveles de cortisol fecal en la hembra dominante de lobo mexicano por periodos de alta afluencia de público</b>			
	R1	R2	R3
Sumatoria	129	120	76
Ri <sup>2</sup>	16641	14400	5776
ni	11	7	7
Ri <sup>2</sup> /ni	1512.8 <sup>a</sup>	2057.1 <sup>b</sup>	825.1 <sup>a</sup>
sumatoria	4395.1039		
Hc	12.9	P<0.001	

R1= 20 de marzo al 8 de abril

R2= 9 al 30 de abril

R3= 1 al 20 de mayo

Valores con diferente literal son significativamente diferentes

<b>Cuadro J. Niveles de cortisol fecal en tres hembras de lobo mexicano por periodos de alta afluencia de público</b>			
	R1	R2	R3
Sumatoria	3416.5	3584	2729.5
Ri <sup>2</sup>	11672472	12845056	7450170
ni	51	50	38
Ri <sup>2</sup> /ni	228872 <sup>a</sup>	256901.1 <sup>b</sup>	196057.1 <sup>b</sup>
sumatoria	681830.2		
Hc	9.5	P<0.01	

R1= 20 de marzo al 8 de abril

R2= 9 al 30 de abril

R3= 1 al 20 de mayo

Valores con diferente literal son significativamente diferentes

**Cuadro K. ANDEVA de los valores normalizados de IgA fecal en las tres lobas**

Origen	GL*	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr > F
Modelo	2	10.03728516	5.01864258	7.58	0.0010
Error	76	50.31588511	0.66205112		

Total	78	60.35317026			
-------	----	-------------	--	--	--

\*GL = grados de libertad

**Cuadro L. ANDEVA valores normalizados de IgA fecal en jaguares**

Origen	GL*	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr > F
Modelo	2	4.69674904	2.34837452	3.18	0.0508
Error	46	33.94278781	0.73788669		
Total	48	38.63953685			

\*GL = grados de libertad

**Cuadro M. ANDEVA de los valores normalizados de IgA fecal en Tulum**

Origen	GL*	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	Pr > F
Modelo	2	4.40559263	2.20279632	5.46	0.0140
Error	18	7.26272095	0.40348450		
Total	20	11.66831358			

\*GL = grados de libertad

## 9. LITERATURA CITADA

- 1 Andrew V, River T, Rivel C. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological Reviews* 1999; 79 (1): 1 – 71
- 2 Arita, H. T. y G. Rodríguez. 2004. Patrones geográficos de diversidad de los mamíferos terrestres de América del Norte. Instituto de Ecología, UNAM. Base de datos SNIB-Conabio proyecto Q068. México, D.F.
- 3 Beehner JC, Whitten PL. Modifications of a field method for fecal steroid analysis in baboons. *Physiol Behav* 2004; 82: 269 – 277
- 4 Beerda B, Schilder MBH, van Hoof J, de Bries HW. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 1997; 52: 307 – 319
- 5 Beltrán PC, Flores SG, Orea SM, Gómez VJ, Serrano ME, Sevilla FP, Juárez RY, Estrada PS. Implicaciones psicológicas, inmunológicas y endocrinológicas en la dermatitis atópica. *Revista Alergia México* 2003; L(2): 54 – 59
- 6 Bennett HT, Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosomatic Medicine* 1993; 55: 364 – 379
- 7 Benson S, Nagel R. Endangered species. Volume 1 Mammals. Thomson Gale U.S.A. 2004
- 8 Blount DG, Pritchard DI, Heaton PR. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005; 108: 399 – 407
- 9 Brandtzaeg P. Basic mechanisms of mucosal immunity – a major adaptive defense system. *The immunologist* 1995; 3 (3): 89 – 96

- 10 Brunetti M, Martelli N, Colasante A, Piantelli M, Musiani P, Aiello FB. Spontaneous and Glucocorticoid-Induced Apoptosis in Human Mature T Lymphocytes. *Blood* 1995; 86 (11): 4199 – 4205
- 11 Campbell DJ, Rawlings JM, Koelsch S, Wallace J, Strain JJ, Hannigan BM. Age-related differences in parameters of feline immune status. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004; 100: 73 – 80
- 12 Cunningham JG. Fisiología veterinaria. España 2003
- 13 Decaro N, Pratelli A, Tinelli A, *et al.* Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus. *Clin Diag Lab Immunol* 2004; 11: 102 – 105
- 14 Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 2002; 9: 6 – 19
- 15 Downing JEG, Miyan JA. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunology Today* 2000; 21 (6): 281 – 289
- 16 Eriksson E, Royo F, Lyberg K, Carlsson HE, Hau J. Effect of metabolic cage housing on immunoglobulin A and corticosterone excretion in faeces and urine of young male rats. *Exp Physiol* 2004; 89 (4): 427 – 433
- 17 Failla ML. Glucocorticoids decrease survival of immature human B cells *in vitro*. *Exp Biol Med* 2003; 228: 879
- 18 Felsburg PJ, Glickman LT, Jezyk P. Selective IgA deficiency in the dog. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; 36; 297 – 305
- 19 Felsburg PJ. Overview of immune system development in the dog: comparison with humans. *Human & Experimental Toxicology*, 2002; 21: 487 –492

- 20 Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 2005; 73 (4): 1907 – 1916
- 21 Fisher MA, Cavazza-Calvo GM, De Saint Basile G, DeVillartay JP, Di Santo JP, Hirovoz C, Rieux-Laucat F, Le Deist F. Naturally occurring primary immune deficiencies of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1997;15: 93 – 124
- 22 Fournier P, Fournier-Chambrillon C, Vié JC. Immobilization of wild kinkajous (*Potos flavus*) with medetomidine-ketamine and reversal by atipamezole *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 1998; 29(2): 190 – 194
- 23 Gallichan WS, Rosenthal KL. Effects of the Estrous Cycle on Local Humoral Immune Responses and Protection of Intranasally Immunized Female Mice against Herpes Simplex Virus Type 2 Infection in the Genital Tract. *Virology* 1996; 224 (2): 487 – 497
- 24 Ganong WF. Fisiología Médica. Manual Moderno. México 2006
- 25 German AJ, Hall EJ, Day MJ. Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1998; 64: 107 – 121
- 26 Gese EM, Schultz RD, Johnson MR, Williams ES, Crantree RL, Ruff RL. Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park, Wyoming *Journal of Wildlife Diseases* 1997; 33(1): 47 – 56
- 27 Ginel PJ, Novales M, Lozano MD, Molleda JM, López R. Local secretory IgA in dogs with low systemic IgA levels. *Veterinary Record* 1993; 132: 321 – 323

- 28 Graham LH, Brown JL. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function on endangered felids. *Zoo Biology* 1996; 15: 71 – 82
- 29 Greenberg N, CA, Summers CH. Causes and consequences of stress. *Integ and Comp Biol* 2002; 42: 508 – 516
- 30 Hammarström L, Vorechovsky I, Webste D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical & Experimental Immunology* 2000; 120 (2): 225 – 232
- 31 Hau J, Andersson E, Carlsson HE. Development and validation of a sensitive ELISA for quantification of secretory IgA in rat saliva and faeces. *Lab Animals* 2001; 35: 301 – 306
- 32 Hernández MSE. Evaluación del comportamiento y respuesta adrenocortical en cuatro especies de carnívoros silvestres (lobo mexicano, coyotes, león africano y ocelote) ante su ubicación en nuevos albergues. Tesis de Maestría, FMVZ – UNAM 2006
- 33 Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embriol* 1999; 200: 1 – 18
- 34 Igarashi H, Medina KL, Yokota T, Rossi MI, Sakaguchi N, Comp PC, Kincade PW. Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids. *Int Immunol* 2005; 17 (5): 501 – 511
- 35 INEGI. Cuaderno Estadístico Delegacional. Miguel Hidalgo. México D.F., 1998
- 36 Jack RC. Basic Biochemical Laboratory Procedures and Computing. Oxford University Press, USA 1995
- 37 Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5<sup>th</sup> edition. Garland Publishing. USA 2001

- 38 Johnstone AP, Turner MW. Immuno – Chemistry. A practical approach. IRL Press at Oxford University Press. U.K. 1997
- 39 Kaps M, and Lamberson W. Biostatistics for animal science. CABI Publishing 2004. UK.
- 40 Kaufmann SE, Sher A, Ahmed R. Immunology of Infectious Diseases. *ASM Press* ; USA 2002
- 41 Kerr MA. The structure and function of human IgA. *Biochem J* 1990; 271: 285 – 296
- 42 Khan MZ, Altman J, Isani SS, Yu J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *Gen Comp Endocrinol* 2002; 128: 57 – 64
- 43 Kuehl R. Diseño de experimentos 2<sup>a</sup> edición. Thomson Learning. México 2003
- 44 Kiyono H, Fukuyama S. Nalt – versus Peyer's – match – mediated mucosal immunity. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 699 – 710
- 45 Li G, Wang S, Gelehrter TD. Identification of glucocorticoid receptor domains involved in transrepression of transforming growth factor- $\beta$  action. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(43): 41779 – 41788
- 46 Lill-Elghanian D, Schwartz K, King L, Fraker P. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow. *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227:763-770
- 47 Littell R.C., Henry P. R., Ammerman C.B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci* 1998; 76: 1216-1231.
- 48 Lynch JW, Khan MZ, Altman J, Njahira MN, Rubenstein N. Concentrations of four fecal steroids in wild baboons: short-term

- storage conditions and consequences for data interpretation. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 132: 264 – 271
- 49 Lynch MJ, Thamindjis MA, Gardner H. Immobilisation of Pinniped Species *Aust Vet J* 1999; 77 (3):181-185
- 50 McGhee JR, Kiyono H. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. *Infect Agents Dis* 1993; 2 (2): 55 – 73
- 51 Medina KL, Garret KP, Thompson LF, Rossi MID, Payne KJ, Kincade PW. Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nature Immunology* 2001; 2 (8): 718 – 724
- 52 Mestecky J, Russell MW, Elson CO. Intestinal IgA: novel views on its function in the defense of the largest mucosal surface. *Gut* 1999; 44: 2 – 5
- 53 Miletic ID, Schiffman SS, Miletic VD, Sattely-Miller EA. Salivary IgA secretion rate in young and elderly persons. *Physiology and behavior* 1996; 60 (1): 243 – 248
- 54 Millspaugh JJ, Washburn BE. Within-sample variation of fecal glucocorticoid measurements. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 132: 21 – 26
- 55 Morato RG, Bueno MG, Malheister P, Verreschi ITN, Barnabe RC. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004; 37 (12): 1903 – 1907
- 56 Moschione APB, das Graças RM, Pastorino AC, da Paz JA, Bueno FFA, Miuki AJ. Secondary hypogammaglobulinemia after use of carbamazepine: case report and review. *Rev Hosp Clin* 2001; 56 (6): 189 – 192

- 57 Möstl E, Palme RP. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 2002; 23: 67 – 74
- 58 Mudappa D, Chellam R. Capture and Immobilization of Wild Brown Palm Civets in Western Ghats. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; 37(2): 383 – 386
- 59 Norma Oficial Mexicana NOM–ECOL–059–1994 que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. Publicada en el D.O.F. de fecha 16 de mayo de 1994
- 60 Ojeda ChJ. Mediciones de conducta y cortisol fecal como indicadores no invasivos de bienestar en jaguares (*Panthera onca*) cautivos y silvestres. Tesis de Maestría, FMVZ – UNAM 2002
- 61 Paavonen T, Andersson LC, Adlercreutz H. Sex hormone regulation of *in vitro* immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen stimulated cultures. *Journal of Experimental Medicine*, 1981; 154: 1935 – 1945
- 62 Peters RI, Calvert EL, Hall EJ, Day MJ. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11 (5): 841 – 848
- 63 Pifarré M. Efecto del público sobre comportamiento y cortisol fecal en el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio. Tesis de Maestría FMVZ – UNAM 2004
- 64 Pihl L, Hau J. Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats. *Lab Animals* 2003; 37: 166 – 171
- 65 Randall D, Bruggren W, French K. Eckert's Animal Physiology: mechanisms and adaptations. Freeman and Company. USA 2002

- 66 Rinkinen M, Teppo AM, Harmoinen J, Westermarck E. Relationship between canine mucosal and serum immunoglobulin A (IgA) concentrations: serum IgA does not assess duodenal secretory IgA. *Microbiol Immunol* 2003; 47 (2): 155 – 159
- 67 Rivas AL, Tintle L, Argentieri D, Kimbali ES, Goodman MG, Anderson DW, Capetola RJ, Quimby FW. A primary immune deficiency syndrome in Shar-pei dogs. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 74 (3): 243 – 251
- 68 Robinson JK, Blanchard TG, Levine AD, Emancipator SN, Lamm ME. A mucosal IgA-mediated excretory immune system *in vivo*. *Journal of Immunology* 2001; 166: 3688 – 3692
- 69 Royo F, Björk N, Carlsson HE, Mayo S, Hau J. Impact of chronic catheterization and automated blood sampling (Accusampler) on serum corticosterone and fecal immunoreactive corticosterone metabolites and immunoglobulin A in male rats. *Journal of Endocrinology* 2004; 180: 145 – 153
- 70 Russel MW, Mestecky J. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes and Infection* 2002; 4: 667 – 677
- 71 Salame A, Viguera RM, Herrera J, Mendieta E, Salgado IH, Castro A, Ramírez J. Inmunolocalización y contenido de esteroides sexuales en ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* Allen & Chapman, 1897 (Rodentia:Muridae) durante la primera mitad de la preñez. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 2003; 88: 43 – 57
- 72 Sánchez, O., M. A. Pineda., H. Benítez., B. González. y H. Berlanga. 1998. Guía de identificación para las aves y mamíferos silvestres de mayor comercio en México protegidos por la C. I. T. E. S.. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) -

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México, D.F.

- 73 Sands J, Creel S. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal Behaviour* 2004; 67: 387 – 396
- 74 Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 2000; 21 (1): 55 – 85
- 75 Schäfer-Somi S, Bär-Schadler S, Aurich JE. Immunoglobulins in nasal secretions of dog puppies from birth to six weeks of age. *Research in Veterinary Science* 2005; 78: 143 – 150
- 76 Schatz S, Palme R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications* 2001; 25 (4): 271 – 287
- 77 Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death and Differentiation* 2004; 11: S45 – S55
- 78 Schwarzenberger F, Möstl E, Palme R, Bamberg E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 1996; 42: 515 – 526
- 79 Shepherdson DJ, Carlstead KC, Wielebnowski N. Cross-institutional assessment of stress responses in zoo animals using longitudinal monitoring of faecal corticoids and behaviour. *Animal Welfare* 2004; 13: S 105 – 113

- 80 Shi Y, Devadas S, Greenelch KM, Yin D, Mufson RA, Zhou J. Stressed to death: implication for lymphocyte apoptosis for psychoneuroimmunology. *Brain, Behavior and Immunity* 2003; 17: S18 – S26
- 81 Siegel S, Castellan J. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. McGraw Hill International editions. 1988. USA. 2<sup>nd</sup> edition.
- 82 Sillero-Zubiri C. Field Immobilization of Ethiopian Wolves (*Canis simensis*) *Journal of Wildlife Disease* 1996; 32(1): 147 – 151
- 83 Snoek V, Peters IR, Cox E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res* 2006; 37: 455–467
- 84 Soto MA, Salame MA, Ramírez PJ, Yañez L, Armella MA. Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.) 2004; 20 (2): 187 – 196
- 85 Stokes C, Nashwa W. Mucosal defense along the gastrointestinal tract of cats and dogs. *Vet Res* 2006; 37 ; 281–293
- 86 Subauste CS. Primary immunodeficiencies and susceptibility to parasitic infections. *Parasitic Immunology* 2006; 28: 567 – 575
- 87 Terio KA, Brown JL, Moreland R, Munson L. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. *Zoo Biol* 2002; 21: 215 – 222
- 88 Tizard I. Inmunología veterinaria. Mc Graw Hill. México 2001
- 89 Undeger U, Basaran N, Canpinar H, Kansu E. Immune alterations in lead-exposed workers. *Toxicology* 1996; 109 (2-3): 167 – 72
- 90 Vaerman JP, Heremans JF. Origin and molecular size of immunoglobulin – A in the mesenteric lymph of the dog. *Immunology*, 1970; 18: 27 – 38

- 91 Vissoci REM, Vargas NSO, Kaminamo MH. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5: 617 – 25
- 92 Washburn BE, Millspaugh JJ. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. *Gen Comp Endocrinol* 2002; 127: 217 – 222
-