



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FMVZ

VALORES HEMATOLÓGICOS EN TRES ESPECIES DE TLACUACHES SIMPÁTRICOS  
EN EL ESTADO DE TABASCO:  
INDICADORES DE ESTRÉS EN CUATRO SITIOS CONTRASTANTES

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA:

**MVZ ARACELI MEJÍA BARRIO**

DRA. ALBA Z. RODAS MARTÍNEZ  
FMVZ, UNAM

DR. LUIS NÚÑEZ OCHOA  
FMVZ, UNAM

DR. RAFAEL ÁVILA FLORES  
FMVZ, UNAM

CDMX, MARZO 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## ÍNDICE

Resumen .....	1
Abstract.....	2
1. Introducción .....	3
2. Antecedentes .....	5
2.1 Urbanización.....	5
2.2 Salud y vida silvestre .....	6
2.2.1 Concepto “Una Salud” .....	7
2.3 Estrés .....	8
2.4 Uso del hemograma como indicador de salud.....	9
2.4.1 Leucograma de estrés.....	10
2.5 Marsupiales americanos.....	13
3. Objetivos.....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos particulares .....	15
4. Métodos .....	15
4.1 Diseño Experimental y área de estudio .....	15
4.2 Captura de ejemplares .....	17
4.3 Colecta y conservación de muestras .....	18
4.4 Análisis de muestras.....	19
4.5 Análisis de datos.....	20
5. Resultados .....	21
5.1 Descripción y comparación de valores hematológicos entre especies .....	22
5.2 Respuesta crónica al estrés. ....	29
5.2.1 Relación N/L (neutrófilo/linfocito).....	29
5.2.2 Relación N/E (neutrófilo/eosinófilo) .....	31
5.3 Respuesta aguda al estrés. ....	32
5.3.1 Relación N/L (neutrófilo/linfocito).....	32
5.3.2 Hematocrito (L/L).....	34
5.3.3 Eritrocitos nucleados .....	35
6. Discusión .....	37
6.1 Descripción y comparación de valores hematológicos entre especies .....	37

6.2 Respuesta crónica al estrés .....	40
6.2.1 Relación N/L .....	40
6.2.2 Relación N/E .....	42
6.3 Respuesta aguda al estrés .....	43
6.3.1 Relación N/L .....	43
6.3.2 Hematocrito .....	44
6.3.3 Eritrocitos nucleados .....	46
7. Conclusiones .....	46
8. Referencias .....	48
9. Anexos .....	56

## **CUADROS.**

Cuadro 1. ....	23
Cuadro 2. ....	24

## **FIGURAS.**

Figura 1.....	17
Figura 2.....	26
Figura 3.....	28
Figura 4.....	29
Figura 5.....	31
Figura 6.....	32
Figura 7.....	33
Figura 8.....	35
Figura 9.....	36

**Agradecimientos.**

## Resumen

Los tlacuaches son mamíferos abundantes del neotrópico que han logrado subsistir ante la urbanización, pero la información sobre su adaptación es escasa. Mediante el hemograma se evalúa el estado de salud, la situación biológica y ecológica en especies silvestres. Se analizaron patrones de respuesta fisiológica aguda y crónica mediante analitos del hemograma considerados indicadores de estrés, en poblaciones silvestres de *Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis* y *Philander opossum*. El estudio se realizó en cuatro localidades del estado de Tabasco con distintos grados de perturbación. Empleando contención física en 115 tlacuaches, se colectaron muestras consecutivas de sangre de la vena coccígea de cada individuo (tiempos A, B y C). Se procesaron las muestras en un laboratorio comercial, los leucocitos se evaluaron manualmente a partir de los frotis sanguíneos. Los datos fueron analizados con estadística no paramétrica. La especie *P. opossum* presentó el hematocrito, hemoglobina y las plaquetas con valores superiores a las especies del género *Didelphis*. La especie *D. virginiana* tuvo valores inferiores en los índices eritrocíticos volumen globular medio, hemoglobina globular media y concentración globular media de hemoglobina. En la respuesta crónica al estrés, la relación neutrófilo/linfocito (N/L) fue superior en el género *Didelphis* respecto al género *Philander*. *P. opossum* presentó valores superiores de la relación N/L en una zona más conservada respecto a una con mayor actividad antropogénica. Al evaluar la respuesta aguda al estrés, las tres especies mostraron incrementos consecutivos de la relación N/L, hematocrito y eritrocitos nucleados entre los tiempos A, B y C. *P. opossum* tuvo mayor reacción. El género *Didelphis* es más sensible al estrés crónico. Los tlacuaches de zonas más conservadas son más sensibles al estrés que los de zonas con mayor actividad antropogénica. En este trabajo se muestran como los factores estresantes influyen de manera aguda y crónica sobre estas especies.

Palabras clave: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*, hematología, zarigüeyas, relación N/L, leucograma de estrés.

## Abstract

The opossums are abundant mammals of the neotropics that have managed to survive in the face of urbanization, but information about their adaptation is scarce. Through haemogram the state of health, the biological and ecological situation in wild species is evaluated. Patterns of acute and chronic physiological response were analyzed using blood count analytes considered indicators of stress in wild populations of *Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis* and *Philander opossum*. The study was conducted in four locations in the state of Tabasco with varying degrees of disturbance. Using physical containment in 115 opossums, consecutive blood samples were collected from the coccygeal vein of each individual (times A, B and C). The samples were processed in a commercial laboratory, the leukocytes were manually evaluated from the blood smears. Data were analyzed with nonparametric statistics. The species *P. opossum* presented hematocrit, hemoglobin and platelets with values higher than the species of the genus *Didelphis*. The species *D. virginiana* had lower values in erythrocytic indices mean globular volume, mean globular hemoglobin and mean globular concentration of hemoglobin. In the chronic stress response, the neutrophil/lymphocyte (N/L) ratio was higher in the genus *Didelphis* than in the genus *Philander*. *P. opossum* presented higher values of the N/L ratio in a more conserved area compared to one with greater anthropogenic activity. When evaluating the acute response to stress, the three species showed consecutive increases in the N/L ratio, hematocrit and nucleated erythrocytes between times A, B and C. *P. opossum* had a greater reaction. The genus *Didelphis* is more sensitive to chronic stress. Opossums from more conserved areas are more sensitive to stress than those from areas with greater anthropogenic activity. This paper shows how stressors influence these species acutely and chronically.

Key words: *Didelphis marsupialis*, *Didelphis virginiana*, *Philander opossum*, hematology, opossums, N/L ratio, stress leukogram.

## 1. Introducción

La urbanización es un fenómeno de origen antrópico que se encuentra en constante expansión. Este hecho, ha generado efectos como la pérdida de especies silvestres, reducción y transformación de hábitats y/o cambios en las interacciones ecológicas (Meillère et al., 2015). A pesar de que la mayoría de las especies se han visto afectadas negativamente por los ambientes urbanos, otras, incluyendo especies nativas y exóticas, han logrado adaptarse e incluso han incrementado su abundancia bajo circunstancias adversas (Jokimäki et al., 2011; Meillère et al., 2015).

Sin embargo, aún entre las especies de fauna silvestre que pueden explotar los recursos que ofrecen las grandes ciudades, existen niveles extremos de urbanización que pueden desencadenar cambios fisiológicos en el organismo asociados al estrés (Bradley & Altizer, 2007). El estrés, es un fenómeno que en primera instancia se expresa como una respuesta de tipo aguda (inmediata), considerada benéfica porque permite a los individuos prepararse para responder ante una situación de riesgo (Partecke et al., 2006). Sin embargo, en condiciones prolongadas se transforma en una respuesta crónica (a largo plazo) que puede dirigir al individuo a situaciones que comprometan su estado general de salud (Sapolsky et al., 2000).

Para evaluar las respuestas causadas por situaciones estresantes y sus posibles efectos en el organismo, se requiere de técnicas rápidas, confiables y económicas que proporcionen datos sobre el estado fisiológico y de salud de un animal. Por ejemplo, en un seguimiento sanguíneo, la evaluación del hemograma, que incluye analitos eritrocíticos y leucocitarios, es una alternativa utilizada tanto en animales domésticos como silvestres (Kizhina et al., 2017; Maceda-Veiga et al., 2015). Tal es el caso de los vertebrados, donde la relación entre las proporciones de dos tipos de leucocitos como neutrófilos y linfocitos forman la relación N/L que se considera un indicador de estrés crónico. Este parámetro proporciona información aproximada sobre la respuesta inmune innata y adaptativa de un individuo ante situaciones estresantes al reflejar cambios en las concentraciones, razón por la cual ha sido muy utilizado para realizar estudios con enfoque ecofisiológico en poblaciones de fauna silvestre (Davis & Maney, 2018).

Este tipo de índices comenzaron a reportarse en trabajos orientados a la producción con fines zootécnicos de aves y peces domésticos. Cabe aclarar que en estos grupos de vertebrados las células leucocitarias involucradas en el índice son

heterófilo: linfocito (H/L) (Branton et al., 1997; Grzelak et al., 2017; Peutz et al., 1996). En fauna silvestre se ha utilizado este indicador en reptiles y anfibios (Davis et al., 2011; Davis & Maney, 2018) y, en años más recientes, también en aves como pingüinos y en mamíferos como roedores y primates entre otros (D'amico et al., 2014; Davis, Andrew, et al., 2008; Jerez et al., 2013; Smith IV, 2011). El índice N/L, además, puede complementarse evaluando otros analitos sensibles a este tipo de respuestas como eosinófilos (índice neutrófilo/eosinófilo, N/E), hematocrito y eritrocitos nucleados. Los parámetros mencionados también pueden presentar cambios ante situaciones de estrés de carácter tanto agudo como crónico, proporcionando información útil para el estudio de poblaciones silvestres de mamíferos (Harvey, 2012; Johnstone et al., 2015; Robel et al., 1996; Sánchez-Sarmiento et al., 2015).

Entre los mamíferos, algunos marsupiales americanos del orden Didelphimorphia son especies consideradas generalistas y oportunistas, debido a que son capaces de habitar en ambientes contrastantes con diferentes grados de perturbación antropogénica (Adler et al., 1997). El estado de Tabasco, en México, comprende parte del área de distribución geográfica de siete especies de didélfidos en simpatria, de los cuales *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander oposum* son los más abundantes. Poblaciones de estas especies habitan en áreas naturales y urbanizadas, manteniendo un estrecho contacto con las poblaciones humanas (Medina-Romero, Goyenechea & Castillo-Cerón, 2012).

A pesar de que México presenta diversidad de marsupiales (Medina-Romero et al., 2012), las investigaciones científicas sobre estas especies y particularmente sobre su fisiología son escasas. Ninguna de las tres especies de marsupiales más comunes, objeto de estudio de esta investigación, figura dentro de las categorías en riesgo de acuerdo con la NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010) ni en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN (Moraes et al., 2016; Pérez-Hernández, 2016; Pérez-Hernández et al., 2014). Sin embargo, el monitoreo de sus poblaciones puede generar información útil para la conservación de este grupo antiguo de mamíferos con importancia ecológica (Medina-Romero et al., 2012).

En el presente trabajo, se analizaron patrones de respuestas fisiológicas ante la captura y manipulación de ejemplares (respuesta aguda) y la generada a largo plazo (respuesta crónica) en poblaciones silvestres de tres marsupiales bajo distintos contextos estresantes a partir de analitos del hemograma tanto eritrocíticos como leucocitarios. A pesar de que ambas respuestas son difíciles de definir y hasta cierto punto subjetivas, han demostrado que pueden proporcionar información útil;

reflejando cambios entre poblaciones silvestres. La evaluación de la respuesta inmune innata a partir de los analitos leucocitarios sensibles al estrés y en concreto los índices obtenidos (N/L y N/E) en poblaciones de didélfidos que se desarrollan en ambientes contrastantes en conjunto con el análisis de analitos eritrocíticos, puede proporcionar información sobre su capacidad para ajustarse o no a distintas condiciones y servir como especie centinela o indicador biológico una vez que bajo diversos estudios se determine como tal.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Urbanización**

Las respuestas que puede presentar un individuo o población ante determinados disturbios de su hábitat pueden ser distintas. En 1996 Blair y colaboradores categorizaron a las especies silvestres en evasivas, adaptativas y explotadoras (Blair, 1996). Estos términos después fueron retomados por McKinney (2002), quien planteo una nueva clasificación: 1) especies explotadoras o sinantrópicas, aquellas consideradas casi totalmente dependientes de los recursos humanos, permitiéndoles incrementar sus densidades poblacionales en regiones más urbanizadas, 2) especies adaptativas, que se encuentran en matrices con hábitats suburbanizados como áreas rurales y más susceptibles a las grandes urbes; y 3) especies evasivas, que son extremadamente sensibles a cualquier cambio en su entorno. El constante crecimiento de la urbanización es una de las causas de la pérdida de biodiversidad local y generalmente, está asociado a la reducción de poblaciones nativas. Las especies de fauna silvestre que toleran los ambientes antropizados, enfrentan fenómenos como la contaminación (incluyendo lumínica y auditiva), exposición a patógenos exóticos, cambio en la disponibilidad de recursos e interacciones con especies inusuales (McKinney, 2002; Meillère et al., 2015).

Aún se desconocen la mayoría de los mecanismos fisiológicos por los cuales muchos vertebrados silvestres se ven afectados por los ambientes urbanizados y cómo pueden o no adaptarse a circunstancias específicas que proporcionan estos entornos. Con el objetivo de comprender estas variaciones, en los últimos años se han realizado estudios ecológicos de ambientes urbanos que evalúan las dinámicas poblacionales en especies silvestres a partir de la riqueza, abundancia y densidad poblacional (Lindenmayer et al., 2000; Markovchick-Nicholls et al., 2008). Sin embargo, también existen aquellos enfocados en evaluar aspectos fisiológicos de individuos o poblaciones con relación al impacto de la antropización por medio de su condición corporal (Brodin, 2007), presencia de enfermedades específicas (Bradley & Altizer, 2007), evaluación de concentraciones hormonales (Partecke

et al., 2006; Romano et al., 2010; Touma & Palme, 2005), análisis hematológicos (Cooke et al., 2012; Deem et al., 2009; Hufschmid et al., 2013; Maceda-Veiga et al., 2015) entre otros.

En México, algunos de los estudios han evaluado a las especies invasoras de aves paseriformes que han aparecido como consecuencia del mercado ilegal (Rodríguez-Ruíz et al., 2017), la distribución, riqueza y abundancia de mamíferos terrestres (Bárceñas & Legorreta, 2007; Hortelano-Moncada & Cervantes, 2011; Navarro-Frías et al., 2007) y parámetros que evalúan la exposición a distintos ectoparásitos. Sin embargo, en el caso concreto de los tlacuaches y principalmente en las especies *Didelphis virginiana* y *D. marsupialis* los estudios han estado relacionados al estudio de sus poblaciones (Cruz-Salazar et al., 2016), filogenia aplicada a su conservación (Medina-Romero et al., 2012), presencia de patógenos como *Trypanosoma cruzi* o *Leishmania* spp (Tamay-Segovia et al., 2017; Zavala-Velázquez et al., 1996) y descripción de sus analitos hematológicos (Zepeda-Espinosa et al., 2019).

## **2.2 Salud y vida silvestre**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió en la década de 1940 el término de salud como un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no meramente como la ausencia de enfermedad o dolencia (55th World Health Assemblies, 2006). Para la medicina veterinaria, y concretamente en el caso de animales de producción, fue definida como un estado de bienestar físico, psicológico y de productividad, siendo cuantificable a través de índices de salud, obtenidos a partir de la observación de parámetros como éxito reproductivo, ingesta de alimento, peso corporal, entre otros (Blood et al., 2007). En el caso de fauna silvestre, la salud ha sido definida como la capacidad de un individuo para adaptarse y responder a distintos retos y cambios (Ryser-Degiorgis & Marie-Pierre, 2013). Sin embargo, Stephen y colaboradores (2014), indican que el concepto de salud en la mayoría de las legislaciones y regulaciones en fauna silvestre se encuentra enfocado al estudio de la presencia de enfermedades de carácter zoonótico, dejando a un lado la evaluación de la capacidad de un animal o población silvestre para adaptarse o no a distintos desafíos.

Actualmente, se requieren definiciones que reinventen el concepto de salud en fauna, resaltando que ésta no puede ser evaluada únicamente por la ausencia de enfermedad sino como el resultado de una interacción biológica, social y/o ambiental, ligada con la capacidad de un individuo para adaptarse o no al cambio. Por lo tanto, los individuos pueden adquirir un papel de vulnerabilidad o resistencia

ante su entorno (Zinsstag et al., 2011) Es por esto por lo que se requiere estudiar, aprovechar e integrar aquellos conocimientos de salud humana y animal de forma interdisciplinaria, tomando en cuenta aquellas variables como sexo, temperatura corporal, estacionalidad, estado reproductivo y edad, que cambian la fisiología de un individuo dependiendo los distintos contextos ambientales. Además, es importante tomar en cuenta que la salud en la vida silvestre no es un estado biológico como tal sino una construcción dinámica basada en las expectativas de los seres humanos (Stephen, 2014).

Utilizando estudios hematológicos, se ha intentado evaluar la salud de individuos en entornos silvestres empleado enfoques ecológicos, ecotoxicológicos y médicos. Sin embargo, es un área compleja debido a que el mayor reto para hacer investigación en campo radica en que no existen en la mayoría de las especies valores de referencia, dificultando la interpretación precisa o incluso aproximada de los resultados obtenidos. Debido a esto, obtener datos fisiológicos en ambientes contrastantes contribuiría de manera significativa, a la estandarización de la información pudiendo así abordar discusiones mejor fundamentadas (Davis & Maney, 2018; Maceda-Veiga et al., 2015).

### **2.2.1 Concepto “Una Salud”**

El pensamiento médico integral fue planteado por primera vez en 1976 en Norteamérica por un estudiante llamado William Osler. Es a él a quien se le atribuye el término “Una Salud”, que tiene como finalidad integrar, asociar y replantear la estrecha interacción sistémica que existe entre la salud de humanos y el entorno (Zinsstag et al., 2011). Este nuevo concepto ha traído consigo debate científico, programas para la investigación e integración de conocimiento, así como la ramificación en distintas líneas de investigación relacionadas con la epidemiología y medicina preventiva. Dentro de la investigación multidisciplinaria, también se ha acuñado el término de “síndromes del cambio global” que busca englobar la salud humana y animal en conjunto (Jokimäki et al., 2011; Magle et al., 2012).

Entre los estudios que se han llevado a cabo bajo este concepto están aquellos que evalúan los efectos de los contaminantes, la emergencia de enfermedades zoonóticas, el impacto de la deforestación y otras actividades humanas (Ryser-Degiorgis & Marie-Pierre, 2013). Estos estudios han servido para demostrar que en la actualidad los problemas de salud son más complejos y no pueden ser resueltos mediante estudios reduccionistas que proporcionen información a muy pequeña

escala (Ryser-Degiorgis & Marie-Pierre, 2013; Zinsstag et al., 2011). Por lo tanto, en la actualidad la interacción y manejo de toda esta información es un reto.

### **2.3 Estrés**

El estrés es un cambio fisiológico y psicológico que puede interferir en el estado de bienestar de un ser vivo como resultado de la exposición a factores bióticos o abióticos que tengan la capacidad de actuar como factores estresantes (Ditchkoff et al., 2006; Hing et al., 2016). Los seres vivos enfrentan constantemente un amplio número de circunstancias que causan estrés. La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) es el responsable de esta respuesta fisiológica. Este mecanismo se encuentra mediado por una retroalimentación tanto positiva como negativa que involucra hormonas glucocorticoides y mediadores neuroendocrinos, por lo tanto, el eje HHA regula los procesos fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento para mantener un estado de alostasis (homeostasis a través del cambio) en los animales que se enfrentan a distintas condiciones bajo distintos estresores (Hing et al., 2016; Sapolsky et al., 2000).

La activación del eje HHA en los mamíferos se lleva a cabo mediante la liberación por parte del hipotálamo de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés) a la circulación. Después, se estimula a la glándula hipófisis para liberar a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés) que, a su vez, estimulará a la glándula adrenal para liberar algún tipo de glucocorticoide (cortisol, cortisona etc) (Thrall et al., 2004). Esta respuesta y la secreción de estas hormonas son consideradas benéficas e indispensables para mediar respuestas adaptativas tales como la estimulación de procesos bioquímicos como la gluconeogénesis que inhabilita la utilización de glucosa por tejidos que no lo requieran primordialmente en determinados momentos, movilizandando las reservas de grasa almacenadas en los tejidos para el correcto funcionamiento de los órganos que más las necesiten (Fischer et al., 2015; Meillère et al., 2015; Sapolsky et al., 2000) entre otras respuestas de tipo adaptativo.

En situaciones de estrés prolongado, las elevadas concentraciones de glucocorticoides en circulación pueden interferir en procesos fisiológicos de carácter inmunológico, reproductivo, así como en las funciones del sistema nervioso central, estando relacionadas con enfermedades y cambios de comportamiento que pueden comprometer el estado general de salud de los individuos (Davis, Maney, et al., 2008).

## 2.4 Uso del hemograma como indicador de salud

El hemograma es una de las herramientas cuyo objetivo es reconocer por medio de la cuantificación y detección de alteraciones en analitos sanguíneos los cambios fisiológicos por los que puede pasar un animal como consecuencia de alguna variación en su sistema. Por sus características, esta técnica es de utilidad para proporcionar información de su estado general de salud y ha sido utilizada tanto en animales domésticos como silvestres (Maceda-Veiga et al., 2015). Recientemente se ha incrementado su uso en estudios ecológicos que tienen por objetivo evaluar el impacto que generan algunos estímulos considerados estresores sobre distintas células (Davis, Andrew, et al., 2008).

En años recientes se han realizado estudios experimentales para evaluar cambios leucocitarios causados por estímulos estresantes en peces cebra (Grzelak et al., 2017), comparaciones del hemograma en individuos enfermos de trucha arcoíris (Lehmann et al., 1987) y diferencias en el leucograma y el índice N/L en larvas de ranas provenientes de distintos estanques con diferente nivel de perturbación (Davis et al., 2011). En contraste, algunos de los pocos estudios con este enfoque en animales de vida libre son la evaluación de analitos leucocitarios en pingüinos (D'amico et al., 2014), evaluación de analitos hematológicos de ornitorrincos (Whittington & Grant, 1983) y diferencias leucocitarias en pingüinos provenientes de ambientes contaminados (Jerez et al., 2013).

En el caso de los marsupiales existen estudios hematológicos en especies como *Antechinus agilis*, un marsupial carnívoro del que se obtuvieron hemogramas de poblaciones en ambientes contrastantes (Johnstone et al., 2012). Existen también trabajos que han estudiado analitos hematológicos en las especies de *Didelphis aurita* y *D. albiventris* en Brasil (Casagrande et al., 2009) y otros en la especie *Trichosorus cunninghami* en Australia, relacionando estos valores con variables como sexo, estacionalidad, hábitat y estado de salud (Hufschmid et al., 2013). En las especies *D. virginiana* y *D. marsupialis* se han llevado a cabo estudios para obtener parámetros hematológicos tanto en cautiverio (Giacometti et al., 1972) como vida libre (Lewis, 1975; Youatt et al., 1961).

En México, para *Didelphis virginiana* se evaluaron los parámetros hematológicos en vida libre en el estado de Yucatán (Zepeda-Espinosa et al., 2019) y también se encuentra el trabajo que antecede a este mismo que evaluó el hemograma de las especies *Didelphis marsupialis*, *D. virginiana* y *Philander opossum* en el estado de Tabasco (León, 2017).

### 2.4.1 Leucograma de estrés

El leucograma se obtiene a partir del conteo total de los leucocitos, incluyendo a neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos; el análisis de estas variedades leucocitarias es una herramienta valiosa para el diagnóstico en la práctica clínica. Además, aporta información que puede ser utilizada para evaluar la respuesta a adversidades, conocida como leucograma de estrés (Davis, Maney, et al., 2008) que dependiendo de la intensidad, magnitud y persistencia de un estresor y, por lo tanto, de glucocorticoides en circulación, genera cambios como neutrofilia, linfopenia y eosinopenia (Anne, 2020; Maceda-Veiga et al., 2015).

Para entender el leucograma de estrés es importante saber que existen dos respuestas, una de tipo agudo (homeostática) y otra de tipo crónico (adaptativa). El primer cambio fisiológico que se presenta como consecuencia a un agente estresor es la linfopenia, fenómeno causado por apoptosis y alteración en los patrones de recirculación, encargados de almacenar linfocitos en los linfonodos. El segundo cambio será la neutrofilia, causada por el incremento de casi el doble de neutrófilos en sangre, debido a que los esteroides disminuyen su adhesión y marginación al endotelio vascular, incrementado su número circulante y presentando hipersegmentación. Como signo indicador de respuesta crónica al estrés serán esperados cambios como la eosinopenia, linfopenia y monocitosis. Esta última ha sido observada casi exclusivamente en perros y bovinos (Schalm's, 2010), pero también en poblaciones silvestres de topos y monos aulladores (Beldomenico et al., 2008; Sánchez-Sarmiento et al., 2015).

Para complementar la interpretación de un leucograma, sobre todo en aquellos animales en los que no se tienen valores de referencia, debemos tener presente que se puede obtener el índice N/L, que proporciona datos sobre la susceptibilidad física, fisiológica y psicológica de individuos bajo situaciones adversas como la antropización (respuesta adaptativa). Cuando este índice se encuentra más elevado en la comparación de dos o más poblaciones de ciertas especies, se hipotetiza que el grupo de estudio se encuentra expuesto y/o es más sensible a determinados estímulos adversos. Este fenómeno se ve reflejado en el incremento de neutrófilos y la disminución de linfocitos (linfopenia), siendo de utilidad para estudios comparativos de fauna silvestre (D'Amico, Bertellotti, et al., 2016; Paes et al., 2012; Peutz et al., 1996; Zhelev et al., 2013).

Por otro lado, el índice neutrófilo/eosinófilo (eosinopenia), también se ha visto que varía ante situaciones estresantes en donde el incremento de hormonas

glucocorticoides lideran el aumento de neutrófilos y un decrecimiento de eosinófilos en sangre, siendo de utilidad como indicador de cuadros clínicos agudos ante infecciones principalmente de tipo bacteriano (Lipkin, 1979; Setterberg & Newman, 2004; Wibrow et al., 2011). Este signo se ha presentado y estudiado principalmente en humanos, ante enfermedades relacionadas con el estrés como el infarto isquémico agudo y en enfermedades sistémicas, incluyendo la causante de la pandemia actual por SARS-CoV-2, en donde parece haber relación con el cuadro clínico agudo de la enfermedad (Güneş, 2020; Xia, 2020).

En fauna silvestre se presenta como posible indicador de estrés en contextos de cautiverio, y/o enfermedades, sin embargo, en algunas especies también podría ser una característica fisiológica específica sobre la producción de analitos (Hajduk et al., 1992; Haynes & Skidmore, 1991; Sánchez-Sarmiento et al., 2015). Su interpretación ha generado polémica, pero los estudios coinciden en que sus cambios son una respuesta ante el estrés agudo (Xia, 2020).

En fauna silvestre, el índice que más se utiliza para estudiar fisiología del estrés utilizando a los leucocitos como indicador ha sido el N/L. Diversos proyectos en mamíferos silvestres lo han utilizado para evaluar el impacto que enfrentan las poblaciones silvestres en distintos ambientes. Las diferencias detectadas entre distintas poblaciones sugieren que esta relación puede ser utilizada como indicador biológico ante estrés crónico (D'Amico, Coria, et al., 2016; Sánchez-Sarmiento et al., 2015; Uzenbaeva et al., 2013). En el caso de los marsupiales, existen estudios como en la especie sudamericana *Dromiciops gliroides* en donde se evaluaron parámetros hematológicos, incluyendo el índice N/L en época de hibernación, encontrando un incremento en esta relación, adjudicándolo a la lisis muscular y probable estrés fisiológico por el que podía estar pasando la especie (Franco et al., 2013).

Por otro lado, como ya se mencionó, el índice neutrófilo/eosinófilo ha sido estimado principalmente en humanos, sin embargo, en fauna silvestre la eosinopenia se ha evaluado en primates (*Alouatta caraya*), ovejas y koalas en cautiverio sometidos a condiciones estresantes (Sánchez-Sarmiento et al., 2015). También, la ausencia de eosinófilos podría explicar que se trate de una condición biológica normal como en el caso del marsupial dasiuromorfo (*Sminthopsis crassicaudata*) en quien se observó ausencia de eosinófilos adjudicando esta condición hematológica a que la médula ósea de esta especie solo libera este analito específicamente cuando es requerido, presentándose un breve periodo de vida en sangre circulatoria antes de migrar a tejidos (Haynes & Skidmore, 1991).

Cabe destacar que evaluar estrés fisiológico utilizando células sanguíneas, tiene algunas ventajas sobre la evaluación de hormonas glucocorticoides que son recurrentemente utilizadas para estimar esta condición. Por ejemplo, obtener un conteo leucocitario es un procedimiento más económico que la cuantificación de hormonas esteroides, además, las concentraciones de estas líneas celulares en teoría no se ven afectadas en segundos bajo situaciones de estrés agudo como la captura de un individuo que siempre será necesaria para la obtención de una muestra sanguínea, y en algunos casos puede tomar un tiempo considerable. Uno de los beneficios de esta herramienta hematológica es que, nos permite obtener información para relacionarla con el entorno, así como otros factores y/o analitos (hormonas, proteínas, etcétera) (Maceda-Veiga et al., 2015). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el empleo de estas dos herramientas y su interpretación en conjunto provee información para sustentar mejor cualquier tipo de resultado (Davis & Maney, 2018).

A pesar de las ventajas que tiene el conteo leucocitario sobre otras herramientas, es importante enfatizar que las interpretaciones de estos resultados pueden ser complejas y deben llevarse a cabo con cautela. La regulación de las células leucocitarias está dada por la combinación de distintos factores, uno de ellos es la participación las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) que, junto con el cortisol, también son liberadas en una respuesta de estrés agudo (respuesta homeostática), como puede ser la captura y contención de un ejemplar. Sin embargo, aún se desconoce con detalle la respuesta en cada especie y, por lo tanto, los resultados pueden variar debido a condiciones particulares para cada grupo taxonómico.

Generar información en distintos contextos y para diferentes especies ayudará a tener más claridad en la interpretación de los datos. Todo el contexto para determinar hasta qué punto influye una variable como el medio ambiente y otros factores en la fisiología de los leucocitos es subjetivo, debido a que los individuos utilizados en este tipo de estudios pasan por un procedimiento de captura considerada de carácter agudo y causada principalmente por la liberación de catecolaminas y después, si persiste un factor estresante o son individuos expuestos a constantes adversidades presentarán una respuesta de carácter crónica (adaptativa), mediada por glucocorticoides (Sapolsky et al., 2000). Sin embargo, también debemos tener presente que la influencia de la captura (respuesta aguda) en teoría no debería cambiar la respuesta a nivel leucocitario, y, por ende, si partimos del hecho de que algunos individuos están más expuestos a

efectos adversos que otros, tanto los índices leucocitarios (N/L y N/E) como otros analitos hematológicos son indicadores de utilidad sobre distintos tipos de respuestas fisiológicas entre poblaciones silvestres.

## 2.5 Marsupiales americanos

Los marsupiales americanos son mamíferos que han logrado adaptarse en ambientes con distintos niveles de perturbación en el continente y algunas de sus especies, han sido descritos como generalistas u oportunistas (Adler et al., 1997). De acuerdo con registros fósiles, su historia evolutiva inicia desde el periodo Cretácico (Medina-Romero et al., 2012). Estos mamíferos antiguos cumplen con diversas funciones ecológicas en los ambientes que habitan como la dispersión de semillas, el control de patógenos como las garrapatas, entre otras (Medina-Romero et al., 2012).

En México, se distribuyen en todo el país y predominan en el sur con excepción de la península de Baja California. Se describen ocho especies de marsupiales mexicanos dentro del orden Didelphimorphia con siete géneros: *Marmosa*, *Tlacuatzin*, *Caluromys*, *Chironectes*, *Didelphis*, *Metachirus* y *Philander* (Medina-Romero et al., 2012). Un estudio realizado en el 2014 menciona que zonas como el Golfo de México, la costa del Pacífico, la zona de Soconusco en el estado de Chiapas y la Sierra Madre del sur son de prioridad para la protección de la conservación de los didélfidos en México. El estado de Tabasco forma parte de la zona del Golfo de México y comprende parte del área de simpatria de tres especies de didélfidos: *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander opossum*. (Medina-Romero, Goyenechea and Castillo-Cerón, 2012), además de contar con 7 de las 8 reportadas para el país (Mihart et al., 2016).

La especie *D. virginiana* habita en una variedad de ambientes que van desde bosques deciduos, tierras bajas, lomeríos y zonas áridas, así como zonas rurales y suburbanas (Mcmanus, 1974). Es la especie más reciente en la tierra de las tres y ha sido descrita como generalista y adaptable a ambientes más contrastantes (Cruz-Salazar et al., 2014). *D. marsupialis* se encuentra más restringido a bosques tropicales húmedos y secos, bosques secundarios y zonas de vegetación densa (Cruz-Salazar et al., 2014). Por último, la especie *P. opossum* se distribuye en bosques tropicales, secundarios, praderas cercanas a cuerpos de agua, cultivos y zonas urbanas, pero con menor impacto antropogénico (Castro-Arellano et al., 2005). Actualmente ninguna de estas tres especies figura dentro de las categorías

en riesgo de acuerdo con la NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010) y en el caso de la Lista roja de IUCN las tres están dentro de la categoría de LC (por sus siglas en inglés “least concern”) que se refiere a un estado de menor preocupación (Moraes et al., 2016; Pérez-Hernández, 2016; Pérez-Hernández et al., 2014).

Estas especies han sido relacionadas con diversos patógenos zoonóticos como *Trypanosoma cruzi*, protista con quien mantienen un estrecho contacto sin lesiones tisulares y *Leishmania* spp (Zavala-Velázquez et al., 1996). Por otro lado, también se ha comprobado la adaptación de *D. virginiana* para contrarrestar el efecto del veneno de algunas especies venenosas de serpientes (Voss & Jansa, 2012), y aunque se requiere investigación al respecto, se ha planteado que pueden llegar a ser resistente al virus de la rabia, sin embargo, no son inmunes (Carey & McLean, 1983; Perez, 2016). Todos estos son temas de investigación que predominan en estas especies por las especificaciones y excepciones que presentan en comparación con otros animales, haciéndonos ver que probablemente el sistema inmune presente diferencias particulares en estas especies que pudieran proveer pistas de su respuesta inmune tanto innata como adaptativa.

Debido a la flexibilidad que han demostrado ante ambientes urbanizados y el estrecho contacto que tienen con el ser humano, es conveniente tomar en cuenta esta información y analizar el estado general de salud de estas especies por el rango de transmisión de enfermedades de la interfase doméstico-silvestre y posible decrecimiento de sus poblaciones por los distintos niveles de antropización de los lugares donde habitan; debido a situaciones lo suficientemente estresantes para generar dichos cambios (Buhr et al., 2018; Jansen et al., 2018; Legey et al., 1999).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general**

Analizar patrones de respuesta fisiológica aguda y crónica en diferentes analitos del hemograma utilizados como indicadores de estrés en poblaciones silvestres de *Didelphis virginiana*, *Didelphis marsupialis* y *Philander opossum* que habitan ambientes contrastantes.

### 3.2 Objetivos particulares

1. Evaluar diferentes analitos del hemograma de tres especies de marsupiales americanos que puedan ser utilizados como indicadores fisiológicos de estrés.
2. Analizar si variables ambientales (sitio y temporalidad) y biológicas (sexo y estado reproductivo en hembras) están asociadas a respuestas fisiológicas crónicas o de largo plazo que se reflejen en analitos del hemograma de tres marsupiales americanos simpátricos.
3. Determinar si estímulos agudos como la captura y la contención física, inducen una respuesta fisiológica que se refleje en cambios en analitos del hemograma de tres marsupiales americanos simpátricos.

### 4. Métodos

Esta investigación fue de carácter interdisciplinario y formó parte del proyecto titulado “Indicadores fisiológicos de tres especies de tlacuaches simpátricos en dos ambientes contrastantes en el estado de Tabasco” que se desarrolla en la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) desde el año 2016 con la colaboración de distintas instituciones (CINVESTAV, UAM y ahora UNAM) e investigadores. A partir de esa fecha, se ha realizado la captura y toma de muestras de ejemplares de las especies *Didelphis virginiana*, *D. marsupialis* y *Philander opossum* con el propósito de evaluar el impacto de la urbanización sobre distintos indicadores fisiológicos asociados a la salud y estrés de sus poblaciones silvestres.

#### 4.1 Diseño Experimental y área de estudio

El estudio se llevó a cabo en cuatro sitios con diferentes grados de perturbación antropogénica. Los sitios de captura fueron la 30ª Zona Militar (17°59'2.58" Norte y 92°56'30.67" Oeste), la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (17°99'02" Norte y 92°97'47" Oeste), el zoológico YUMKÁ (18°00'2.26" Norte y 92°48'18.13" Oeste) y la estación biológica La Florida (LF) ubicada en el municipio de Tacotalpa (17°27'45.74" Norte y 92°46'13.80" Oeste). Todas ubicadas en el estado mexicano de Tabasco.

La 30ª Zona Militar (ZM) se encuentra inmersa dentro de la ciudad de Villahermosa y está rodeada por tres avenidas principales y una matriz completamente urbana. Incluye extensas áreas verdes con árboles dispersos. La DACBIOL se encuentra en la periferia de la ciudad de Villahermosa en el lado poniente y está rodeada por una

avenida principal, una avenida secundaria y zonas de pastizal inducido para la práctica ganadera dentro del sitio, además se cuenta con fragmentos de vegetación secundaria (acahual y tintal con alto grado de perturbación) junto con cuerpos de agua. El zoológico de YUMKÁ se encuentra a 8 km de la ciudad de Villahermosa, cierta área corresponde a un fragmento de selva acahualada, rodeado por zonas de pastizal inducido para la ganadería, humedales y áreas de vegetación secundaria relativamente extensas que forman parte de los terrenos del Aeropuerto Internacional Carlos Rovirosa de Villahermosa, Tabasco. Finalmente, la estación biológica La Florida (LF) se encuentra a 400 m del pueblo de Tapijulapa y al borde del área natural protegida Parque Estatal Sierra de Tabasco, en donde el tipo de vegetación predominante es la selva mediana perennifolia con moderado grado de perturbación.

Los procedimientos de este estudio se apegaron a los estatutos establecidos por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM con número de registro de protocolo SICUAE.MC-2019/1-5. Por otro lado, este proyecto también contó con un permiso de captura emitido por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) No. SGPA/DGVS/000923/18.

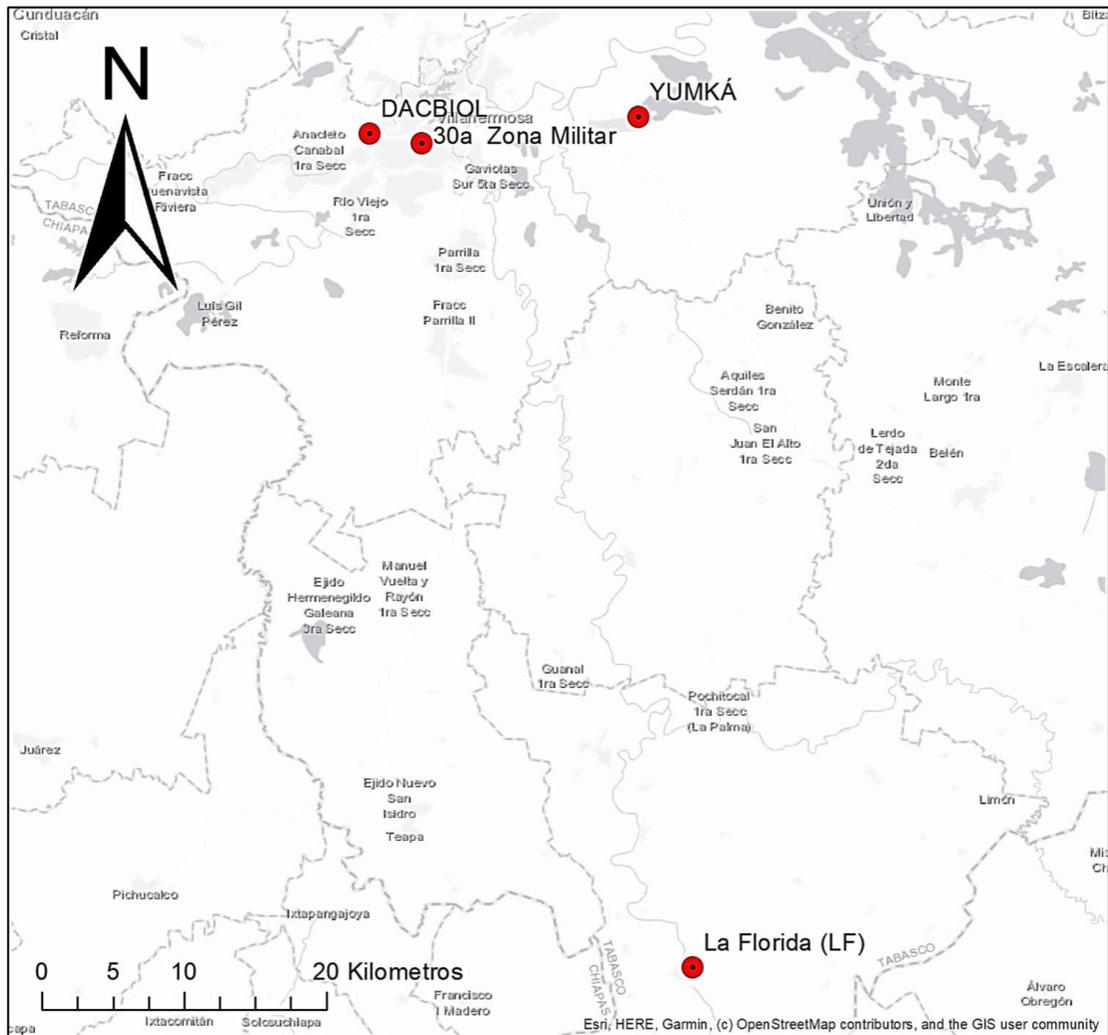


Figura 1. Mapa de la ubicación de los sitios de muestreo. Zona Militar (ZM), División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL), Zoológico YUMKA y estación biológica La Florida (LF).

#### 4.2 Captura de ejemplares

Fueron colocadas 15 trampas de tipo Tomahawk para mamíferos medianos (107 cm de largo x 38 cm de ancho y 38 cm de altura) en puntos previamente establecidos de cada localidad. A diez de ellas se les colocó una alarma de captura que consistía en un radiotransmisor que emitía señal a una frecuencia de 148–174 MHz (Communications specialist, modelo R1000®) la cual rastreaba de manera remota con una antena omnidireccional (Telonics Larsen modelo LM150®). Las

señales de cada trampa eran revisadas cada cinco minutos, permitiendo determinar el momento en que un animal era capturado (precisión < 5 min). Las cinco trampas restantes que carecían del sistema de radio fueron revisadas por el equipo de trabajo cada media hora. Una vez confirmada alguna captura, se retiraba la trampa del sitio para ser llevada al campamento y así poder iniciar con la colecta de muestras y datos generales. La jornada se iniciaba a las 19:00 h (20:00 h en horario de verano) y se finalizaba a las 06:00 h del día siguiente.

Las especies focales de este estudio fueron *D. marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*. Los individuos capturados fueron identificados con base en sus características anatómicas, con especial énfasis en la coloración de las mejillas, vibras y cola (Álvarez-Castañeda et al., 2018; Reid, 2009). La temporalidad fue establecida para la región con base a lo reportado por Pereyra-Díaz y colaboradores (2004). Se categorizó como periodo seco (100 días de duración) del mes de febrero a mayo, como periodo húmedo con (260 días) de mayo a febrero y dentro de este periodo se tomó en cuenta el periodo canicular o intraestival con una duración de 100 días dentro del periodo húmedo, de los meses de junio a septiembre. Durante los meses de enero a junio de 2016, las capturas se realizaron en DACBIOL y La Florida, mientras que en los meses de enero a junio de 2017 se capturaron únicamente en la DACBIOL. En YUMKÁ, las capturas se realizaron de mayo a diciembre de 2017 y de febrero a junio de 2018, y en la Zona militar fueron de febrero a julio de 2019.

### **4.3 Colecta y conservación de muestras**

Una vez capturado el ejemplar, la toma de sangre se llevó a cabo mediante contención física para obtener tres muestras seriadas por individuo (tiempo A, B y C). Se consideró como tiempo “A” a la primera muestra tomada inmediatamente después de la contención física del ejemplar (en los primeros 10 minutos). Posteriormente a los 20-30 minutos se tomó otra muestra, denominada tiempo “B”. Finalmente se tomó una tercera muestra 4 horas post-captura nombrada como tiempo “C”.

Para cada tiempo de colecta de muestra, fueron tomados aproximadamente 500 µL de sangre o menos del 1% del peso corporal del animal de la vena coccígea. Se utilizaron jeringas de 3 mL y agujas 23G (BD®). Posteriormente, las muestras sanguíneas fueron transferidas a tubos Microtainer con EDTA (BD®), homogenizando la sangre con el anticoagulante.

Posteriormente de cada muestra (tiempo A, B y C), fueron colectados aproximadamente 5  $\mu$ L de sangre de los tubos Microtainer, utilizando una micropipeta (Corning®) para elaborar sobre un portaobjetos un frotis secado al aire para su fijación en campo. Los frotis fueron almacenados a temperatura ambiente para su transportación. Cada muestra de sangre colectada se refrigeró en campo a aproximadamente 4°C, utilizando hieleras y geles refrigerantes hasta ser procesada. Terminado el procedimiento, todos los animales fueron marcados con un arete en la oreja derecha para su identificación y posteriormente liberados en el lugar de captura.

#### **4.4 Análisis de muestras**

Las muestras fueron transportadas y procesadas dentro de las primeras 48 horas. Una parte de los procedimientos como la cuantificación de hematocrito y sólidos totales, así como la preparación de un segundo frotis sanguíneo además del realizado en el campo, fueron elaborados en el laboratorio de la DACBIOL de la UJAT. El resto de las muestras fueron homogenizadas y refrigeradas para ser llevadas a un laboratorio de análisis clínicos privado, donde se realizó el hemograma completo de los tres tiempos (A, B y C). El equipo automatizado empleado para realizar el hemograma fue un analizador hematológico automatizado XT-1800 (Sysmex®), mismo que empleó el método de citometría de flujo con fluorescencia.

El procesamiento de tinción de los frotis sanguíneos se llevó a cabo con hemocolorante rápido Hycel®. Posteriormente, fueron observados al microscopio óptico con los objetivos 10x, 40x y 100x para obtener el porcentaje de los diferentes tipos celulares, empleando el patrón de guarda griega o almena para el conteo diferenciado de las células (Cowell & Tyler. R, 2002).

Debido a la presencia elevada de metarrubricitos o eritrocitos nucleados (eritrocitos inmaduros) ya reportados en otros trabajos en marsupiales (Clark P, 2004; León, 2017); mientras se llevaba a cabo el conteo de 100 células de los distintos tipos de leucocitos, también de forma paralela se contaron los eritrocitos nucleados (sin incluirlos en la cuenta total de 100 leucocitos) para llevar a cabo la fórmula de corrección y así obtener el número de leucocitos absolutos corregido. La fórmula se encuentra descrita a continuación.

$$\text{Conteo corregido de leucocitos} = \frac{(\text{Conteo inicial de leucocitos} \times 100)}{(100 + \text{número de células nucleadas})}$$

(Nuñez-Ochoa et al., 2007; Sirois & Hendrix, 1998).

Finalmente, los índices neutrófilos/linfocitos (N/L) y neutrófilo/ eosinófilo (N/E) se obtuvieron a partir de la cantidad corregida de neutrófilos dividida entre la de linfocitos y eosinófilos (Nuñez-Ochoa et al., 2007).

#### **4.5 Análisis de datos**

Se elaboró una base de datos que incluyó el tipo de muestra de toma sanguínea (tiempo A; B y C), hora de activación de la trampa, hora del inicio de contención física, hora de la toma del tiempo A, tipo de trampa (con alarma/sin alarma), especie, sitio, sexo, estado reproductivo de las hembras, peso (kg) y temporalidad. La edad fue estimada entre los individuos capturados y se usaron características cualitativas (por ejemplo: largo y textura del pelo, apariencia del marsupio y glándula mamaria para las hembras, entre otros) y cuantitativas (peso corporal y medidas morfométricas). Sin embargo, las categorías de edad propuestas no fueron consideradas para el análisis estadístico debido a que, de acuerdo con la revisión bibliográfica, es recomendado incluir criterios de dentición para la estimación de esta variable. En este proyecto, no fue utilizada la sedación química, por lo tanto, no se obtuvo esa información complementaria.

Las variables del hemograma que se analizaron de la línea eritrocítica fueron: hematocrito (L/L), hemoglobina (g/L), eritrocitos ( $\times 10^{12}/L$ ), volumen globular medio (fL), concentración globular media de hemoglobina (g/L), hemoglobina promedio por eritrocito (pg), plaquetas ( $\times 10^9/L$ ) y eritrocitos nucleados (/100 leucocitos). Los analitos de la línea leucocitaria fueron: leucocitos totales ( $\times 10^9/L$ ), neutrófilos segmentados ( $\times 10^9/L$ ), neutrófilos banda ( $\times 10^9/L$ ), linfocitos ( $\times 10^9/L$ ), monocitos ( $\times 10^9/L$ ), eosinófilos ( $\times 10^9/L$ ) y basófilos ( $\times 10^9/L$ ) absolutos.

Antes de realizar los análisis estadísticos, a partir de los valores corregidos de leucocitos totales, se ajustaron los valores absolutos para cada uno de los distintos tipos de analitos leucocitarios. Se multiplicó el valor relativo obtenido en el conteo diferencial de cada tipo de leucocito por el valor del valor corregido de leucocitos y el producto de esta multiplicación se dividió entre 100 (Latimer et al., 2005). Los índices N/L y N/E se obtuvieron a partir de los valores absolutos corregidos. Cabe aclarar que los resultados utilizados en el estudio fueron aquellos que se obtuvieron con la técnica manual y corregida bajo la fórmula descrita arriba. No se utilizaron los resultados obtenidos a partir de la técnica automatizada.

Se llevaron a cabo pruebas de normalidad y homocedasticidad para todas las variables del hemograma, incluyendo los índices N/L, N/E de los tiempos A, B y C con valores naturales. Debido a que no todas las variables fueron normales y homocedásticas, se optó por utilizar estadística de tipo no paramétrico. Las pruebas de Kruskal- Wallis y la prueba de Dunnett se usaron en la comparación del tiempo A (el que se asume es más cercano al valor basal) para evaluar la respuesta crónica al estrés en las relaciones N/L y N/E por: a) especie (*D. marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*); b) sitio (ZM, DACBIOL, LF, YUMKÁ); c) temporalidad (húmedo, canícula y secas), d) sexo (hembras/machos) y e) estado reproductivo en hembras (con crías/ sin crías) por especie.

Para evaluar la respuesta aguda al estrés, se utilizó la prueba de Friedman y de Wilcoxon como post hoc. Se utilizaron los tres tiempos de muestra (A; B y C) con la finalidad de observar si existía un patrón de incremento, disminución o algún otro entre los intervalos A-B, B-C y A-C por especie. Se llevó a cabo la prueba no paramétrica para medidas repetidas denominada de Friedman en las variables: relación N/L, hematocrito (L/L) y eritrocitos nucleados (/100 leucocitos) y se realizó la prueba de Wilcoxon como post hoc en caso de presentarse significancia ( $p \leq 0.05$ ).

Para algunas comparaciones no fueron tomadas en cuenta aquellas categorías de variables que contaban solamente con 1 individuo. La base de datos se exportó al programa JMP Statistical Discovery (SAS®) y SPSS Statistics (IBM®). Para todas las pruebas estadísticas se consideró un nivel de confianza de 95%. La información obtenida se resume en cuadros y figuras.

## 5. Resultados

Con un esfuerzo de muestreo de 283 noches/trampa en la DACBIOL, 285 en la Florida, 352 en Yumká y 120 en la Zona Militar se colectaron las muestras sanguíneas analizadas en esta investigación.

En el análisis de la respuesta crónica al estrés, fue considerada únicamente la muestra A de 115 individuos: 32 de *D. marsupialis* (17 hembras y 15 machos), 37 de *D. virginiana* (21 hembras y 16 machos) y 46 de *P. opossum* (20 hembras y 26 machos). Para evaluar la respuesta aguda atribuida a la captura y contención, fueron consideradas las tres muestras colectadas a lo largo del proceso (tiempo A, B y C) en donde fueron incluidos 27 ejemplares de *D. marsupialis*, 33 para *D. virginiana* y 32 para *P. opossum* sumando un total de 92 ejemplares.

## 5.1 Descripción y comparación de valores hematológicos entre especies

Fueron evaluados 21 analitos del hemograma para las tres especies de marsupiales americanos; 8 de la línea eritrocítica y 13 de la leucocitaria. Los valores relativos de los leucocitos fueron presentados, pero no se les aplicó tratamiento estadístico al igual que los valores absolutos. Los resultados muestran que existen diferencias significativas ( $p=0.05$ ) en los ocho analitos de la línea eritrocítica (Cuadro 1) y en tres de la línea leucocitaria (valores absolutos) entre las especies (Cuadro 2).

En la comparación interespecífica, la especie *P. opossum* presentó una concentración más elevada de las variables eritrocíticas hematocrito ( $0.46 \pm 0.05$  L/L), hemoglobina ( $132.57 \pm 16.74$  g/L) y plaquetas ( $354.5 \pm 123.74 \times 10^9$ /L) en relación con las dos especies del género *Didelphis* ( $p=0.0001$ ) (Figura 2).

En el caso de las variables eritrocitos y eritrocitos nucleados se presentó una relación inversamente proporcional entre *D. virginiana* y *D. marsupialis* contrastando entre especies. En *D. virginiana* los valores de eritrocitos ( $5.28 \pm 0.65 \times 10^{12}$ /L) fueron significativamente mayores que los de *D. marsupialis* ( $4.88 \pm 0.86 \times 10^{12}$ /L) ( $p=0.0251$ ), mientras que los eritrocitos nucleados en *D. marsupialis* ( $9.84 \pm 7.11/100$  leucocitos) presentaron valores más elevados que *D. virginiana* ( $4.73 \pm 7.61/100$  leucocitos) ( $p=0.0004$ ) (Figura 3).

La especie de regiones más urbanizadas *D. virginiana*, presentó un patrón donde variables eritrocíticas tales como VGM ( $79.84 \pm 5.42$ fL), CGMH ( $280.7 \pm 11.87$ g/L) y hemoglobina promedio por eritrocito ( $22.43 \pm 1.48$ pg), utilizadas para la medición de la calidad de salud que tienen las especies, estuvieron disminuidas en comparación con *D. marsupialis* y *P. opossum*, las cuales fueron capturadas en ambientes menos antropogénicos o urbanizados (Cuadro 1) (Anexo 1).

En la línea leucocitaria, *D. virginiana* fue quien tuvo valores más elevados de las variables leucocitos totales ( $\times 10^9$ /L) ( $11.64 \pm 4.91$ ) y de linfocitos ( $\times 10^9$ /L) ( $5.77 \pm 2.92$ ), en comparación con *D. marsupialis* y *P. opossum*. En la variable neutrófilos segmentados ( $\times 10^9$ /L) la especie *P. opossum* ( $2.25 \pm 2.22$ ) mostró valores más bajos en comparación con *D. virginiana* y *D. marsupialis*. Todos estos resultados fueron significativos con una  $p=0.0001$  (Figura 4) (Anexo 1).

Cuadro 1. Promedios  $\pm$  desviación estándar para parámetros hematológicos de la línea eritrocítica de tres especies de marsupiales americanos en vida libre. Literales para representar diferencias significativas ( $p= 0.05$ ) (Prueba de Kruskal-Wallis).

Analito (Unidades)	Especie		
	<i>D. virginiana</i> (n=37)	<i>D. marsupialis</i> (n=32)	<i>P. opossum</i> (n=46)
<b>Hematocrito</b> (L/L)	0.41 $\pm$ 0.04 (0.34-0.59) <b>a</b>	0.43 $\pm$ 0.06 (0.36-0.60) <b>a</b>	0.46 $\pm$ 0.05 (0.30-0.58) <b>b</b>
<b>Hemoglobina</b> (g/L)	118.45 $\pm$ 15.87 (93-180) <b>a</b>	126.63 $\pm$ 20.55 (104-171) <b>a</b>	132.57 $\pm$ 16.74 (86-166) <b>b</b>
<b>Eritrocitos</b> (x 10 <sup>12</sup> /L)	5.28 $\pm$ 0.65 (4.20-7.36) <b>a</b>	4.88 $\pm$ 0.86 (3.82-6.77) <b>b</b>	5.12 $\pm$ 0.74 (3.26-6.55) <b>ab</b>
<b>VGM</b> (fL)	79.84 $\pm$ 5.42 (66.2-89.8) <b>a</b>	90.53 $\pm$ 4.72 (83.7-102) <b>b</b>	92.34 $\pm$ 5.52 (80.8-110.4) <b>b</b>
<b>CGMH</b> (g/L)	280.7 $\pm$ 11.87 (258-305) <b>b</b>	287.19 $\pm$ 9.94 (265-314) <b>a</b>	281.43 $\pm$ 9.87 (258-300) <b>ab</b>
<b>Hemoglobina prom/eritrocito</b> (pg)	22.43 $\pm$ 1.48 (18.6-26) <b>a</b>	25.98 $\pm$ 1.24 (22.6-28.2) <b>b</b>	25.95 $\pm$ 1.12 (22.6-28.5) <b>b</b>
<b>Plaquetas</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	217.46 $\pm$ 122.18 (21-520) <b>a</b>	246.53 $\pm$ 131.64 (33-506) <b>a</b>	354.5 $\pm$ 123.74 (28-550) <b>b</b>
<b>Eritrocitos nucleados</b> (/100 leucocitos)	4.73 $\pm$ 7.61 (0-33) <b>a</b>	9.84 $\pm$ 7.11 (0-25) <b>b</b>	6.1 $\pm$ 6.0 (0-27) <b>ab</b>

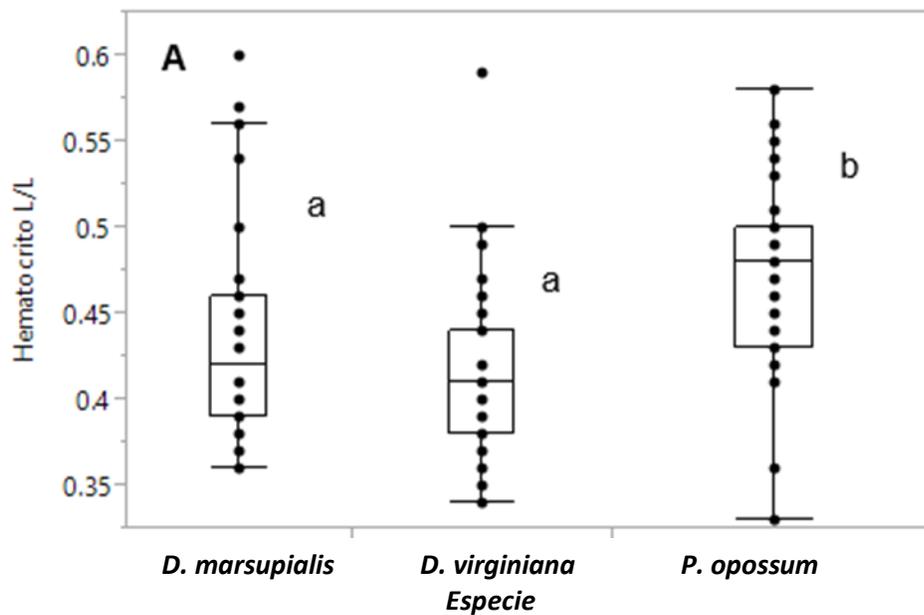
Intervalo de los valores máximos y mínimos para cada analito están dados entre paréntesis  
n = número de individuos

Cuadro 2. Promedios ( $\pm$  desviación estándar) para parámetros hematológicos de la línea leucocitaria de tres especies de marsupiales americanos en vida libre. Literales distintas representan diferencia significativa ( $p= 0.05$ ) (Prueba de Kruskal-Wallis).

Analito (Unidades)	Especie		
	<i>D. virginiana</i> (n=37)	<i>D. marsupialis</i> (n=32)	<i>P. opossum</i> (n=46)
<i>Valores absolutos</i>			
<b>Leucocitos*</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	11.64 $\pm$ 4.91 (4.63-32.14) <b>a</b>	8.05 $\pm$ 4.65 (3.44-27.8) <b>b</b>	7.25 $\pm$ 3.48 (2.81-18.47) <b>b</b>
<b>Neutrófilos segmentados*</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	4.72 $\pm$ 4.39 (1.26-27.32) <b>a</b>	4.26 $\pm$ 4.23 (0.73-22.24) <b>a</b>	2.25 $\pm$ 2.22 (0.47-14.04) <b>b</b>
<b>Neutrófilos banda</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.02 $\pm$ 0.15 (0-0.96) <b>a</b>	0 $\pm$ 0.00 <b>a</b>	0 $\pm$ 0.00 <b>a</b>
<b>Linfocitos*</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	5.77 $\pm$ 2.92 (1.89-12.02) <b>a</b>	2.96 $\pm$ 1.73 (1.06-7.59) <b>b</b>	4.19 $\pm$ 2.81 (0.59-15.14) <b>b</b>
<b>Monocitos</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.11 $\pm$ 0.27 (0-1.24) <b>a</b>	0.14 $\pm$ 0.27 (0-1.40) <b>a</b>	0.13 $\pm$ 0.25 (0-1.40) <b>a</b>
<b>Eosinófilos</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.89 $\pm$ 0.70 (0.08-3.63) <b>a</b>	0.64 $\pm$ 0.40 (0-1.66) <b>a</b>	0.58 $\pm$ 0.44 (0-2.12) <b>a</b>
<b>Basófilos</b> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.09 $\pm$ 0.13 (0.0-0.44) <b>a</b>	0.03 $\pm$ 0.05 (0-0.19) <b>a</b>	0.06 $\pm$ 0.11 (0-0.57) <b>a</b>
<i>Valores relativos</i>			
<b>Neutrófilos segmentados</b> (%)	38.65 $\pm$ 17.45 (14-85)	47.56 $\pm$ 22.15 (14-85)	31.74 $\pm$ 19.00 (6-82)
<b>Neutrófilos banda</b> (%)	0.08 $\pm$ 0.49 (0-3)	0 $\pm$ 0.00	0 $\pm$ 0.00

<b>Linfocitos</b>	51.3 ± 18.7	40.72 ± 19.41	56.57 ± 18.23
(%)	(6-78)	(9-80)	(15-91)
<b>Monocitos</b>	1.05 ± 2.42	1.75 ± 2.42	1.65 ± 2.92
(%)	(0-13)	(0-12)	(0-15)
<b>Eosinófilos</b>	8.03 ± 5.44	9.41 ± 6.54	8.57 ± 6.48
(%)	(1-29)	(0-25)	(0-31)
<b>Basófilos</b>	0.89 ± 1.26	0.56 ± 1.10	0.98 ± 1.58
(%)	(0-6)	(0-5)	(0-7)

Intervalo de los valores máximos y mínimos para cada analito están dados entre paréntesis  
n = número de individuos.



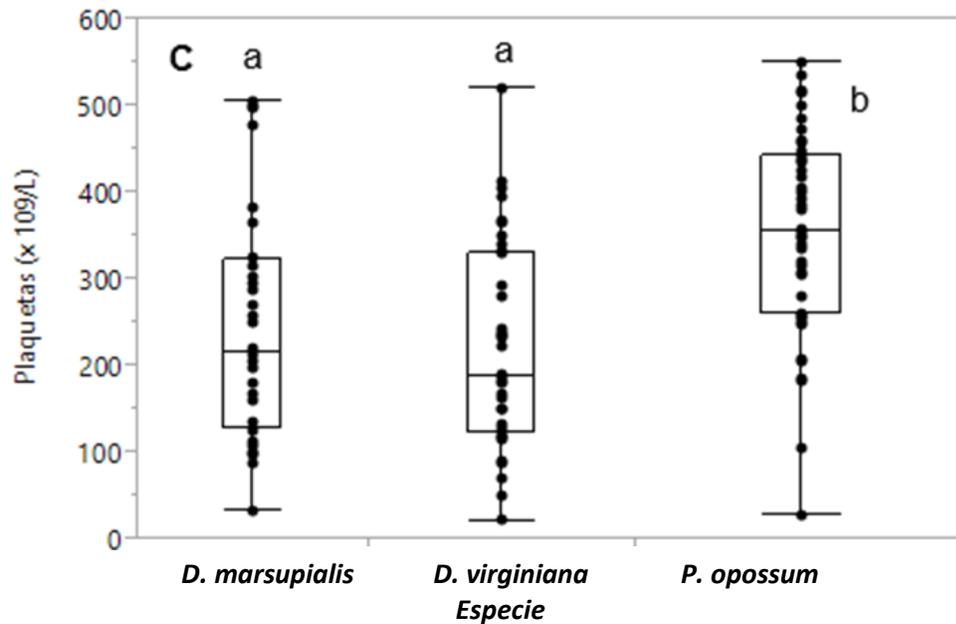
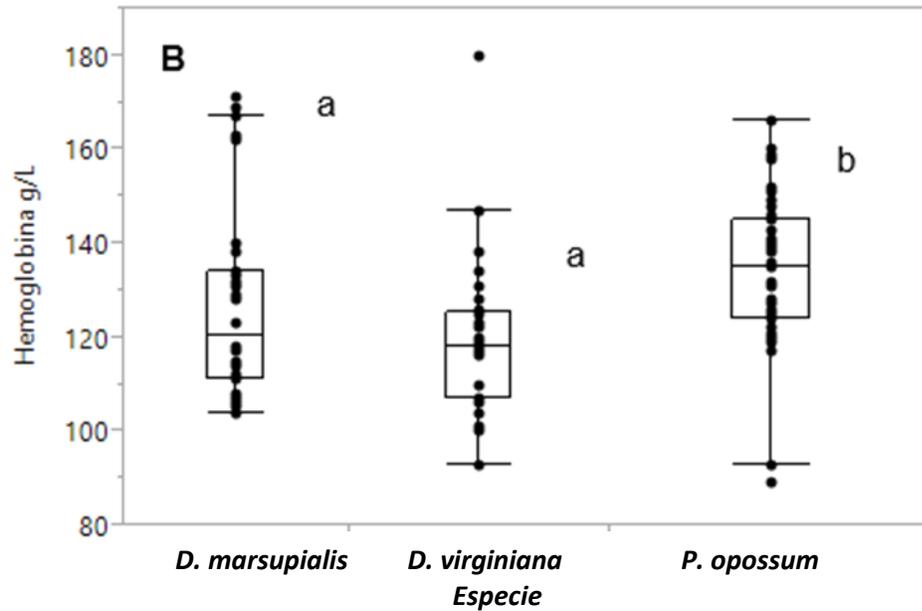


Figura 2. Comparación de tres analitos eritrocíticos: hematocrito (L/L), hemoglobina (g/L) y plaquetas ( $\times 10^9/L$ ) entre tres especies de marsupiales americanos en vida libre. Literales distintas representan diferencias significativas ( $p=0.05$ ) (Prueba de Kruskal-Wallis). A) Hematocrito, B) Hemoglobina y C) Plaquetas.

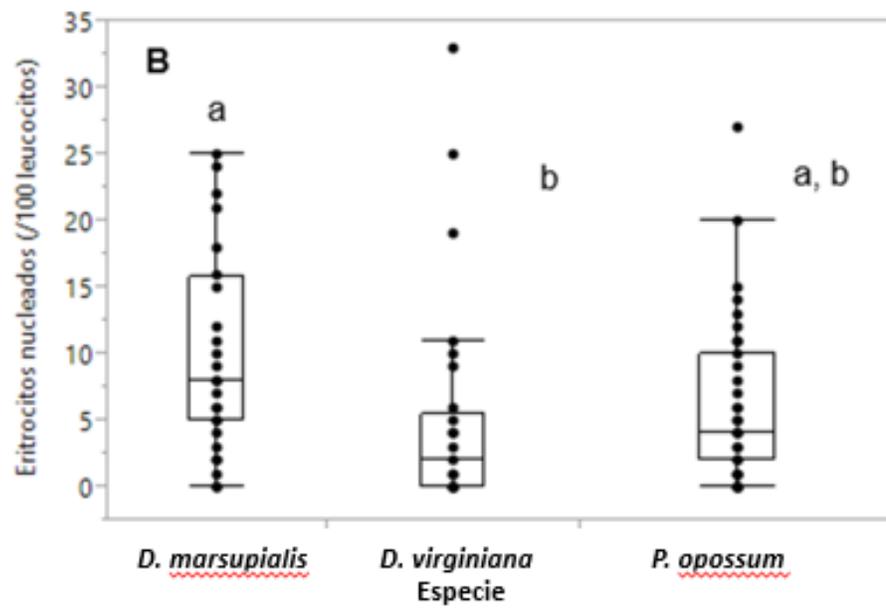
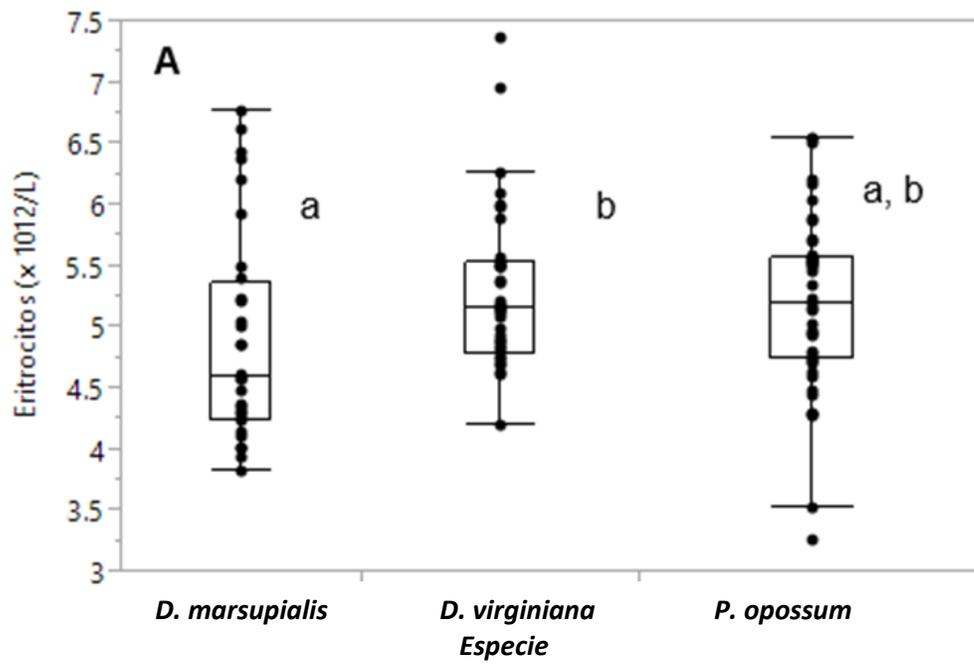
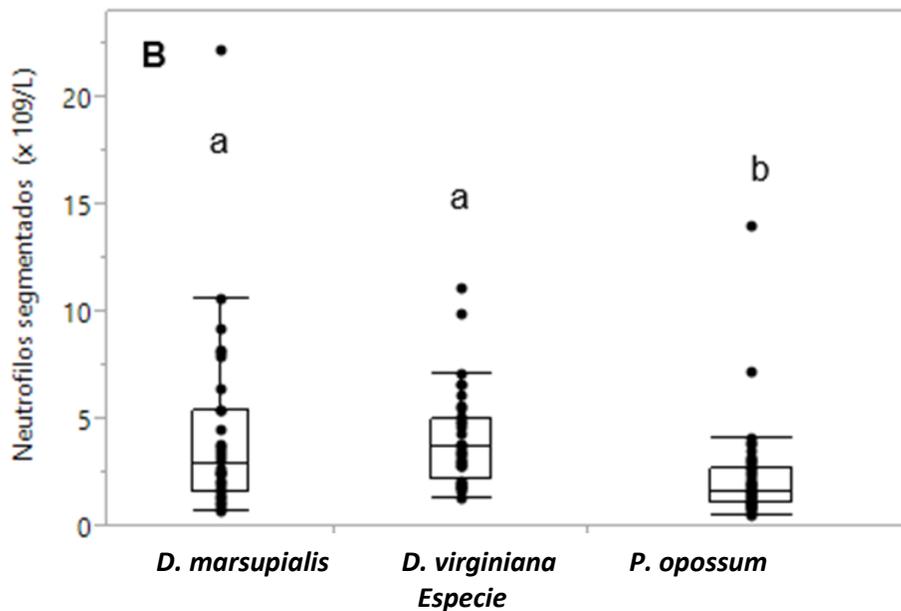
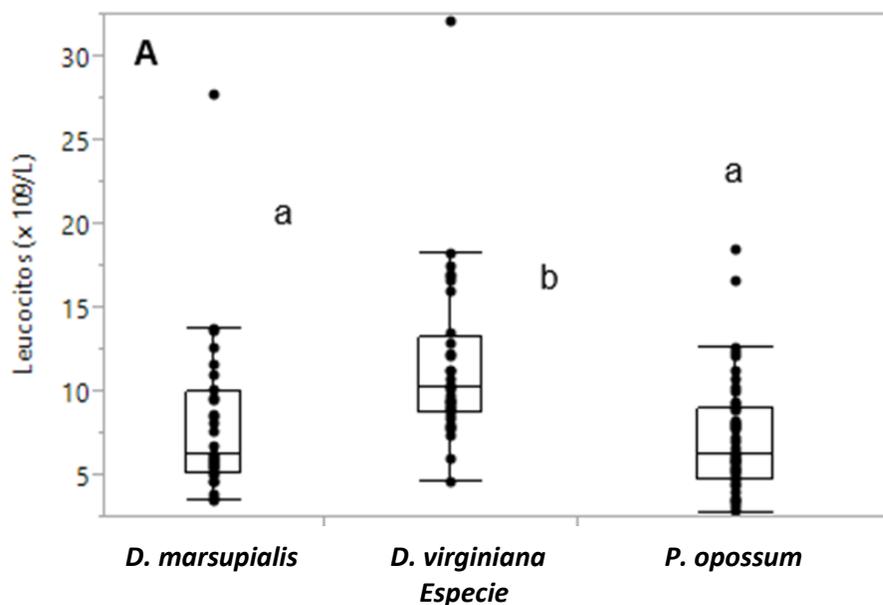


Figura 3. Comparación de dos analitos eritrocíticos: eritrocitos anucleados ( $\times 10^{12}/L$ ) y eritrocitos nucleados (/100 leucocitos) en tres especies de marsupiales americanos en vida libre. Literales distintas representan diferencias significativas ( $p=0.05$ ) (Prueba de Kruskal-Wallis). A) eritrocitos anucleados y B) eritrocitos nucleados.



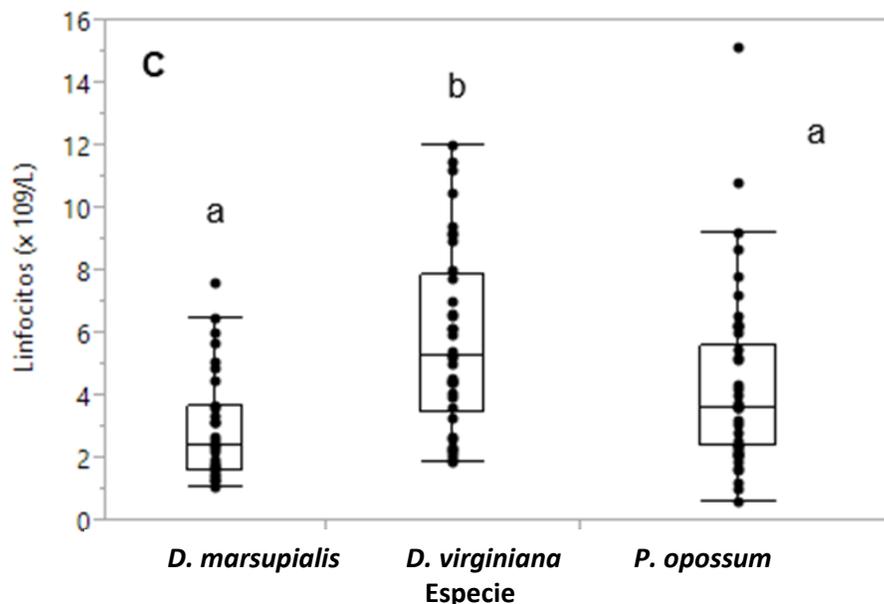


Figura 4. Comparación de tres analitos leucocitarios: leucocitos totales ( $\times 10^9/L$ ), neutrófilos segmentados ( $\times 10^9/L$ ) y linfocitos ( $\times 10^9/L$ ), en tres especies de marsupiales americanos en vida libre. Literales distintas representan diferencias significativas ( $p=0.05$ ) (Prueba de Kruskal-Wallis). A) leucocitos totales, B) neutrófilos segmentados y C) linfocitos

## 5.2 Respuesta crónica al estrés.

En el análisis de la respuesta crónica al estrés fue de interés encontrar una respuesta fisiológica de tipo adaptativo por medio de la evaluación de la posible influencia que la especie, el sitio, la temporalidad, el sexo y el estado reproductivo pudieran tener sobre las tres especies de didélfidos, utilizando como indicadores los índices N/L y N/E en cada caso.

### 5.2.1 Relación N/L (neutrófilo/linfocito)

El análisis de la relación N/L en cada especie mostró que este índice es significativamente mayor en *D. marsupialis* ( $1.02 \pm 2.46$ ), en contraste con *P. opossum* ( $0.48 \pm 0.72$ ). Al comparar a las dos especies del género *Didelphis*, no se encontró diferencia significativa entre ellas, presentando un patrón en donde los valores son más elevados en el género *Didelphis* respecto a *Philander* (Figura 5).

Al comparar la relación N/L para cada especie entre cada sitio de estudio, la única especie que presentó diferencias significativas entre sitios fue *P. opossum*, en donde el sitio Yumká ( $0.58 \pm 1.47$ ) tuvo una relación N/L más elevada en comparación con la DACBIOL ( $0.43 \pm 0.56$ ) con una significancia de  $p=0.0371$ . Las variables temporalidad, sexo y estado reproductivo no influyeron significativamente en ninguna de las tres especies sobre la relación N/L (Figura 5) (Anexo 2).

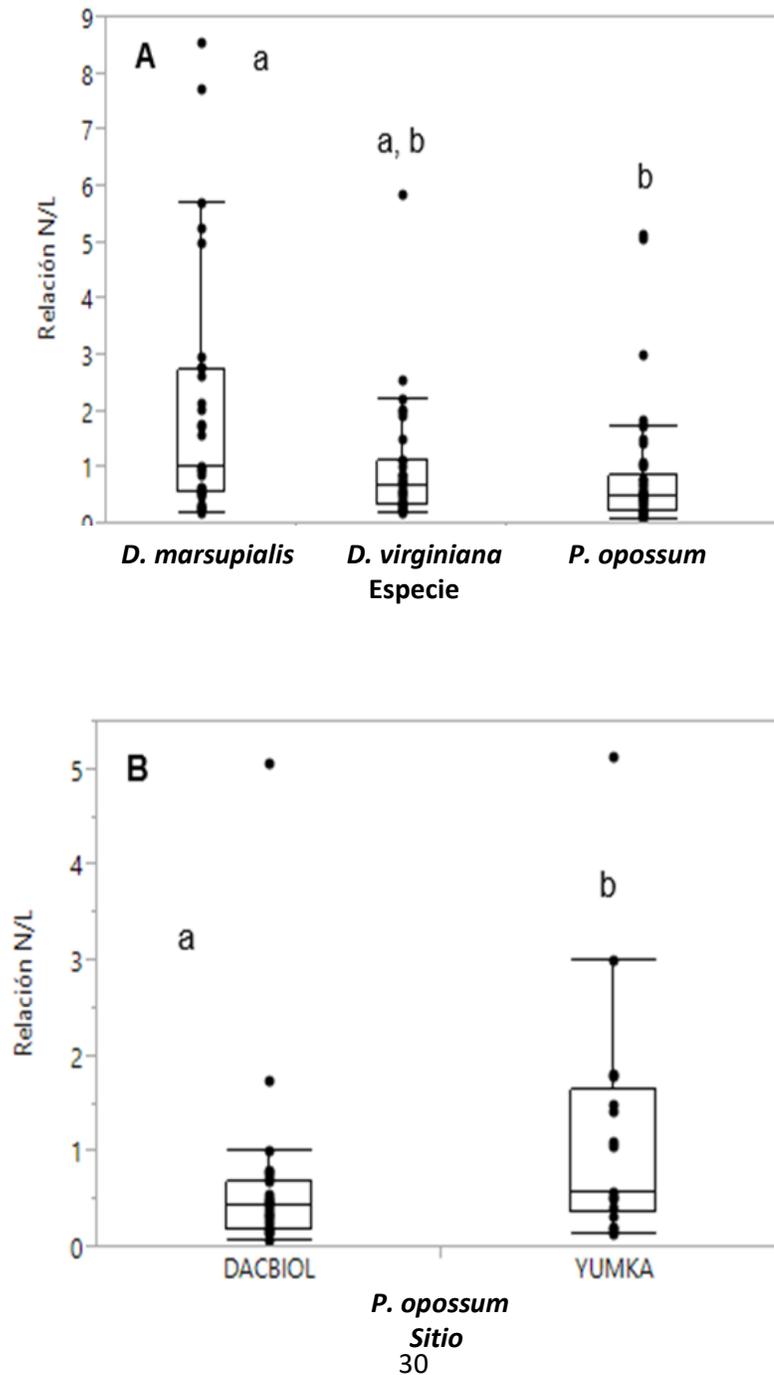


Figura 5. Comparaciones significativas de la relación N/L por especie (*D. marsupialis*, *D. virginiana* y *P. opossum*) y sitio (DACBIOL y YUMKÁ) de la especie *P. opossum*. Gráfica A muestra la comparación por especie entre *D. virginiana* (n= 35) *D. marsupialis* (n=32) y *P. opossum* (n=46) con una p=0.0006. Gráfica B muestra la comparación por sitio entre YUMKÁ (n=17) y DACBIOL (n=27) con una p<0.0382 en la especie *P. opossum*.

### 5.2.2 Relación N/E (neutrófilo/eosinófilo)

La comparación por especies de la relación N/E solamente presentó un resultado estadísticamente significativo en la especie *D. virginiana* sobre la temporalidad (p=0.0036), variable que fue la única que influyó significativamente sobre esta relación, mostrando resultados muy incrementados en el periodo húmedo ( $41.5 \pm 26$ ) en comparación con el periodo de secas ( $4.45 \pm 3.18$ ) (p=0.0027) y canícula ( $5.39 \pm 7.06$ ) que pertenece al primero (p=0.0437). Las demás variables como especie, sitio, edad, temporalidad, sexo y estado reproductivo no mostraron diferencias significativas sobre la variable N/E (Figura 6) (Anexo 3).

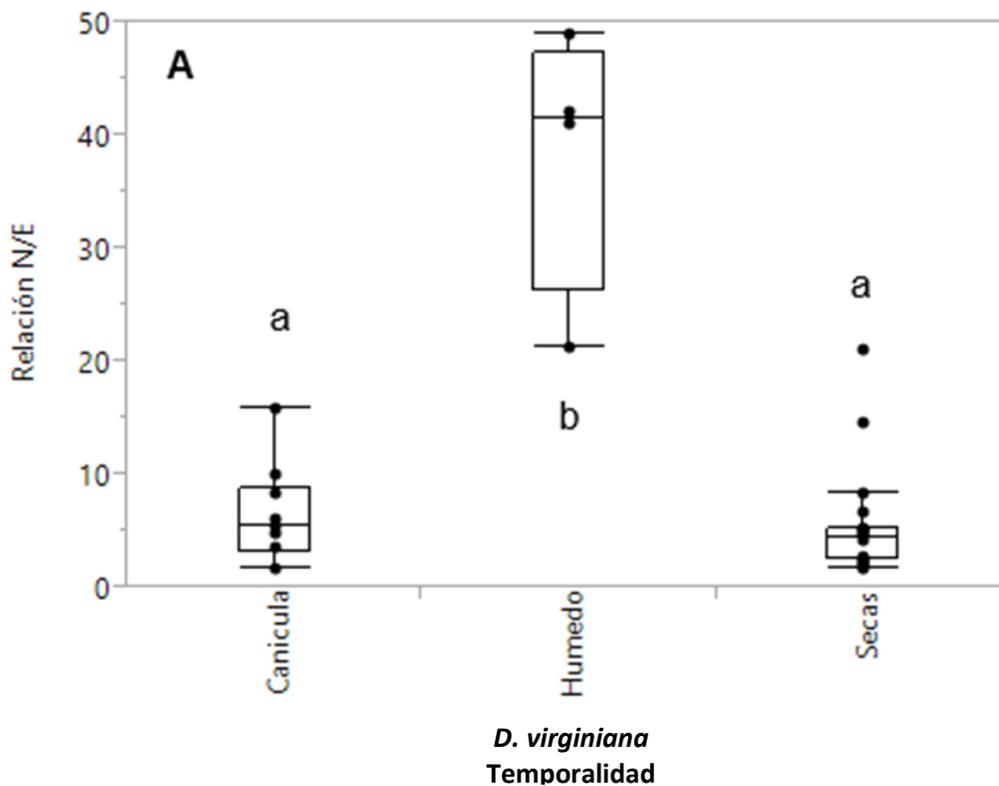


Figura 6. Comparaciones significativas de la relación N/E en la especie *D. virginiana* por temporalidad (húmedo y secas). Periodo húmedo (n=4) y secas (n=22) con una  $p=0.0027$  y húmedo (n=4) respecto a canícula (n=10) con una  $p=0.0437$ .

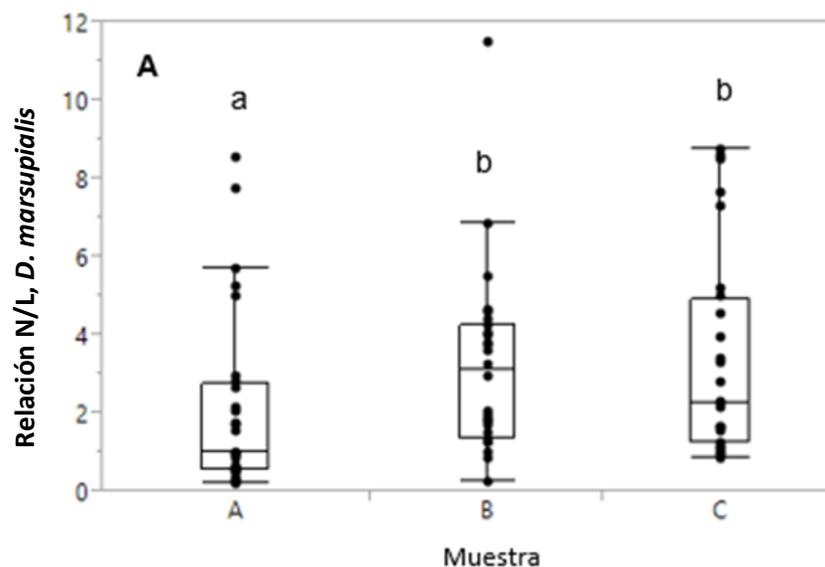
### 5.3 Respuesta aguda al estrés.

Para evaluar la respuesta fisiológica al estrés generado por el proceso de captura y contención mediado por la liberación de catecolaminas, fueron considerados como analitos indicadores la relación N/L, hematocrito y eritrocitos nucleados en cada especie con la finalidad de poder contrastar los valores de las tres tomas de muestras colectadas durante el procedimiento (A, B y C), evaluando una respuesta fisiológica de carácter homeostático.

#### 5.3.1 Relación N/L (neutrófilo/linfocito)

Las tres especies evaluadas respondieron con cambios en la relación N/L durante el proceso de captura y contención. Se encontró que la relación N/L fue significativamente menor al inicio de la contención. Durante el proceso, las tomas de sangre subsecuentes presentaron índices mayores ( $p=0.0001$ ) (Figura 7, gráfica A).

En el intervalo A-B, la relación N/L incrementó en las tres especies de didélfidos, siendo más notorio el cambio en la especie *P. opossum* ( $p=0.002$ ). Solamente *D. marsupialis* tuvo además un incremento en el intervalo A-C ( $p=0.001$ ), teniendo como especie resultados significativos en dos intervalos (A-B y A-C). Sin embargo, con la especie *P. opossum* ( $p=0.002$ ) hubo significancia en los tres intervalos de tiempo, A-B, B-C y A-C. La especie *D. virginiana* fue la que presentó menos variación en intervalos de tiempo ante este tipo de respuesta aguda y *P. opossum* la que más (Figura 7 gráfica C) (Anexo 4).



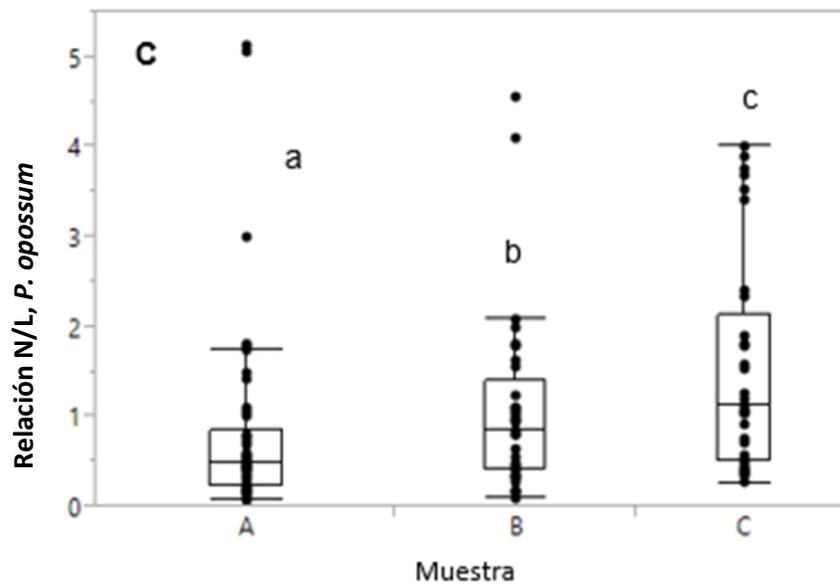
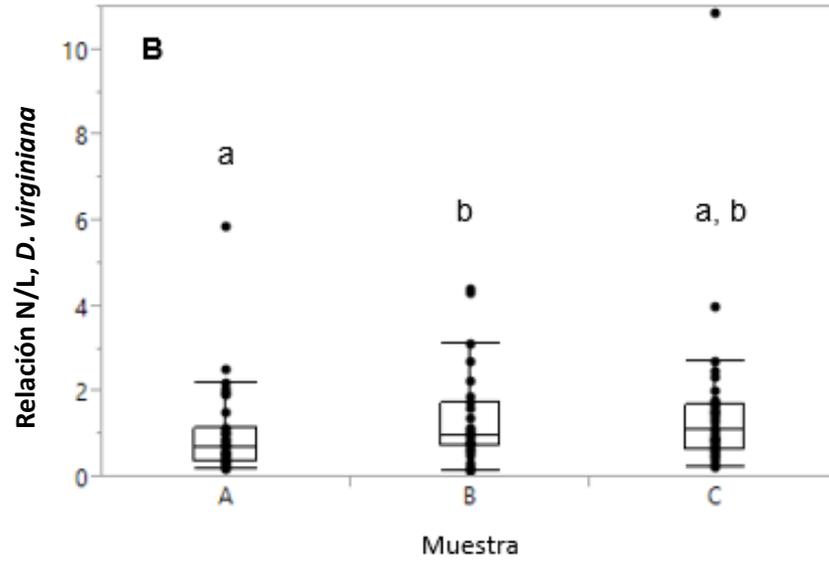
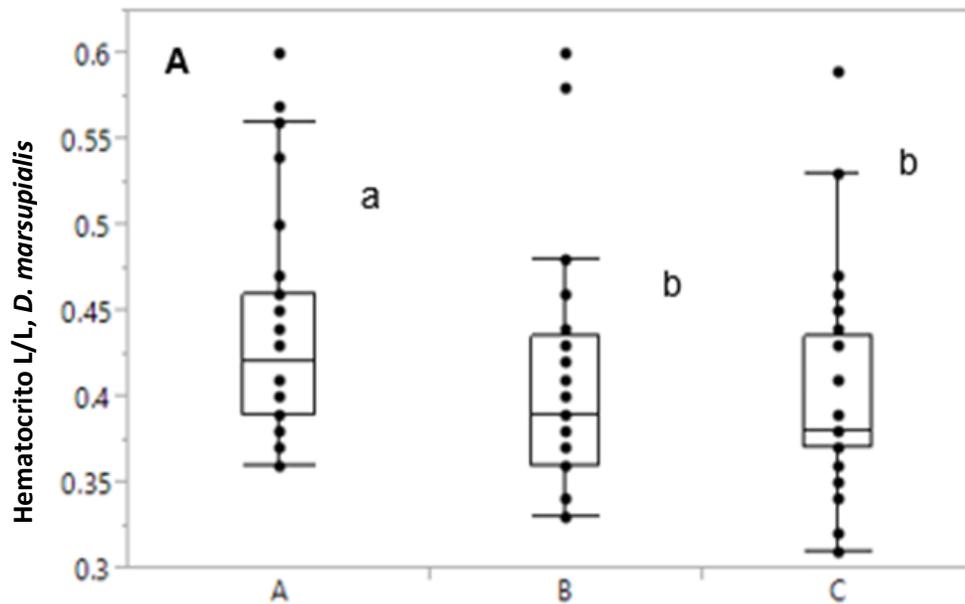


Figura 7. Comparaciones significativas de la relación N/L entre los tiempos A, B y C por especie. Diferencias significativas en A) *D. marsupialis* (n=27) ( $p=0.0001$ ), B) *D. virginiana* (n=33) ( $p=0.035$ ) y C) *P. opossum* (n=32) ( $p=0.002$ )

### 5.3.2 Hematocrito (L/L)

Las tres especies de didélfidos en la variable hematocrito (L/L) presentaron diferencia significativa entre los intervalos de tiempo A-B y A-C en donde se observó como la variable disminuyó. En ninguna de las tres especies el intervalo de tiempo B-C fue significativo, sin embargo, al igual que con la relación N/L, los cambios fueron significativamente más contundentes en la especie *P. opossum* tanto en el intervalo A-B como A-C (Figura 8) (Anexo 4).



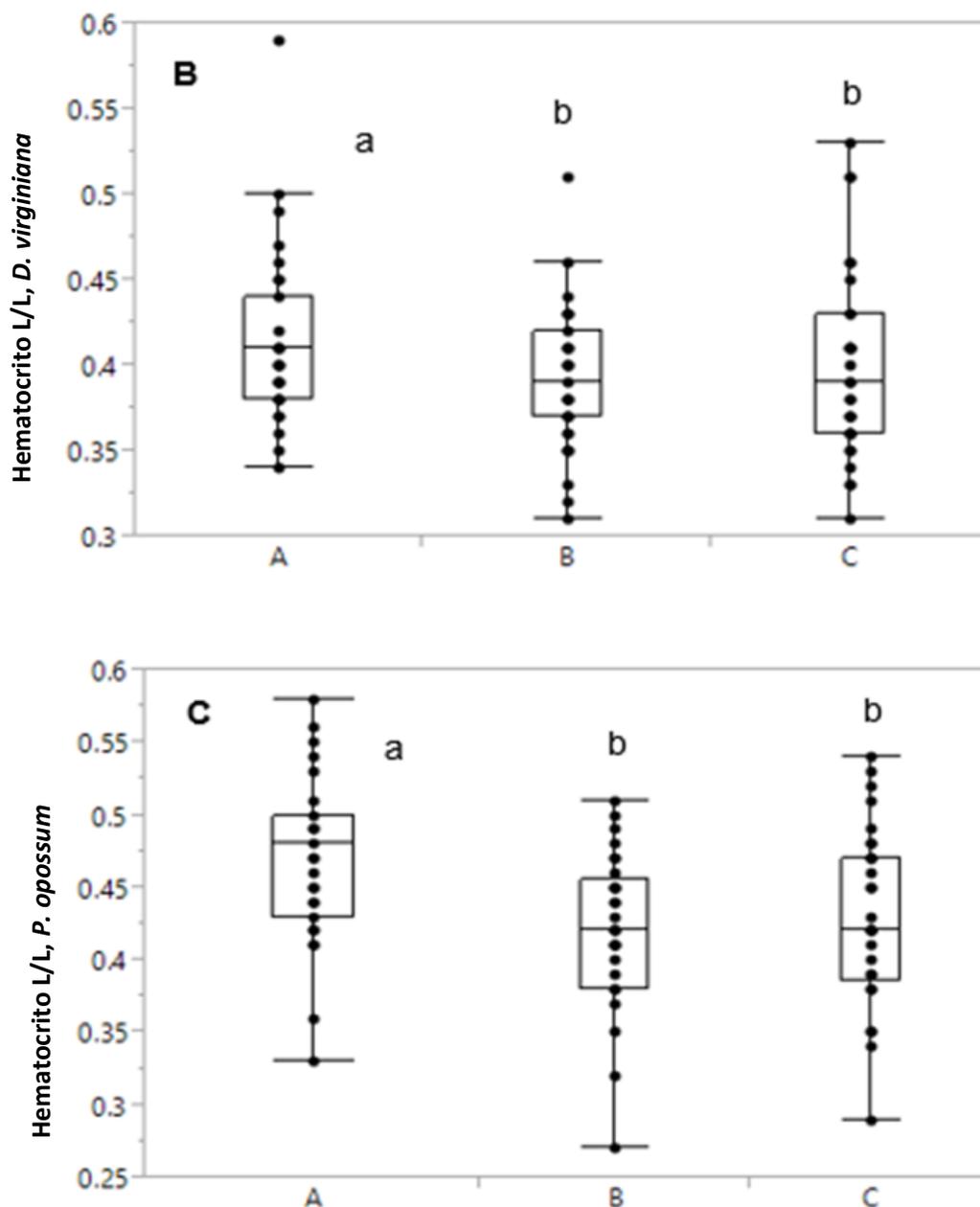


Figura 8. Comparaciones significativas en la variable hematocrito (L/L) entre los tiempos A, B y C por especie. Diferencias significativas en A) *D. marsupialis* (n=28) ( $p=0.00005$ ), B) *D. virginiana* (n=36) ( $p=0.000018$ ) y C) *P. opossum* (n=32) ( $p=5.41 \cdot 10^{-11}$ ).

### 5.3.3 Eritrocitos nucleados

Los eritrocitos nucleados variaron significativamente en los intervalos de tiempo de muestra (A-B, B-C y A-C) de *D. marsupialis* ( $p=0.013$ ) y *P. opossum* ( $p=0.047$ ). La especie

*D. marsupialis* presentó una disminución entre los intervalos A-B y A-C. Sin embargo, con la especie *P. opossum* hubo un efecto contrario en donde incrementó el valor de eritrocitos nucleados en el intervalo A-B, disminuyendo en el B-C y mostrando patrones fisiológicos distintos entre las dos especies. La especie *D. virginiana* no presentó diferencias significativas entre ninguno de los intervalos en este analito (Figura 9) (Anexo 4).

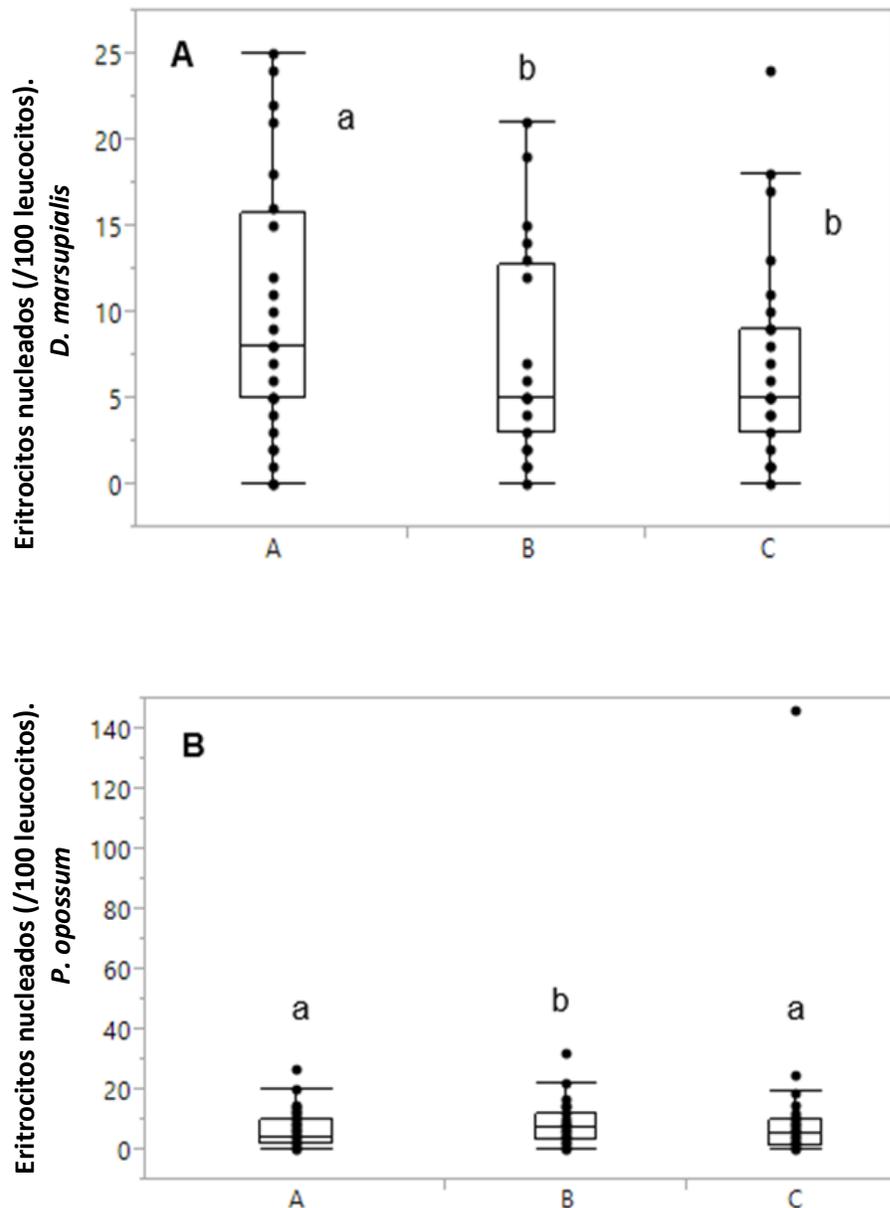


Figura 9. Comparaciones significativas en la variable eritrocitos nucleados (/100 leucocitos) entre los tiempos A, B y C por especie. Diferencias significativas A) *D. marsupialis* (n=28) ( $p=0.013$ ) y B) *P. opossum* (n=32) ( $p=0.047$ ).

## 6. Discusión

El uso de parámetros hematológicos y especialmente la interpretación de los perfiles leucocitarios ha generado mayor interés entre la comunidad científica durante los últimos años (Maceda-Veiga et al., 2015). Este nuevo enfoque puede deberse a que han sido considerados como un método alternativo o complementario para la medición de las respuestas fisiológicas ante factores estresantes, particularmente en estudios ecofisiológicos orientados a la conservación de especies silvestres (Davis, Maney, et al., 2008). Nuestra investigación documenta el uso y la comparación de estos parámetros en tres especies de marsupiales americanos para los cuales hay escasa información. Particularmente, evaluamos el empleo de analitos como los índices N/L y N/E; hematocrito y la concentración de eritrocitos nucleados que puedan reflejar cambios en contextos de estrés crónico y agudo en poblaciones silvestres en ambientes contrastantes.

### 6.1 Descripción y comparación de valores hematológicos entre especies

De las tres especies estudiadas en este trabajo, *D. virginiana* es la que cuenta con un mayor número de estudios. Los valores reportados en esta investigación para la especie *Didelphis virginiana*, son similares a los encontrados en otras poblaciones silvestres tanto en investigaciones de Estados Unidos de América como de México. Sin embargo, específicamente para los analitos del leucograma, en la mayoría de los estudios disponibles se reportan únicamente los valores relativos y no los absolutos, limitando su comparación. Además, en aquellos trabajos en donde fueron considerados los valores absolutos, no fueron evaluados el número de eritrocitos nucleados, por lo tanto, los analitos leucocitarios no recibieron la corrección para una interpretación más precisa. Al comparar los valores hematológicos reportados para poblaciones silvestres en vida libre y cautivas, se observan diferencias en estas condiciones; especialmente en la línea eritrocítica en donde se señalan valores más incrementados en individuos confinados (VGM, hematocrito, CGMH, hemoglobina). Esta diferencia es compatible con lo encontrado en nuestra investigación en donde los individuos fueron capturados en vida libre, mostrando valores hematológicos más bajos que aquellos individuos en cautiverio (Giacometti et al., 1972; Lewis, 1975; Youatt et al., 1961; Zepeda-Espinosa et al., 2019).

Para *Philander opossum*, la información publicada hasta ahora sobre parámetros hemáticos es particularmente escasa. En la comparación realizada en esta investigación, *P. opossum* presentó tres analitos de la línea eritrocítica incrementados respecto a *D. virginiana* y *D. marsupialis*, tales como: hematocrito, hemoglobina y plaquetas. Hershkovitz y colaboradores hicieron un estudio en Panamá reportando variaciones en las

concentraciones de hematocrito y hemoglobina al comparar distintas poblaciones de la misma especie que se encontraban en diferentes altitudes (Hershkovitz, 1997). Esta relación es similar con lo reportado para otras especies de mamíferos, en donde se ha identificado que las concentraciones de hematocrito y hemoglobina están estrechamente relacionadas una con la otra, y que, además, pueden verse influenciados por factores ambientales como la altitud (Promislow, 1991). Por otro lado, *P. opossum*, ha sido descrita como una especie de dieta carnívora, omnívora y frugívora-insectívora. De las tres especies evaluadas en esta investigación, es la que presenta hábitos más carnívoros (Castro-Arellano et al., 2005) (Hershkovitz, 1997) por lo tanto, este factor podría influir en el incremento de estos analitos eritrocíticos.

Por otra parte, *P. opossum* en esta investigación presenta la cantidad de plaquetas más elevadas respecto a las otras dos especies. En mamíferos se ha atribuido una relación negativa entre la concentración plaquetaria y el tamaño del individuo. Es decir, los individuos más pequeños suelen presentar este analito más elevado, hipotetizando que se encuentran con un mayor riesgo de exposición a heridas ocasionadas por depredadores, siendo más susceptibles a padecer lesiones y requiriendo de procesos homeostáticos más eficientes; presentando como consecuencia el incremento de este analito (Semple et al., 2002). Las especies *D. marsupialis* y *D. virginiana* tuvieron tallas similares y son más grandes que *P. opossum* que además presenta un comportamiento más agresivo y territorial (Hershkovitz, 1997; Semple et al., 2002). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la captura, contención y toma de muestra puedan ser también factores que influyan en la concentración de plaquetas u otros analitos eritrocíticos como consecuencia de eritrocitosis transitorias generadas por contracciones esplénicas (Clark P, 2004; Nuñez-Ochoa et al., 2007).

Al comparar las concentraciones de eritrocitos entre las tres especies de esta investigación, se encontró que *D. marsupialis* tuvo una concentración significativamente menor en comparación con *D. virginiana* y, aunque el resultado no fue significativo, también fue menor respecto a *P. opossum*. Esta diferencia podría atribuirse a que *D. marsupialis* tiene una conductancia térmica más elevada (McNab, 1978), por consecuencia esto podría estar asociado a un proceso de lisis de eritrocitos más acelerado, generando valores menores (Woods & Hellgren, 2003). En contraste, *D. marsupialis* tuvo mayor concentración de eritrocitos nucleados en comparación con *D. virginiana*. Valores extremos de eritrocitos nucleados en mamíferos domésticos usualmente están asociados a desbalances en la hematopoyesis, indicando patologías como anemia e inflamación aguda (Nuñez-Ochoa et al., 2007). Sin embargo, la presencia de estas células se reporta como una característica común tanto en marsupiales australianos y americanos, sin estar asociado a alguna patología, principalmente en la

Familia Macropodidae (Canfield et al., 1989; Melrose et al., 1987; Spencer & Speare, 1992; Young & Deane, 2005). *D. marsupialis* podría tener este analito incrementado debido a que evolutivamente es la más antigua de las tres especies estudiadas en este trabajo (Cruz-Salazar et al., 2014). Los mamíferos en la historia natural son más jóvenes que las aves o reptiles y anteriormente también contaban con eritrocitos nucleados, sin embargo, la evolución generó que eritrocitos no nucleados se desarrollaran para incrementar la concentración de hemoglobina y por ende mejorar el transporte de oxígeno (Zhang et al., 2011).

Para los analitos como volumen globular medio (VGM) que mide el tamaño del eritrocito, concentración de hemoglobina corpuscular media (CGMH) y hemoglobina promedio/eritrocito la especie *D. virginiana* presentó valores significativamente menores respecto a *D. marsupialis* y *P. opossum*. Este hallazgo llama la atención debido a que de las tres especies estudiadas es la especie más generalista, por lo tanto, tiene un mayor potencial para ajustarse a cambios de dieta y distintas condiciones ambientales, incluidas las urbanas (McManus, 1974). Sin embargo, la posibilidad de presentar desbalances nutricionales causados por los distintos tipos de la calidad y disponibilidad de alimento es más alta y puede verse reflejada en la disminución de ciertos analitos eritrocíticos (indicadores de bienestar fisiológico) en muchas especies (Johnstone et al., 2015). En el marsupial *Antechinus agilis*, se reportó que valores disminuidos de analitos como CGMH y VGM estaban relacionados con ambientes perturbados y fragmentados (Johnstone et al., 2012). Esta especie solo es simpátrica junto con *D. marsupialis* y otras especies de marsupiales al Este de México y Centroamérica, y se ha observado variación en otros parámetros fisiológicos (temperatura, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria etc) pudiendo generar valores bajos de algunos de los analitos del eritrograma, mismos que también se adaptan a la capacidad aeróbica y metabólica de un individuo (Johnstone et al., 2015). Además, *D. virginiana* en comparación con las otras dos especies tiene un origen evolutivo más reciente, considerando a *P. opossum* y *D. marsupialis* como plesiomórficas o especies más ancestrales (Medina-Romero et al., 2012).

El segundo conjunto de células que tienen especial interés en el análisis de la sangre se agrupa en el leucograma. El analito conocido como leucocitos, integra la suma total de todas las células leucocitarias. Esta variable se vio incrementada en la especie *D. virginiana* y los neutrófilos segmentados disminuidos en *P. opossum*. Los linfocitos estuvieron más elevados en *D. virginiana* en comparación con *D. marsupialis* y *P. opossum*. Sin embargo, es complicado tratar de interpretar estos resultados porque se desconoce la historia de vida de los individuos, además, los valores de referencia solo existen para *D. virginiana* y no para las otras dos especies, sin embargo, existen valores promedio y se pueden identificar los individuos que se desvían significativamente.

Los neutrófilos, linfocitos y eosinófilos son los principales leucocitos involucrados en los mecanismos asociados ante situaciones estresantes que modifican las concentraciones de estas células, ya sea enfrentando un tipo particular de patógeno o algún factor fisiológico que cambie sus concentraciones, tales como aquellos relacionados con el ambiente o condiciones individuales como especie, edad, sexo, estado reproductivo y tipo de respuesta ante el estrés de tipo agudo o crónico (Sapolsky et al., 2000). Tema más explicado adelante en este trabajo.

Finalmente, es importante mencionar que las diferencias interespecíficas en los análisis del eritrograma y leucograma de las tres especies de marsupiales americanos mostradas, pueden estar relacionadas con factores como el tamaño de los individuos y su metabolismo específico de especie (Promislow, 1991). También algunos valores hematológicos pueden variar debido a factores biológicos y ambientales como la pérdida de hábitat, urbanización y cambios en las interacciones ecológicas (Johnstone et al., 2012; McKinney, 2002; Todgham & Stillman, 2013).

## **6.2 Respuesta crónica al estrés.**

La cuantificación y comparación de las relaciones neutrófilo/linfocito y neutrófilo/eosinófilo, ha demostrado en algunos estudios que pueden generar patrones útiles para indicar el estado general de salud como consecuencia de las adversidades a las que se enfrentan las poblaciones a largo plazo o de forma crónica (D'Amico et al., 2017; Davis et al., 2008; Davis & Maney, 2018). Estudios de tipo biomédico así como ecológicos de múltiples grupos taxonómicos han mostrado que ante situaciones de estrés prolongado la proporción de neutrófilos incrementa en circulación mientras que la de los linfocitos y eosinófilos disminuye, expresándose en un incremento del índice N/L (linfopenia) y N/E (eosinopenia) (Davis & Maney, 2018).

### **6.2.1 Relación N/L**

En este trabajo la especie *D. marsupialis* ( $1.02 \pm 2.46$ ) mostró el índice N/L con valor significativo ( $p=0.0006$ ) más elevado en comparación con *P. opossum* ( $0.48 \pm 0.72$ ) y *D. virginiana* ( $0.68 \pm 0.92$ ). Las dos especies del género *Didelphis* son las más expuestas a eventos adversos, atribuidos por las condiciones de vida que tienen estos individuos en la interfase doméstico-silvestre y junto con otros estudios este índice se ha encontrado más elevado, sin embargo, *D. marsupialis* es considerada una especie menos generalista (menos tolerante a adversidades); respecto a *D. virginiana* que es una especie capaz de sobrevivir en ambientes más perturbados. Es interesante destacar que, de acuerdo con

los resultados de esta investigación, *P. opossum* presentó el menor índice N/L entre estas tres especies, ya que fue la más reactiva ante la captura y la que requiere de un ambiente menos perturbado para sobrevivir (tropical, con cuerpos de agua) (Carbillet et al., 2019). Sin embargo, en ambos sitios de captura de *P. opossum* existe un estrecho contacto con asentamientos urbanos, pero con un menor impacto antropogénico que aquellos sitios donde fueron capturadas las otras dos especies del género *Didelphis*. Además, la especie *P. opossum* fue la única de las tres que presentó diferencias significativas entre sitios.

En la especie *P. opossum* el sitio YUMKÁ ( $0.58 \pm 1.47$ ) que es considerada una reserva ecológica y zoológico, presentó el índice N/L más incrementado a pesar, de ser un lugar más conservado en comparación con la DACBIOL ( $0.43 \pm 0.56$ ), la cual es una universidad con constante flujo de actividad antropogénica. Carbillet y colaboradores (2019), en una población de venados provenientes de un sitio con la calidad de hábitat más pobre tuvieron un índice N/L bajo en comparación con el hábitat de mejor calidad. Escribano-Ávila y colaboradores (2013), plantearon la hipótesis sobre que los animales que viven en hábitats deficientes priorizan la correcta función del sistema inmune, prescindiendo de recursos para procesos fisiológicos menos importantes en ese momento como la reproducción. Esta hipótesis implica que el nivel de estrés debe atenuarse en los hábitats pobres para evitar deteriorar la función inmunológica (Carbillet et al., 2019; Davis, Maney, et al., 2008; Escribano-Ávila et al., 2013).

Es importante mencionar que en el caso de algunos metaterios como los petauros del azúcar (*Petaurus-breviceps*), zarigüeyas y koalas (*Phascolarctos-cinereus*) se ha descrito un patrón en donde los linfocitos son más abundantes que los neutrófilos; con base a esta característica han sido denominadas especies linfocíticas (Clark, 2004). Este atributo también ha sido documentado en algunos euterios (Heatley & Russell, 2020). Por lo tanto, quizás un incremento de la relación N/L podría indicar de manera más sobresaliente (debido a que son especies linfocíticas) que el individuo está pasando por situaciones adversas como deficiencias nutricionales, procesos fisiológicos reproductivos (lactancia, gestación etc) o algunos otros factores que reflejen el estrés crónico que puede estar experimentando el animal. Sin embargo, las especies evaluadas tampoco reflejaron cambios bajo proceso reproductivos.

En la literatura se plantea que, las diferencias entre individuos y especies ante la respuesta al estrés tanto conductual como fisiológica sean categorizadas. Es decir, que puedan ser caracterizadas con base a la manera en que reaccionan ante el afrontamiento continuo de situaciones adversas, catalogándolos en individuos reactivos y proactivos. Los individuos reactivos son típicamente tímidos, no agresivos, exploradores minuciosos y particularmente atentos a las modificaciones de su entorno, por lo tanto, exhiben una

pronunciada respuesta hormonal inducida por el estrés (alta reactividad HPA) coincidiendo con el comportamiento las dos especies del género *Didelphis*. Por el contrario, los individuos proactivos son audaces, agresivos y exploran activamente su entorno, siguiendo rutinas y mostrando una respuesta hormonal débil (baja reactividad del eje HPA) como *P. opossum* (Koolhaas et al. 1999; Réale et al. 2007).

El incremento del índice N/L pudiera sugerir que las especies del género *Didelphis* están probablemente enfrentando más situaciones estresantes intermitentes en su hábitat y vida en general que la del género *Philander*. O que meramente existen diferencias intrínsecas adquiridas entre especies y género. Es importante tomar en cuenta como en el género *Didelphis* solo existió diferencia significativa en la comparación entre especies, sin haber por temporalidad, sitio, sexo y estado reproductivo. Debido a esto y a que en otras especies de mamíferos si han existido diferencias respecto a este índice en comparación con aquellos factores, se sugiere la recolección de más datos para poder comparar con este estudio. También, es importante resaltar que este trabajo documenta por vez primera en nuestro conocimiento el uso de este índice para las tres especies de didélfidos.

### **6.2.2 Relación N/E**

En el caso del índice N/E (neutrófilo/ eosinófilo) solamente la especie *D. virginiana* presentó un resultado significativo respecto a la temporalidad, mostrándose incrementado en el periodo húmedo ( $41.5 \pm 26$ ) en comparación con los periodos de secas ( $4.45 \pm 3.18$ ) y canícula ( $5.39 \pm 7.06$ ). Los eosinófilos son leucocitos que generalmente se encuentran más abundantes en submucosas y áreas mucocutáneas como piel, tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario (Anne, 2020). Son importantes porque controlan cargas parasitarias y regulan reacciones alérgicas y de respuesta inflamatoria aguda (Davis et al., 2008). En nuestro caso con la especie *D. virginiana* esto puede deberse a que los individuos se encuentran más expuestos en el periodo húmedo a padecer infecciones debido a la disminución de la precipitación pluvial en comparación con el incremento de lluvias en el periodo canicular donde los animales pudieran estar experimentando menos estrés debido al incremento de la disponibilidad de agua y de recursos alimenticios (Gil et al., 2003). Sin embargo, llama la atención que el periodo húmedo tenga un índice N/E incrementado en comparación con el periodo de secas. Esto podría deberse a que el periodo húmedo es el que dura más (mayo-febrero), aumentando la posibilidad de que los individuos hubieran estado expuestos a una adaptación fisiológica ante organismos sistémica que estuviera influyendo en su incremento.

### 6.3 Respuesta aguda al estrés

El uso de parámetros hemáticos como indicadores para evaluar la respuesta aguda al estrés ha sido menos estudiado que lo reportado para la respuesta crónica. Sin embargo, es también de importancia debido a que se ha descubierto que por especie existen variaciones en cuanto al estímulo estresante agudo sobre los leucocitos. El índice N/L ha demostrado variar en algunas especies de mamíferos (*M. septentrionalis*, *Danio rerio*, *Alligato rmississippiensis*, *Salvelinus fontinalis*,) en cuestión de minutos y/o horas, mostrando distintos patrones (Biron & Benfey, 1994; Grzelak et al., 2017; Lance, 1991; Smith IV, 2011). Sin embargo, un analito aún más utilizado ha sido el hematocrito, el cual ha demostrado una sensibilidad más marcada ante estímulos agudos (Biron et al., 1994). El estudio de los eritrocitos nucleados fue considerado para esta sección debido a que son analitos que como se menciona desde el principio en este trabajo parecen estar de manera natural en el sistema hematológico de los marsupiales y fue de interés observarlos ante estímulos agudos (Clark, 2004). Finalmente es importante mencionar que estos son los primeros reportes del uso de estos analitos para el análisis de la respuesta aguda al estrés en estos marsupiales.

#### 6.3.1 Relación N/L

En nuestro trabajo las tres especies mostraron un incremento de la relación N/L en el intervalo A-B, en la especie *D. marsupialis* también en el intervalo A-C, pero *P. opossum* fue quien mostro un incremento en los tres intervalos de toma de muestra. Este patrón sugiere que *P. opossum* es la especie más reactiva a los factores estresantes de carácter agudo y que *D. virginiana* la más resiliente, ya que solo mostró un incremento significativo en el intervalo A-B. Sin embargo, dejando de un lado los valores significativos en las dos especies del género *Didelphis* se observa como la relación N/L tiende a elevar en el intervalo A-B, y después disminuir en el B-C siendo más marcado este patrón en *D. marsupialis*, a diferencia de la especie del género *Philander* que solo incrementa, mostrando una estabilización del índice menos marcada que las otras dos especies. Por lo general, la bibliografía reporta que el incremento de este índice puede tomar de horas a días (Davis & Maney, 2018), dependiendo la especie y en este caso estamos encontrando una diferencia entre género (*Didelphis* y *Philander*) que pudiera estar relacionada meramente con la biología y fisiología por especie o a algún otro factor.

En el bóvido *Rupicapra pirenaica* el incremento de este índice tardó una hora después de la exposición a un factor estresante, dos horas en el corzo *Capreolus capreolus*, 4 horas en el caballo *Equus ferus caballus* y 6 días en la rana americana *Rana catesbeiana* (Carbillet et al., 2019). Además, en animales bajo confinamiento como pollos la exposición

a un factor estresante de corta duración permaneció intacta hasta las 18 horas (Davis & Maney, 2018). En el caso del ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) en donde se tomaron muestras a los 16 minutos post-captura y después a las 12 horas se observó un incremento del índice N/L hasta la última toma (Whittington & Grant, 1983). Cabe aclarar que los ornitorrincos son prototerios y junto con los metaterios como los tlacuaches, son de los grupos taxonómicos más antiguos evolutivamente hablando.

De acuerdo con Carbillet y colaboradores (2019), quienes trabajaron con la especie de venado *Capreolus capreolus*, encontraron un incremento lineal de este índice, sugiriendo que el índice N/L no solo proporciona información de la respuesta crónica al estrés sino también de la aguda (captura, contención). Además, plantearon que este índice es más probable que se vea incrementado cuando las muestras son tomadas en intervalos de tiempo cortos, como en nuestro trabajo, a diferencia de intervalos más largos donde en teoría este índice se mantiene estable.

Estudios previos han sugerido que los niveles de glucocorticoides inducidos por estrés están relacionados negativamente con el gradiente reactivo-proactivo sobre el índice N/L. (Cockrem, 2007; Montiglio et al., 2015). Es decir, que los individuos que exhiben una respuesta conductual menos pronunciada a la captura (menor agresividad) tienen un mayor valor del índice N/L basal que aquellos que muestran una respuesta conductual más pronunciada (más agresividad). Davis y colaboradores (2018), mencionaron que al volverse usual la respuesta de tipo glucocorticoide en animales estresados o expuestos a un estrés ambiental crónico, pueden continuamente pero no siempre, presentar una respuesta atenuada ante el estrés agudo. Estos planteamientos coinciden con nuestros resultados en donde la especie *D. marsupialis* ante la evaluación de la respuesta crónica tuvo el índice N/L más elevado, a diferencia de *P. opossum* que fue la que lo tuvo más bajo, sin embargo, ante la respuesta aguda este resultado se vio invertido siendo esta última especie la más sensible.

### **6.3.2 Hematocrito**

Los resultados de esta investigación demuestran que las tres especies evaluadas presentan cambios en las concentraciones del hematocrito como respuesta a la captura y contención de los ejemplares. El patrón encontrado presenta como las concentraciones de este analito se encontraban elevadas en la toma inicial (A-B) y disminuían en las tomas seguidas (B-C, A-C) para las tres especies (Hargreaves & Hutson, 1990). Sin embargo, a pesar de que los valores fueron disminuyendo conforme paso el tiempo entre cada toma de muestra, no todas las especies presentaron el mismo patrón y en concreto hubo una diferencia notoria entre el género *Philander* respecto a *Didelphis*.

Se observó como los valores de los intervalos A-B y A-C disminuyeron en las tres especies, pero de forma más notoria en la especie *P. opossum*. El hematocrito ha sido utilizado como parámetro de estrés agudo ya que se ve influido por la liberación de catecolaminas y la activación del eje HHA respectivamente. Por ejemplo, en un estudio realizado en ovejas donde se les sometió a cuatro procesos de manejo estresantes (corte de uñas, contención física, mojado, sumersión y estiramiento) se observaron diferentes respuestas ante estos procedimientos entre este analito, demostrando su sensibilidad ante estímulos agudos (Hargreaves & Hutson, 1990).

Se ha hipotetizado que podría ser utilizado como indicador de declives poblacionales en fauna silvestre, mostrando información sobre aspectos fisiológicos, principalmente de la función aeróbica, por lo que es denominado el marcador más confiable para medir la capacidad de transporte de oxígeno (Maceda-Veiga et al., 2015). Aunque, su interpretación en poblaciones libres de fauna silvestre es un reto y es importante tomar en cuenta que las medidas eritrocíticas pueden verse fácilmente incrementadas o disminuidas, debido a factores estresantes, enfermedades y/o circunstancias fisiológicas y/o ambientales normales, encontrándose incrementado por razones como deshidratación y bajo en caso de infecciones bacterianas y/o parasitarias, (Johnstone et al., 2015). Las métricas eritrocíticas como el hematocrito pueden proporcionar miradas en patrones de la fisiología que de otra manera no serían fáciles de examinar, particularmente hablando de animales en vida libre. Otra ventaja de la obtención de analitos como el hematocrito es que la morfología de las células en teoría no debe cambiar rápidamente permitiendo observar un panorama más amplio (Johnstone et al., 2015).

Los valores eritrocíticos, por ende, parecen responder potencialmente a estímulos agudos a partir de la captura y/o manejo, incrementando el gasto cardiaco y la presión sanguínea generando esplenotransfusión e incremento. En este estudio la especie *P. opossum* muestra mayor sensibilidad en el hematocrito en comparación con las especies del género *Didelphis* y si recapitulamos y relacionamos que este analito mide la función aeróbica entonces podríamos hipotetizar que *P. opossum* es más sensible a estímulos agudos debido a los ambientes donde se desarrolla y quizás a que los sitios tanto YUMKÁ como DACBIOL en donde fue capturada la especie cumplen aún con ciertos niveles de conservación que permiten la vida y adaptabilidad de esta especie y por ende que cuando esta sea capturada o sometida a estrés reaccione. Este resultado, aporta información sobre la fisiología hematológica de especies importantes en los ecosistemas actuales, pudiendo ser de utilidad como indicadores biológicos (Beldomenico et al., 2008a; Johnstone et al., 2015).

Por último, aunque en este trabajo solo se discutió sobre el analito hematocrito, se sugiere en un futuro considerar la posibilidad de analizar índices más compuestos. Tal es el caso del índice hemoglobina-hematocrito residual (HHR) el cual se propuso en el 2011 como un indicador de fácil obtención de estrés e incluso proporcionando información más clara que la que aporta el análisis de variables independientes (Johnstone et al., 2010, 2012, 2015).

### 6.3.3 Eritrocitos nucleados

Para este analito la investigación en estudios que evalúen su fisiología del estrés es de mayor importancia debido a que no existen valores de referencia. Es importante mencionar que para las especies como marsupiales americanos su presencia debe ser considerada normal debido a que se han encontrado sin padecimientos patológicos en las especies ualabí rupestre de cuello rojo (*Petrogale brachyotis*), canguro arborícola de Huong (*Dendrolagus matschiei*), koalas (*Phascolarctos cinereus*), entre otros marsupiales (Clark, 2004; Spencer & Speare, 1992). En otras especies de mamíferos los eritrocitos nucleados son liberados de forma prematura de la médula ósea debido a un proceso de anemia regenerativa, hipoxia, envenenamiento o mielodisplasia (Heatley & Russell, 2020). Su presencia también se encuentra elevada en animales en etapas fetales o neonatales (Clark, 2004; Whittington & Grant, 1983).

En este estudio en el análisis de los eritrocitos nucleados encontramos diferencias significativas entre *D. marsupialis* donde este analito disminuyó entre intervalos (A-B, A-C) y *P. opossum* donde hubo un incremento (A-B) y disminución (A-C) sin embargo, no se encontró un patrón específico. La razón por las diferencias entre género y especies puede deberse meramente a diferencias biológicas y fisiológicas, pero si es importante tomar en cuenta el hecho de que la especie *D. virginiana* no presentó variaciones significativas, pudiendo deberse a su capacidad de adaptación como especie generalista (McRuer & Jones, 2009).

## 7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que existen diferencias significativas en los analitos sanguíneos de especies de didélfidos simpátricos de Tabasco. Algunos componentes sanguíneos, especialmente de la línea eritrocítica, difieren incluso entre especies taxonómicamente cercanas como es el caso de las dos

especies del género *Didelphis* y existiendo también diferencias marcadas respecto a *Philander*.

De acuerdo con nuestra revisión, son escasos los estudios que documenten las cantidades y variaciones de los analitos sanguíneos de las especies y poblaciones de marsupiales nativos de México. Particularmente para *Didelphis marsupialis* y *Philander opossum*, de quienes se carece de información que pueda ser utilizada para contrastar y considerar en la toma de decisiones a partir de estos indicadores. Se recomienda ampliamente continuar generando información a partir de distintas poblaciones de las diferentes especies para aumentar el tamaño de muestra y, a la larga, contar con parámetros de referencia para obtener los hemogramas completos de estas especies.

En este estudio se confirmó la presencia de eritrocitos nucleados en sangre periférica de ejemplares aparentemente sanos. La presencia y proporción de estas células en la sangre debe ser siempre considerada para una interpretación más precisa de los conteos leucocitarios y su posterior interpretación y uso.

En este estudio fue posible caracterizar por vez primera la estimación de índices leucocitarios para evaluar la respuesta fisiológica al estrés crónico en estas especies. El índice N/L y N/E presentaron patrones interesantes en las tres especies de marsupiales, confirmando su variación bajo sitios (índice N/L) y temporalidades (índice N/E) distintas. Este estudio fue consistente con otros en donde se confirma que los índices incrementan al encontrarse en condiciones tanto de estrés crónico como agudo, generando en concreto linfopenia y eosinopenia. De nuevo, es importante recabar datos que se basen en este tipo de índices para poder demostrar cuales son más sensibles y útiles dependiendo la especie. Por ejemplo, la especie *P. opossum* fue la única que presentó diferencia entre sitios, mostrándonos la sensibilidad como especie ante estas evaluaciones y *D. virginiana* mostró sensibilidad ante el índice N/E pero no ante el índice N/L. Para fortalecer este enfoque consideramos se deben determinar por medio de más análisis cuales son los índices más precisos por especie y con base en esto estandarizar la información para poder utilizar esta información fisiológica con fines de indicación biológica.

Fue de interés estudiar la respuesta aguda al estrés debido a que esto podía demostrar cuál de las especies era más resiliente ante fenómenos como la captura/contención de los individuos. Además de que la bibliografía mencionaba que índices leucocitarios como N/L no tienden a cambiar con facilidad ante respuestas agudas, sin embargo, existieron diferencias significativas en las tres especies estudiadas de este trabajo.

La investigación a través de décadas parece indicar que la cuantificación de parámetros hematológicos, tanto eritrocíticos como leucocitarios es importante, debido a que podemos observar patrones que nos indiquen el bienestar de las especies estudiadas y su relación con sus ambientes, entre otros factores. La evaluación de la respuesta aguda y crónica proporciona información para poder estandarizar el comportamiento de las variables más sensibles y/o estables a diversos estresores.

Este es el primer estudio en México que analiza la relación de variables como N/L, N/E, hematocrito y eritrocitos nucleados en tres especies y dos géneros de marsupiales americanos (*Didelphis* y *Philander*). Considerando todos los patrones discutidos en este trabajo. Concluimos que el análisis sobre todo de variables leucocitarias puede proveer información para en un futuro estandarizar métodos de investigación ecológica en vertebrados y su respuesta al estrés para el bienestar de los sujetos de estudio y sus poblaciones.

## 8. Referencias

- 55th World Health Assemblies. (2006). Constitution of the World Health Organization. *World Health Organization Chronicle*, 28(7), 308–311.
- Adler, Arboledo, & Travi. (1997). Population Dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 32(1), 7–11. <https://doi.org/10.1076/snfe.32.1.7.13462>
- Álvarez-Castañeda, Sergio-Tiojl, & Gonzalez-Ruiz, N. (2018). Spanish and English Vernacular names of mammals of North America. *Therya*, 9(1), 73–84. <https://doi.org/10.12933/therya-18-587>
- Anne, B. (2020). Eosinopenia. *Clinical Veterinary Advisor: The Horse*, 1(3), 1–11. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416099796003871>
- Bárceñas, & Legorreta. (2007). Registros notables de mamíferos en el sur del Distrito Federal, México. *Revista Mexicana de Mastozoología (Nueva Época)*, 11(1), 73. <https://doi.org/10.22201/ie.20074484e.2007.11.1.131>
- Beldomenico, Telfer, & Gebert. (2008a). Poor condition and infection: A vicious circle in natural populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1644), 1753–1759. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0147>
- Beldomenico, Telfer, & Gebert. (2008b). The dynamics of health in wild field vole populations: A haematological perspective. *Journal of Animal Ecology*, 77(5), 984–997. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01413.x>
- Biron, Benfey, & Tillmann. (1994). Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis Mitchill*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 13(2), 153–160. <https://doi.org/10.1007/BF00004340>
- Blair. (1996). Land use and avian species diversity along an urban gradient. *Ecological Applications*, 6(2), 506–519.

- Blood, Studdert, & Gay. (2007). Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary. En *Saunders Elsevier* (Vol. 8, p. 2172). <https://doi.org/10.1111/j.1911-3846.1997.tb00533.x>
- Bradley, & Altizer. (2007). Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.001>
- Branton, May, & Lott. (1997). Various blood parameters in commercial hens acutely and chronically infected with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 41(3), 540–547. <https://doi.org/10.2307/1592143>
- Brodin. (2007). Theoretical models of adaptive energy management in small wintering birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1486), 1857–1871. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1812>
- Buhr, Bonilla, Jimenez-Soto, & Köckritz-Blickwede. (2018). Extracellular trap formation in response to *Trypanosoma cruzi*. Infection in granulocytes isolated from dogs and common opossums, natural reservoir hosts. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00966>
- Canfield, O'Neill, & Smith. (1989). Haematological and biochemical reference values for the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Australian Veterinary Journal*, 66(10), 324–326. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1989.tb09717.x>
- Carbillet, Rey, & Lavabre. (2019). The neutrophil to lymphocyte ratio indexes individual variation in the behavioural stress response of wild roe deer across fluctuating environmental conditions. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 73(11), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00265-019-2755-z>
- Carey, & McLean. (1983). The Ecology of Rabies: Evidence of Co-Adaptation. *The Journal of Applied Ecology*, 20(3), 777. <https://doi.org/10.2307/2403126>
- Casagrande, de Oliveira Cesar, & Horta. (2009). Perfil hematológico de gambás *Didelphis aurita* e *D. albiventris* do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 31(2), 185–189. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v31i2.7007>
- Castro-Arellano, Zarza, & Medellín. (2005). *Philander opossum*. *Mammalian Species*, 638(638), 1–8. [https://doi.org/10.1644/1545-1410\(2000\)638<0001:po>2.0.co;2](https://doi.org/10.1644/1545-1410(2000)638<0001:po>2.0.co;2)
- Clark, P. (2004). *Haematology of Australian mammals*. CSIRO Publishing.
- Cockrem, J. F. (2007). Stress, corticosterone responses and avian personalities. *Journal of Ornithology*, 148, 169–178. <https://doi.org/10.1007/s10336-007-0175-8>
- Cooke, S. J., Hinch, S. G., & Donaldson, M. (2012). Conservation physiology in practice: how physiological knowledge has improved our ability to sustainably manage Pacific salmon during up-river migration. *Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences*, 367, 1757–1769. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0022>
- Cowell, R., & Tyler. R. (2002). *Cytology and hematology of the horse*. Mosby. A Harcourt Health Sciences Company.
- Cruz-Salazar, Ruiz-Montoya, Navarrete-Gutiérrez, Espinoza-Medinilla, Vázquez-Domínguez, & Vázquez, B. (2014). Diversidad genética y abundancia relativa de *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(1), 251–261. <https://doi.org/10.7550/rmb.36116>
- Cruz-Salazar, Ruiz-Montoya, Navarrete-Gutiérrez, & Vázquez. (2016). Influence of the composition and structure of modified landscapes on the abundance of two marsupials during the dry season in Chiapas, Mexico. *Therya*, 7(3), 393–406. <https://doi.org/10.12933/therya-16-401>
- D'Amico, Bertellotti, Benzal, J., Coria, N., Vidal, V., Diaz, J. I., & Barbosa, A. (2016). Leukocyte counts in different populations of Antarctic *Pygoscelid* penguins along the

- Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, 39(2), 199–206. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1771-3>
- D'Amico, Bertellotti, Diaz, Coria, Vidal, & Barbosa. (2014). Leucocyte levels in some antarctic and non-antarctic penguins. *Ardeola*, 61(1), 145–152. <https://doi.org/10.13157/arla.61.1.2014.145>
- D'Amico, Coria, Palacios, M. G., Barbosa, A., & Bertellotti, M. (2016). Physiological differences between two overlapped breeding Antarctic penguins in a global change perspective. *Polar Biology*, 39(1), 57–64. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1604-9>
- D'Amico, Palacios, Baker, A., González, P., Madrid, E., & Bertellotti, M. (2017). Physiologic parameters and their response to handling stress in a neotropical migratory shorebird during the nonbreeding season. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(3), 437–446. <https://doi.org/10.7589/2016-02-039>
- Davis, Andrew, & Maerz. (2008). Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia*, 2008(3), 613–617. <https://doi.org/10.1643/cp-07-133>
- Davis, Andrew, & Maerz. (2011). Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. *Journal of Herpetology*, 45(1), 40–44. <https://doi.org/10.1670/10-180.1>
- Davis, & Maney. (2018). The use of glucocorticoid hormones or leucocyte profiles to measure stress in vertebrates: What's the difference? *Methods in Ecology and Evolution*, 9(6), 1556–1568. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13020>
- Davis, Maney, & Maerz. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22(5), 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- Deem, Norton, & Mitchell. (2009). Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the Coast of Georgia USA. *Journal of wildlife diseases*, 45, 41–56.
- Ditchkoff, Saalfeld, & Gibson. (2006). Animal behavior in urban ecosystems: Modifications due to human-induced stress. *Urban Ecosystems*, 9(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s11252-006-3262-3>
- Escribano-Ávila, Pettorelli, N., & Virgós, E. (2013). Acta Oecologica Testing Cort-Fitness and Cort-Adaptation hypotheses in a habitat suitability gradient for roe deer. *Acta Oecologica*, 53, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2013.08.003>
- Fischer, Schneider, Ahlers, & Miller. (2015). Categorizing wildlife responses to urbanization and conservation implications of terminology. *Conservation Biology*, 29(4), 1246–1248. <https://doi.org/10.1111/cobi.12451>
- Franco, Contreras, & Nespolo. (2013). Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 166(2), 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.07.010>
- Giacometti, L., Berntzen, A., & Bliss, M. (1972a). Hematologic parameters of the opossum (*Didelphis virginiana*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 43(2), 287–292. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(72\)90187-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(72)90187-9)
- Giacometti, L., Berntzen, A. K., & Bliss, M. L. (1972b). Hematologic parameters of the opossum (*Didelphis virginiana*). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 43(2), 287–292. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(72\)90187-9](https://doi.org/10.1016/0300-9629(72)90187-9)
- Gil, H., Magy, N., Mauny, F., & Dupond, J. L. (2003). Valeur de l'éosinopénie dans le diagnostic des syndromes inflammatoires: Un « vieux » marqueur revisité. *Revue de Medecine Interne*, 24(7), 431–435. [https://doi.org/10.1016/S0248-8663\(03\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0248-8663(03)00138-3)

- Grzelak, Davis, & Caraker. (2017). Stress leukogram induced by acute and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *American Association for Laboratory Animal Science*, 67(3), 263–269.
- Güneş, M. (2020). Is neutrophil/eosinophil ratio at admission a prognostic marker for in-hospital mortality of acute ischemic stroke? *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 29(8), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104999>
- Hajduk, Copland, & Schultz. (1992). Effects of capture on hematological values and plasma cortisol levels of free-range koalas (*Phascolarctos cinereus*). *Journal of wildlife diseases*, 28(3), 502–506. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-28.3.502>
- Hargreaves, A., & Hutson, G. (1990). The stress response in sheep during routine handling procedures. *Applied Animal Behaviour Science*, 26(1–2), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(90\)90089-V](https://doi.org/10.1016/0168-1591(90)90089-V)
- Harvey, J. (2012). Evaluation of leukocytic disorders. En *Veterinary Hematology* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4377-0173-9.00005-1>
- Haynes, J., & Skidmore, G. (1991). Haematology of the dasyurid marsupials *Sminthopsis crassicaudata* and *Sminthopsis macroura*. *Australian Journal of Zoology*, 39(2), 131–142. <https://doi.org/10.1071/ZO9910157>
- Heatley, & Russell. (2020). *Exotic Animal Laboratory Diagnosis* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Herskovitz, P. (1997). Composition of the family Didelphidae Gray, 1821 (*Didelphoidea*: Marsupialia), with a review of the morphology and behavior of the included Four-Eyed Pouched Opossums of the genus *Philander* Tiedemann, 1808. *Fieldiana: Zoology. New series*, 86.
- Hing, Narayan, Thompson, & Godfrey. (2016). The relationship between physiological stress and wildlife disease: consequences for health and conservation. *Wildlife Research*, 43(1), 51. <https://doi.org/10.1071/wr15183>
- Hortelano-Moncada, & Cervantes. (2011). Diversity of wild mammals in a megalopolis: Mexico City, Mexico. *Changing Diversity in Changing Environment*. <https://doi.org/10.5772/24450>
- Hufschmid, Beveridge, & Handasyde. (2013). Haematology and serum biochemistry of adult free-ranging mountain brushtail possums (*Trichosurus cunninghami*), including correlations with season, sex, age, habitat type and disease status. *Australian Journal of Zoology*, 61(6), 430–445. <https://doi.org/10.1071/ZO12097>
- Jansen, Chagas, & Rodriguez. (2018). *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3067-2>
- Jerez, Pertierra, & Benayas. (2013). Pollution and physiological variability in gentoo penguins at two rookeries with different levels of human visitation. *Antarctic Science*, 25(2), 329–338. <https://doi.org/10.1017/S0954102012000739>
- Johnstone, Lill, & Reina. (2012). Does habitat fragmentation cause stress in the *agile antechinus*? A haematological approach. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(1), 139–155. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0598-7>
- Johnstone, Lill, & Reina. (2015). Use of erythrocyte indicators of health and condition in vertebrate ecophysiology: A review and appraisal. *Biological Reviews*, 92(1), 150–168. <https://doi.org/10.1111/brv.12219>
- Johnstone, Reina, & Lill. (2010). Impact of anthropogenic habitat fragmentation on population health in a small, carnivorous marsupial. *Journal of Mammalogy*, 91(6), 1332–1341. <https://doi.org/10.1644/10-mamm-a-034.1>

- Jokimäki, Kaisanlahti, & Suhonen. (2011). Merging wildlife community ecology with animal behavioral ecology for a better urban landscape planning. *Landscape and Urban Planning*, 100(4), 383–385. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2011.02.001>
- Kizhina, A., Uzenbaeva, L., Ilyukha, V., & Tyutyunnik, N. (2017). Morphological abnormalities of blood and bone marrow leukocytes and age-related changes in different leukocyte counts in the American mink (*Neovison vison*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(4), 570–577. <https://doi.org/10.3906/vet-1610-82>
- Lance. (1991). Acute stress suppresses plasma estradiol levels in female alligators (*Alligator Mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol*, 100(3), 649–651.
- Latimer, Mahaffey, & Prasse. (2005). *Patología Clínica Veterinaria* (4a ed.). Multimedica.
- Legey, Pinho, & Chagas. (1999). Humoral immune response kinetics in *Philander opossum* and *Didelphis marsupialis* infected and immunized by *Trypanosoma cruzi* employing an immunofluorescence antibody test. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(3), 371–376. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000300016>
- Lehmann, Sturenberg, & Mock. (1987). The changes of the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson ) to an artificial and a natural infection with *Yersinia ruckeri*. *Landesanstalt fur Fischerei NRW*, 3, 174–183.
- León. (2017). *Valores Hematológicos de Tres Especies de Tlacuaches en Tabasco, México*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Lewis. (1975). Comparative hematology: studies on opossums *Didelphis marsupialis* (*virginianus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 51(2), 275–280. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(75\)90371-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(75)90371-0)
- Lindenmayer, Lacy, & Pope. (2000). Testing a simulation model for population viability analysis. *Ecological Applications*, 10(2), 580–597. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0580:TASMPF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0580:TASMPF]2.0.CO;2)
- Lipkin. (1979). Eosinophil Counts in Bacteremia. *Archives of Internal Medicine*, 139(4), 490–491. <https://doi.org/10.1001/archinte.1979.03630410094035>
- Maceda-Veiga, Figuerola, & Martínez-Silvestre. (2015). Inside the Redbox: Applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Science of the Total Environment*, 514, 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.004>
- Magle, Hunt, & Vernon. (2012). Urban wildlife research: past, present, and future. *Biological Conservation*, 155, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.06.018>
- Markovchick-Nicholls, Regan, & Deutschman. (2008). Relationships between human disturbance and wildlife land use in urban habitat fragments. *Conservation Biology*, 22(1), 99–109. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2007.00846.x>
- McKinney. (2002). Urbanization, biodiversity, and conservation. *BioScience*, 52(10), 883–890. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0883:ubac\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0883:ubac]2.0.co;2)
- Mcmanus. (1974). *Didelphis virginiana*. *Mammalian Species*, 40, 1–6. <http://www.jstor.org/stable/3503783> .
- McNab. (1978). The comparative energetics of neotropical marsupials. *Journal of comparative physiology*, 125(2), 115–128. <https://doi.org/10.1007/BF00686747>
- McRuer, & Jones. (2009). Behavioral and nutritional aspects of the virginian opossum (*Didelphis virginiana*). *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 12(2), 217–236. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.01.007>
- Medina-Romero, Goyenechea, & Castillo-Cerón. (2012). Medidas filogenéticas aplicadas para la conservación de los marsupiales mexicanos. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(4), 1215–1226. <https://doi.org/10.7550/rmb.30966>

- Meillère, Brischoux, & Parenteau. (2015). Influence of urbanization on body size, condition, and physiology in an urban exploiter: A multi-component approach. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135685>
- Melrose, Pearse, & Jupe. (1987). Haematology of the Australian eastern quoll, *Dasyurus viverrinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *88*(2), 239–241. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629\(87\)90476-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0300-9629(87)90476-2)
- Mihart, Moreno, & Fund. (2016). Mamíferos del estado de Tabasco, México. *Riqueza y conservación de los mamíferos en México a nivel estatal*, *1*(1), 441–470. <https://www.researchgate.net/publication/310327381>
- Montiglio, Garant, & Pelletier. (2015). Intra-individual variability in fecal cortisol metabolites varies with lifetime exploration and reproductive life history in eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *69*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1812-x>
- Moraes, Lew, & Costa. (2016). *Didelphis marsupialis*, common opossum. The IUCN Red list of threatened species. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T40501A22176071.en>
- Navarro-Frías, González-Ruíz, & Álvarez-Castañeda. (2007). Los mamíferos silvestres de Milpa Alta, Distrito Federal: Lista actualizada y consideraciones para su conservación. *Acta zoológica mexicana*, *23*(3), 103–124.
- Núñez-Ochoa, Bouda, & Quiroz. (2007). Patología clínica veterinaria. En *Patología Clínica Veterinaria* (pp. 1–344). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Paes, Calderon, & Barioni. (2012). The leukogram as an indicator stress on weaning and after road transport in Nelore calfs. *Semina: Ciências Agrárias*, *33*(1), 305–312. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p305>
- Partecke, Schwabl, & Gwinner. (2006). Stress and the city: Urbanization and its effects on the stress physiology in European blackbirds. *Ecology Society of America*, *87*(8), 1945–1952. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[1945:SATCUA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1945:SATCUA]2.0.CO;2)
- Perez. (2016). *Seroprevalencia de rabia y leptospira en poblaciones de perros de libre rango (Canis familiaris) y tlacuaches (Didelphis spp.) que habitan dos reservas ecológicas*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15417.36964>
- Pérez-Hernández. (2016). *Didelphis virginiana*. *The IUCN Red List of Threatened Species* (Vol. 8235).
- Pérez-Hernández, Costa, & Brito. (2014). *Philander opossum*, gray four-eyed opossum. The IUCN Red List of Threatened Species. En *Animal Diversity Web* (Vol. 8235). [http://animaldiversity.org/accounts/Philander\\_opossum/](http://animaldiversity.org/accounts/Philander_opossum/)
- Peutz, Oorschot, & Johnson. (1996). The leucogram as an indicator of marine-cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), health in The Netherlands. *Aquaculture Research*, *27*(6), 437–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1996.tb01273.x>
- Promislow. (1991). The evolution of mammalian blood parameters: patterns and their interpretation. *Physiological Zoology*, *64*(2), 393–431.
- Reid. (2009). A field guide to the mammals of Central America & Southeast Mexico. *Journal of Mammalogy*, *336*(3), 263. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2014.10.015>
- Robel, Lochmiller, & McMurry. (1996). Environmental, age and sex effects on Cotton rat (*Sigmodon hispidus*) Hematology. *Journal of Wildlife Diseases*, *32*(2), 390–394. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-32.2.390>

- Rodríguez-Ruíz, Hernández-Jasso, & Estrada-Drouaillet. (2017). Translocación de la urraca-hermosa cara negra *Calocitta colliei* (Passeriformes: *Corvidae*) a Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología*, 18, 24–32.
- Romano, Rodas, & Valdez. (2010). Stress in wildlife species: Noninvasive monitoring of glucocorticoids. *NeuroImmunoModulation*, 17(3), 209–212. <https://doi.org/10.1159/000258726>
- Ryser-Degiorgis, & Marie-Pierre. (2013). Wildlife health investigations : needs, challenges and recommendations. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-223>
- Sánchez-Sarmiento, Zwarg, & Fernandes-Santos. (2015). Hematological parameters and the variations resulting from stress of *Alouatta caraya* during a wildlife rescue program in Brazil. *American Journal of Primatology*, 77(3), 246–253. <https://doi.org/10.1002/ajp.22327>
- Sapolsky, Romero, & Munck. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Preparative Actions. *Endocrine Reviews*, 21, 55–89. <https://doi.org/10.1210/er.21.1.55>
- Schalm's. (2010). *Veterinary Hematology* (6a ed., Vol. 1). Wiley-Blackwell.
- SEMARNAT. (2010). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. En *DOF*.
- Semple, Cowlshaw, & Bennett. (2002). Immune system evolution among anthropoid primates: Parasites, injuries and predators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1495), 1031–1037. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1950>
- Setterberg, & Newman. (2004). Utility of eosinophil count as predictor of bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 38(460–1), 460–461.
- Sirois, & Hendrix. (1998). Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. En *The Canadian Veterinary Journal* (6a ed., Vol. 39, Número 2). Elsevier/Mosby.
- Smith IV. (2011). *Neutrophil:Lymphocyte ratio as a possible indicator of chronic anthropogenic stress in bats (Mammalia: Chiroptera)*.
- Spencer, & Speare. (1992). Hematology of wild allied rock-wallabies, *Petrogale-Assimilis* (Marsupialia, Macropodidae), in North Queensland. *Australian Journal of Zoology*, 40(4), 355–364.
- Stephen. (2014). Toward a modernized definition of wildlife health. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(3), 427–430. <https://doi.org/10.7589/2013-11-305>
- Tamay-Segovia, Blum-Domínguez, & Núñez-Oreza. (2017). Presence of virginia opossum (*Didelphis virginiana*) and Pic (*Triatoma dimidiata*) infected with *Trypanosoma cruzi* in urban areas: Preliminary evaluation in the city of Campeche, Mexico. *Austral journal of veterinary sciences*, 49(1), 35–38. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322017000100035>
- Thrall, Weiser, & Allison. (2004). Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. En *Veterinary Clinical Pathology* (Vol. 33, Número 4). <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2004.tb00383.x>
- Todgham, & Stillman. (2013). Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: Relevance in a changing world. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 539–544. <https://doi.org/10.1093/icb/ict086>
- Touma, & Palme. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(0), 54–74. <https://doi.org/10.1196/annals.1343.006>
- Uzenbaeva, Vinogradova, & Kizhina. (2013). Influence of melatonin on neutrophil-to-lymphocyte ratio in mammalian blood depending on age of the animal. *Advances in Gerontology*, 3(1), 61–66. <https://doi.org/10.1134/S2079057013010141>

- Voss, & Jansa. (2012). Snake-venom resistance as a mammalian trophic adaptation: Lessons from didelphid marsupials. *Biological Reviews*, 87(4), 822–837. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00222.x>
- Whittington, & Grant. (1983). Haematology and blood chemistry of the free-living platypus, *ornithorhynchus anatinus* (shaw) (monotremata: Ornithorhynchidae). *Australian Journal of Zoology*, 31(4), 475–482. <https://doi.org/10.1071/ZO9830475>
- Wibrow, Ho, & Flexman. (2011). Eosinopenia as a diagnostic marker of bloodstream infection in hospitalised paediatric and adult patients: A case-control study. *Anaesthesia and Intensive Care*, 39(2), 224–230. <https://doi.org/10.1177/0310057x1103900211>
- Woods, & Hellgren. (2003). Seasonal changes in the physiology of male Virginia opossums (*Didelphis virginiana*): Signs of the dasyurid semelparity syndrome? *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(3), 406–417. <https://doi.org/10.1086/374285>
- Xia. (2020). Eosinopenia as an early diagnostic marker of COVID-19 at the time of the epidemic. *EClinicalMedicine*, 23, 19–20. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100398>
- Youatt, Fay, & Howe. (1961). BRIEF NOTE Hematologic data on some small mammals. *Blood*, 18(6), 758–763.
- Young, & Deane. (2005). Morphology and ultrastructure of blood cells of the tammar wallaby *Macropus eugenii*. *Comparative Clinical Pathology*, 14(1), 36–47. <https://doi.org/10.1007/s00580-005-0555-5>
- Zavala-Velázquez, Barrera-Pérez, & Rodríguez-Félix. (1996). Infection by *Trypanosoma cruzi* in mammals in Yucatan, Mexico: A serological and parasitological study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 38(4), 289–292. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651996000400009>
- Zepeda-Espinosa, Alonzo-Salomón, & Reyes-Novelo. (2019). Haematological parameters in a free-ranging population of *Didelphis virginiana* from Mexico. *Austral Journal Veterinary Science*, 130(491), 125–130.
- Zhang, Cheng, & Xu. (2011). Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. *IUBMB Life*, 63(7), 560–565. <https://doi.org/10.1002/iub.490>
- Zhelev, Popgeorgiev, & Angelov. (2013). Investigating the changes in the morphological content of the blood of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Ranidae) as a result of anthropogenic pollution and its use as an environmental bioindicator. *Acta Zoologica Bulgarica*, 65(2), 187–196.
- Zinsstag, Schelling, Waltner-Toews, & Tanner. (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine*, 101(3–4), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>

## 9. Anexos

Anexo 1. Análisis estadístico de la comparación entre las tres especies de marsupiales americanos de todos los analitos del hemograma (8 variables) y leucograma (7 variables). Con asterisco (\*) aquellas variables que fueron significativas ( $p=0.5$ ). PO=*Philander opossum*, DV= *D. virginiana*, DM= *D. marsupialis*.

Estadística no paramétrica. Prueba de Kruskal Wallis y de Dunn como post- hoc.						
Variable	Especie	Mediana±RI*	Intervalo Q1-Q3	Valor p (prob <0.5)	Comparación	Dunn (Post-Hoc)
Hematocrito (L/L)*	<i>D. marsupialis</i> (32)	0.42±0.08	0.37-0.46		PO-DV	<0.0001
	<i>D. virginiana</i> (37)	0.41±0.09	0.35-0.44		PO-DM	0.0037
	<i>P. opossum</i> (46)	0.48±0.09	0.41-0.5	<0.0001	DV-DM	0.8622
Hemoglobina (g/L)*	<i>D. marsupialis</i> (32)	120.5±29	105-134		PO-DV	<0.0001
	<i>D. virginiana</i> (37)	118±24.50	101-125.5		PO-DM	0.0273
	<i>P. opossum</i> (46)	135±22.55	119.7-145.25	<0.0001	DV-DM	0.2552
Eritrocitos ( $\times 10^{12}/L$ )*	<i>D. marsupialis</i> (32)	4.6±1.4	3.95-5.35		PO-DV	1.000
	<i>D. virginiana</i> (37)	5.16±0.87	4.67-5.54		PO-DM	0.054
	<i>P. opossum</i> (46)	5.19±1.28	4.29-5.57	0.0251	DV-DM	0.0459
VGM (fL)*	<i>D. marsupialis</i> (32)	89.75±3.55	84.95-93.3		PO-DV	<0.0001
	<i>D. virginiana</i> (37)	80.5±11.48	71.62-83.1		PO-DM	0.6450
	<i>P. opossum</i> (46)	91.5±9.04	86.21-95.25	<0.0001	DV-DM	<0.0001
CGMH (g/L)*	<i>D. marsupialis</i> (32)	286±17.8	274.2-292		PO-DV	1.000
	<i>D. virginiana</i> (37)	280±25.5	265.8-291		PO-DM	0.1055
	<i>P. opossum</i> (46)	281±18.85	270.4-289.25	0.0321	DV-DM	0.0404
Hg prom/eritrocito (pg)*	<i>D. marsupialis</i> (32)	26±2.45	24.4-26.85		PO-DV	<0.0001
	<i>D. virginiana</i> (37)	22.6±2.54	20.66-23.2		PO-DM	1.000
	<i>P. opossum</i> (46)	25.8±1.71	24.84-26.55	<0.0001	DV-DM	<0.0001
Plaquetas ( $\times 10^9/L$ )*	<i>D. marsupialis</i> (32)	216±224.1	97.9-322		PO-DV	<0.0001
	<i>D. virginiana</i> (37)	188±264.2	66.8-331		PO-DM	0.0020
	<i>P. opossum</i> (46)	356±258.45	184.8-443.25	<0.0001	DV-DM	1.000
Eritrocitos nucleados (/100leucocitos)*	<i>D. marsupialis</i> (32)	8±14.45	1.3-15.75		PO-DV	0.1592
	<i>D. virginiana</i> (37)	2±5.5	0-5.5		PO-DM	0.0645
	<i>P. opossum</i> (46)	4±10	0-10	0.0004	DV-DM	0.0002
Leucocitos ( $\times 10^9/L$ )*	<i>D. marsupialis</i> (32)	6.29±5.89	4.07-9.96		PO-DV	<0.0001
	<i>D. virginiana</i> (37)	10.24±5.59	7.63-13.22		PO-DM	1.000
	<i>P. opossum</i> (46)	6.29±5.67	3.36-9.03	<0.0001	DV-DM	0.0006
Neutrófilos segmentados ( $\times 10^9/L$ )*	<i>D. marsupialis</i> (32)	2.92±4.38	1.03-5.41		PO-DV	<0.0001
	<i>D. virginiana</i> (36)	3.69±3.21	1.82-5.03		PO-DM	0.0028
	<i>P. opossum</i> (46)	1.61±1.89	0.80-2.69	<0.0001	DV-DM	0.5585
Neutrófilos banda ( $\times 10^9/L$ )	<i>D. marsupialis</i> (32)	0±0	0-0			
	<i>D. virginiana</i> (37)	0±0	0-1			
	<i>P. opossum</i> (46)	0±0	0-2	0.3485		
Linfocitos ( $\times 10^9/L$ )*	<i>D. marsupialis</i> (32)	2.37±2.33	1.33-3.66		PO-DV	0.0325
	<i>D. virginiana</i> (37)	5.27±5.67	2.18-7.85		PO-DM	0.0559
	<i>P. opossum</i> (46)	3.59±3.95	1.66-5.61	<0.0001	DV-DM	<0.0001
Monocitos ( $\times 10^9/L$ )	<i>D. marsupialis</i> (32)	0.07±0.26	0-0.26			
	<i>D. virginiana</i> (37)	0±0.32	0-0.32			
	<i>P. opossum</i> (46)	0.04±0.41	0-0.41	0.1363		
Eosinófilos ( $\times 10^9/L$ )	<i>D. marsupialis</i> (32)	0.64±0.83	0.08-0.91			
	<i>D. virginiana</i> (37)	0.72±0.91	0.23-1.14			
	<i>P. opossum</i> (46)	0.57±0.82	0.07-0.89	0.0599		
Basófilos ( $\times 10^9/L$ )	<i>D. marsupialis</i> (32)	0±0.05	0-0.05			
	<i>D. virginiana</i> (37)	0±0.34	0-0.34			
	<i>P. opossum</i> (46)	0±0.21	0-0.21	0.0685		

Anexo 2. Análisis estadístico de la respuesta crónica al estrés (tiempo A) en la relación N/L por especie, sitio, edad, temporalidad, sexo y estado reproductivo. Con asterisco (\*) y en negritas valores significativos ( $p=0.5$ ).

<b>Estadística no paramétrica. Prueba de Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney. Prueba post-hoc de Dunn</b>					
<b>Comparaciones</b>	<b>Variable (n)</b>	<b>Mediana±RI</b>	<b>Intervalo Q1-Q3</b>	<b>Dunn (Post-Hoc)</b>	<b>Valor p</b>
Rel N/L*Muestra A*Especie	<i>D. marsupialis</i> (32)	1.02±2.46	0.27-2.73	PO-DV	0.282
	<i>D. virginiana</i> (35)	0.68±0.92	0.22-1.14	DV-DM	0.1512
	<i>P. opossum</i> (46)	0.48±0.72	0.13-0.85	PO-DM	<b>0.0006*</b>
	Valor ( $p<0.5$ )	<b>0.001*</b>			
Rel N/L*Muestra A*DM*Sitio	DACBIOL (4)	2.49±3.52	0.96-4.48		
	LA FLORIDA (8)	0.9±1.45	0.29-1.74		
	YUMKÁ (20)	1.02±2.48	0.25-2.73		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.3047			
Rel N/L*Muestra A*DV*Sitio	DACBIOL (11)	0.86±1.2	0.30-1.5		
	ZONA MILITAR (23)	0.56±0.94	0.20-1.14		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.3769			
Rel N/L*Muestra A*PO*Sitio	DACBIOL (27)	0.43±0.56	0.12-0.68		
	YUMKÁ (17)	0.58±1.47	0.17-1.64		
	Valor ( $p<0.5$ )	<b>0.0371*</b>			
Rel N/L*Muestra A*DM*temp	Húmedo (15)	0.65±2.41	0.23-2.64		
	Secas (16)	1.71±2.37	0.53-2.90		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.1664			
Rel N/L*Muestra A*DV*temp	Canícula (10)	0.8±1.78	0.20-1.98		
	Húmedo (3)	1.02±5.11	0.75-5.86		
	Secas (22)	0.54±0.83	0.21-1.04		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.2026			
Rel N/L*Muestra A*PO*temp	Húmedo (14)	0.45±1.31	0.13-1.44		
	Secas (31)	0.48±0.59	0.14-0.73		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.9609			
Rel N/L*Muestra A*DM*sexo	Hembra (17)	1.71±2.4	0.31-2.71		
	Macho (15)	1.02±2.55	0.22-2.77		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.7482			
Rel N/L*Muestra A*DV*sexo	Hembra (20)	0.77±2.28	0.22-2.50		
	Macho (15)	0.56±0.81	0.21-1.02		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.2052			
Rel N/L*Muestra A*PO*sexo	Hembra (20)	0.38±0.82	0.12-0.94		
	Macho (26)	0.5±0.71	0.15-0.86		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.5645			
Rel N/L*Muestra A*DM*edorepro	Con crías (5)	1.71±2.37	0.55-2.87		
	Sin crías (12)	1.32±2.23	0.28-2.51		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.5982			
Rel N/L*Muestra A*DV*edorepro	Con crías (11)	1.12±1.81	0.23-2.04		
	Sin crías (9)	0.68±1.19	0.2-1.39		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.5183			
Rel N/L*Muestra A*PO*edorepro	Con crías (12)	0.38±3.99	0.08-4.07		
	Sin crías (8)	0.38±1.1	0.21-1.31		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.5371			

Anexo 3. Análisis estadístico de la respuesta crónica (tiempo A) en la relación N/E por especie, sitio, edad, temporalidad, sexo y estado reproductivo. Con asterisco (\*) y en negritas valores significativos ( $p=0.5$ ).

Estadística no paramétrica. Prueba de Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney. Prueba post-hoc de Dunn					
Comparaciones	Variable (n)	Mediana $\pm$ RI*	Intervalo Q1-Q3	Dunn (Post-Hoc)	Valor p
Rel N/E*Muestra A*Especie	<i>D. marsupialis</i> (32)	5.25 $\pm$ 7.9	1.27-9.17		
	<i>D. virginiana</i> (36)	4.87 $\pm$ 6.46	1.85-8.31		
	<i>P. opossum</i> (46)	4 $\pm$ 8.23	1.05-9.28		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.3887			
Rel N/E*Muestra A*DM*Sitio	DACBIOL (4)	8.88 $\pm$ 11.87	5.42-17.29		
	LA FLORIDA (8)	1.71 $\pm$ 4.21	0.88-5.09		
	YUMKÁ (20)	6.33 $\pm$ 7.91	1.29-9.2		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.0782			
Rel N/E*Muestra A*DV*Sitio	DACBIOL (11)	5.25 $\pm$ 18.97	2.03-21		
	ZONA MILITAR (23)	4.5 $\pm$ 3.7	1.70-5.4		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.0869			
Rel N/E*Muestra A*PO*Sitio	DACBIOL (27)	2.5 $\pm$ 6.68	0.92-7.6		
	YUMKÁ (17)	5.36 $\pm$ 15.75	1.37-17.12		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.2			
Rel N/E*Muestra A*DM*Edad	Adulto (27)	6.42 $\pm$ 10.65	1.20-11.85		
	Juvenil (5)	3.33 $\pm$ 3.62	1.29-4.91		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.2315			
Rel N/E*Muestra A*DV*Edad	Adulto (22)	4.87 $\pm$ 6.46	1.85-8.31		
	Valor ( $p<0.5$ )				
Rel N/E*Muestra A*PO*Edad	Adulto (29)	2.75 $\pm$ 6.67	0.93-7.6		
	Juvenil (2)	5.33 $\pm$ 20.89	1.36-22.25		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.5295			
Rel N/E*Muestra A*DM*temp	Húmedo (15)	3.41 $\pm$ 6.40	1.19-7.59		
	Secas (16)	5.42 $\pm$ 14.69	1.31-16		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.305			
Rel N/E*Muestra A*DV*temp	Canícula (10)	5.39 $\pm$ 7.06	1.62-8.68	Húmedo-Canícula	<b>0.0437*</b>
	Húmedo (4)	41.5 $\pm$ 26	21.25-47.25	Secas-Canícula	1.000
	Secas (22)	4.45 $\pm$ 3.18	1.96-5.14	Secas-Húmedo	<b>0.0027*</b>
	Valor ( $p<0.5$ )	<b>0.0036*</b>			
Rel N/E*Muestra A*PO*temp	Húmedo (14)	5.36 $\pm$ 18.88	1.37-20.25		
	Secas (31)	2.47 $\pm$ 6	0.90-6.90		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.1305			
Rel N/E*Muestra A*DM*sexo	Hembra (17)	3.94 $\pm$ 7.1	1.04-8.11		
	Macho (15)	6.37 $\pm$ 13.14	1.73-14.87		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.1637			
Rel N/E*Muestra A*DV*sexo	Hembra (20)	4.28 $\pm$ 4.87	1.69-6.56		
	Macho (16)	5.05 $\pm$ 11.24	2.13-13.37		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.2263			
Rel N/E*Muestra A*PO*sexo	Hembra (20)	3.44 $\pm$ 10.20	0.95-11.12		
	Macho (26)	4 $\pm$ 7	1.08-8.08		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.8104			
Rel N/E*Muestra A*DM*edorepro	Con crías (5)	4.99 $\pm$ 5.93	1.71-7.64		
	Sin crías (12)	2.85 $\pm$ 7.77	0.94-8.71		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.716			
Rel N/E*Muestra A*DV*edorepro	Con crías (11)	2.71 $\pm$ 5.08	1.67-6.75		
	Sin crías (9)	4.5 $\pm$ 5.08	1.67-6.75		
	Valor ( $p<0.5$ )	0.5688			
Rel N/E*Muestra A*PO*edorepro	Con crías (12)	2.29 $\pm$ 8.25	0.75-9		
	Sin crías (8)	6.03 $\pm$ 10.26	1.24-11.5		
	Valores del modelo	0.3544			

Anexo 4. Análisis de la respuesta aguda (tiempo A, B y C) en la relación N/L (neutrófilo/linfocito), hematocrito (L/L) y eritrocitos nucleados (/100 leucocitos) por especie. Con asterisco (\*) y en negritas valores significativos ( $p=0.05$ ).

Estadística no paramétrica. Prueba de Friedman. Prueba post-hoc de Wilcoxon						
Modelo	Variable (n)	Mediana $\pm$ RI*	Intervalo Q1-Q3	Rango promedio	prob <0.5	Wilcoxon post-hoc
Rel N/L*DM*Tiempo ABC	A (27)	1.02 $\pm$ 2.46	0.27-2.73	1.37		A-B, $p=0.017^*$
	B (27)	3.11 $\pm$ 3.39	0.86-4.25	2.15		B-C, $p=0.442$
	C (27)	2.27 $\pm$ 3.96	0.93-4.89	2.48		A-C, $p=0.001^*$
	Valores del modelo					<b>0.000154*</b>
Rel N/L*DV*Tiempo ABC	A (33)	0.67 $\pm$ 0.91	0.22-1.13	1.67		A-B, $p=0.001^*$
	B (33)	0.94 $\pm$ 1.44	0.29-1.73	2.30		B-C, $p=0.288$
	C (33)	1.11 $\pm$ 1.41	0.27-1.68	2.03		A-C, $p=0.191$
	Valores del modelo					<b>0.035*</b>
Rel N/L*PO*Tiempo ABC	A (32)	0.48 $\pm$ 0.72	0.13-0.85	1.56		A-B, $p=0.008^*$
	B (32)	0.85 $\pm$ 1.22	0.17-1.39	2.00		B-C, $p=0.014^*$
	C (32)	1.13 $\pm$ 1.77	0.35-2.12	2.44		A-C, $p=0.003^*$
	Valores del modelo					<b>0.002*</b>
Hematocrito*DM*Tiempo ABC	A (28)	0.42 $\pm$ 0.09	0.37-0.46	2.64		A-B, $p=0.0003^*$
	B (28)	0.39 $\pm$ 0.1	0.33-0.43	1.55		B-C, $p=0.21$
	C (28)	0.38 $\pm$ 0.09	0.34-0.43	1.8		A-C, $p=0.001^*$
	Valores del modelo					<b>0.00005*</b>
Hematocrito*DV*Tiempo ABC	A (36)	0.41 $\pm$ 0.09	0.35-0.44	2.61		A-B, $p=0.000092^*$
	B (36)	0.39 $\pm$ 0.08	0.34-0.42	1.74		B-C, $p=0.669$
	C (36)	0.39 $\pm$ 0.1	0.33-0.43	1.65		A-C, $p=0.007^*$
	Valores del modelo					<b>0.000018*</b>
Hematocrito*PO*Tiempo ABC	A (32)	0.48 $\pm$ 0.09	0.41-0.5	2.97		A-B, $p=0.000000151$
	B (32)	0.42 $\pm$ 0.09	0.36-0.45	1.50		B-C, $p=0.884$
	C (32)	0.42 $\pm$ 0.13	0.34-0.47	1.53		A-C, $p=0.000004^*$
	Valores del modelo					<b>5.41E-11</b>
Eritrocitos nucleados*DM*Tiempo ABC	A (28)	8 $\pm$ 14.45	1.3-15.75	2.43		A-B, $p=0.034^*$
	B (28)	5 $\pm$ 11.75	1-12.75	1.84		B-C, $p=0.399$
	C (28)	5 $\pm$ 8	1-9	1.73		A-C, $p=0.011^*$
	Valores del modelo					<b>0.013*</b>
Eritrocitos nucleados*DV*Tiempo ABC	A (34)	2 $\pm$ 5.5	0-5.5	1.82		
	B (34)	2.5 $\pm$ 6	0-6	2.10		
	C (34)	2 $\pm$ 9.75	0-9.75	2.07		
	Valores del modelo					0.364
Eritrocitos nucleados*PO*Tiempo ABC	A (32)	4 $\pm$ 10	0-10	1.84		A-B, $p=0.016^*$
	B (32)	7 $\pm$ 11	1-12	2.34		B-C, $p=0.026^*$
	C (32)	5 $\pm$ 10	0-10	1.81		A-C, $p=0.828$
	Valores del modelo					<b>0.047*</b>

