



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE
CORTISOL FECAL EN LA NUTRIA DE RÍO
(*Lontra longicaudis annectens*. MAJOR,
1897), EN RÍO GRANDE, RESERVA DE LA
BIOSFERA TEHUACÁN-CUICATLÁN
OAXACA, MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ROSA BELEM MARTÍNEZ RAMÍREZ



DIRECTOR DE TESIS: FRANCISCO JAVIER BOTELLO LÓPEZ

AGOSTO DEL 2008



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.



**UNAM UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CORTISOL FECAL EN LA NUTRIA DE
RÍO (*Lontra longicaudis annectens*. MAJOR, 1897), EN RÍO GRANDE, RESERVA DE LA
BIOSFERA TEHUACÁN-CUICATLÁN OAXACA, MÉXICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

ROSA BELEM MARTÍNEZ RAMÍREZ

Director de tesis: M. en C. Francisco Javier Botello

AGOSTO 2008

DEDICATORIA

A MIS PADRES, EDUARDO MARTÍNEZ GONZALEZ Y ROSA RAMÍREZ
POR SU APOYO, CONFIANZA, POR DEJARME SER Y CREER EN
MI. GRACIAS.

A MIS HERMANAS MONICA, VERÓNICA, ALEJANDRA POR SU APOYO,
CONFIANZA, AMISTAD.

ARTURO ESPINOZA POR SU APOYO Y AMISTAD.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Sánchez Cordero por su confianza y apoyo económico para la Realización de este estudio.

Al M. en C. Francisco Javier Botello López, por su confianza, apoyo y paciencia.

A la Bióloga Leticia Espinoza por su amistad y ayuda.

A la Reserva de la Biosfera Tehuacán Cuicatlán por su apoyo financiero y las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Al Biol. Manuel Palma Martínez, a Maribel Ramírez, Ricardo Bolaños y al Regidor de ecología Antonio Hernández por hospitalidad, compañía y su amistad.

A los guías Gildardo, Hipólito, Félix, Esteban y Uri, por su compañía y apoyo.

Al Dr. Arturo Salame Méndez por su confianza, ayuda desinteresada, consejos, observaciones, apoyo económico, su amistad y por ser una parte muy importante para la realización de este proyecto así como por las facilidades otorgadas para trabajar en el laboratorio de endocrinología reproductiva, área de reproducción animal asistida. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

A Diana Duque por su apoyo, consejos, ayuda, su amistad, por nuestras aventuras y las noches en Cuicatlán.

A mis amigos por su apoyo, consejos, compañía: Diana, Fernando, Juan Carlos, Lulú, Mariana, Miguel, Néstor. A mis compañeros de la carrera: Ale, David, David Pérez, Fabián, Ju, Noé, Paty, Uriel.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	5
OBJETIVOS.....	7
HIPOTESIS.....	8
ÁREADE ESTUDIO.....	9
MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	26
RECOMENDACIONES.....	27
ANEXOS.....	28
REFERENCIAS.....	32

RESUMEN

Uno de los principales problemas que enfrenta el investigador al estudiar procesos endocrinos de la biología de mamíferos silvestres, es la obtención de muestras de orina y/o sangre, que implican serios problemas de manejo de los especímenes. Además estos procedimientos pueden intensificar el estrés en los individuos de estudio, dando por resultado una alteración en la concentración de hormonas esteroides (HE). Por lo antes mencionado, se han desarrollado técnicas no invasivas, es decir, metodologías que no provocan estrés en los individuos para la valoración de indicadores, del estado reproductivo a partir de la cuantificación de HE en heces y determinar el sexo del individuo, lo cual rara vez se puede conocer en vida libre. En este estudio se determinó el contenido de cortisol en heces de nutria neotropical en una porción del Río Grande, Oaxaca, se comparó el contenido de cortisol de heces obtenidas entre los meses de muestreo y localidades de muestreo. Se realizaron siete muestreos para recolectar heces de nutria neotropical. A las muestras se les aplicó una ETE (extracción total de esteroides) seguida de un análisis de EIA (Inmuno Ensayo Enzimático). Durante los siete meses de muestreo se recolectaron 57 heces de nutria. No se encontraron diferencias significativas entre las localidades de muestreo y entre los meses de muestreo. Al comparar los datos de Nutria neotropical de río (*Lontra longicaudis*) y Nutria neártica de río (*Lontra canadensis*) se encontraron diferencias significativas al analizarlos por medio de un análisis de Varianza de 1 factor (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$). Los niveles de cortisol encontrados son bajos lo cual podría indicar que no hay ninguna condición aguda o crónica que pudiera afectar negativamente su comportamiento, reproducción o sobrevivencia, indicando una población saludable.



INTRODUCCIÓN

La nutria neotropical de río (*Lontra longicaudis*) pertenece al Orden Carnívora y a la Familia Mustelidae, tiene una amplia distribución desde el noreste de México hasta el sur de Uruguay, Paraguay y a lo largo de la porción norte de Argentina (Lariviere, 1999). En México, se distribuyen tres especies de nutria: la nutria marina, *Enhydra lutris*; la nutria neártica de río, *Lontra canadensis*, y la nutria neotropical de río, *Lontra longicaudis*, la cual es la más común en el país (Gallo, 1997; Lariviere, 1999).

Lontra longicaudis se alimenta principalmente de peces, crustáceos y moluscos, y son consumidores oportunistas de pequeños mamíferos, aves, reptiles e insectos (Lariviere, 1999). Se distribuye desde Chihuahua por una estrecha franja hasta el centro del país, en donde su distribución se amplía de costa a costa (Patterson *et al.*, 2005). Se encuentran principalmente en ríos de los planos costeros y en los ríos permanentes de la Sierra Madre Occidental (Villa y Cervantes 2003). Habita desde los 300 a los 1500 msnm, pero en México ha sido registrada hasta los 2000 msnm (Santos-Moreno *et al.*, 2003); siendo la mayor altitud registrada a los 3000 msnm (Lariviere, 1999; Soler, 2002). En Oaxaca ha sido registrada en el istmo de Tehuantepec, Costa, Sierra Mixteca y Sierra Madre de Oaxaca (Gallo, 1997; Santos-Moreno *et al.*, 2003); y recientemente en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, Oaxaca (Botello *et al.*, 2006).

La nutria neotropical es versátil y tolera modificaciones ambientales, ocupando áreas cercanas a zonas de actividad humana, sin embargo, las mayores densidades ocurren en áreas extensas de redes acuáticas con baja contaminación química y orgánica, y baja densidad humana (Lariviere, 1999). Por lo anterior esta especie de nutria podría ser una especie de relevancia en programas de conservación que al ser estudiada de manera integral podría ser un muy buen indicador de la conservación de este tipo de ecosistemas. Sin embargo, las estrategias de conservación de una especie en particular, requieren de manera imperante del apoyo de datos fisiológicos. Información obtenida, en una primera instancia, mediante muestras de sangre, orina, saliva y heces; resultados que coadyuvan al conocimiento de las especies en estudio y al establecimiento de valores de



referencia de indicadores moleculares que pueden ser empleados tanto en vida libre como en cautiverio para evaluar, por ejemplo, el estado de salud de una población. Este enfoque puede repercutir en el establecimiento de programas para la conservación de la especie (Brousset *et al.*, 2005).

De lo antes mencionado, en especies silvestres en vida libre o en cautiverio se han utilizado como indicadores moleculares de procesos biológicos la condición reproductiva y el estado de estrés a las hormonas esteroides. En general las hormonas son compuestos biorreguladores los cuales varían ampliamente. Por ejemplo, las hormonas esteroides son esenciales para mantener la existencia de los vertebrados debido a que regulan gran variedad de procesos en el organismo incluyendo el metabolismo y las pautas de conducta. Entre las hormonas esteroides se encuentran los adrenocorticoides, los cuales se dividen en mineralocorticoides y glucocorticoides. Dentro de los glucocorticoides, el cortisol es uno de los principales reguladores en los mamíferos del metabolismo de carbohidratos, así como ser un indicador del nivel de estrés (Brousset *et al.*, 2005).

Aunque no existe una definición precisa, generalmente el estrés se refiere a una variedad de respuestas frente a estímulos (estresores) internos y externos, que modifican la homeostasis de un individuo. Los estímulos pueden ser físicos, fisiológicos y conductuales (Brousset *et al.*, 2005).

Uno de los principales problemas que enfrenta el investigador al estudiar procesos endocrinos de la biología de mamíferos silvestres, es la obtención de muestras de sangre, orina y/o la realización de frotis vaginales en las hembras, que implican serios problemas de manejo de los especímenes (Soto *et al.*, 2004). Además estos procedimientos pueden intensificar el estrés en los individuos de estudio, dando por resultado una alteración en la concentración de hormonas esteroides (HE) (Soto *et al.*, 2004). Por lo antes mencionado, se han desarrollado técnicas no invasivas, es decir, metodologías que no provocan estrés en los individuos para la valoración de indicadores, por ejemplo, del estado reproductivo a partir de la cuantificación de HE en heces.



Otra información que se puede obtener de la valoración de HE en las heces es determinar el sexo del individuo, lo cual rara vez se puede conocer en vida libre (Soto *et al.*, 2004).



ANTECEDENTES

(Ayala-Cano 2000) y (Soto *et al.*, 2004) a partir de la valoración diferencial de testosterona y estradiol en heces, pudieron determinar el sexo de los individuos en estudio, borrego cimarrón (*Ovis canadensis cremnobates*) y lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*), respectivamente. Además de correlacionar el contenido de HE con eventos reproductivos de manera espacio-temporal.

El valorar el contenido de cortisol en heces, ha permitido dilucidar el estrés que pueden presentar especies de mamíferos silvestres tanto en cautiverio como en vida libre. Por ejemplo, (Carranza-Castro 2007) al cuantificarlo en heces de chimpancé (*Pan troglodytes*) constató que en los individuos en cautiverio los valores de cortisol fueron altos con respecto a los reportados en esta y otras especies de mamíferos en condiciones similares, resultado que podría explicar una de las razones por las cuales estos chimpancés no se reproducen en el zoológico de Zacango, Edo. de México. Así mismo (Palacios-Martínez 2007) al valorar el contenido de HE en el puma (*Puma concolor*) no encontró diferencias significativas en las concentraciones hormonales evaluadas en cautiverio y vida libre.

Por su parte, (Ayala-Cano 2003) al determinar el contenido de cortisol en heces pudo correlacionarlo con el estrés fisiológico durante la dinámica reproductiva del borrego cimarrón (*Ovis canadensis cremnobates*) en la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México (Ayala-Cano 2003), y (Pérez-García 2005) al valorarlo en heces de dos subespecies de cimarrón (*Ovis canadensis cremnobates* y *O. c. weemsi*) le permitió evaluar el nivel de estrés que presentan ambas en condiciones de manejo extensivo en UMAS de Baja California y Sonora, estos resultados permitieron determinar las variables con más efecto estresor en las poblaciones y a partir de estas dar recomendaciones a los propietarios de las UMAS para el mejor manejo y aprovechamiento del cimarrón. En este sentido (Martínez-Romero 2004) al valorar HE en heces de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y al correlacionarlo con su conducta, pudo determinar con un enfoque endocrino las fechas de aprovechamiento de la especie.



Rothschild 2004) en la nutria neartica de río (*Lontra canadensis*) realizó un estudio siguiendo dos objetivos principales: i) verificar la eficacia del uso de glucocorticoides fecales como método para evaluar los niveles de estrés en nutria de río; ii) el valorar la eficacia del proyecto de reintroducción de nutria de río en Pennsylvania, minimizando y reduciendo los niveles de estrés de la nutria de río en el tiempo de cautiverio. Concluyendo que el uso de glucocorticoides fecales es un método efectivo para determinar los niveles de estrés en nutria de río.



OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el contenido de cortisol en heces de la nutria neotropical (*Lontra longicaudis*) en río Grande, Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, Oaxaca.

Objetivos Particulares

- ✦ Determinar el contenido de cortisol en heces de nutria neotropical en una porción del Río Grande, Oaxaca.
- ✦ Comparar el contenido de cortisol de heces obtenidas entre los meses de muestreo.
- ✦ Comparar el contenido de cortisol de heces obtenidas entre las localidades de muestreo.



Hipótesis

El contenido de cortisol en heces de mamíferos puede variar dependiendo de varios factores como la especie de que se trata, la época del año y condición temporal por lo que se espera encontrar que el contenido en heces de nutria neotropical en vida libre será significativamente diferente entre los meses de muestreo y las localidades de muestreo, así como entre zonas monitoreadas a lo largo de 39.5 Km de Río Grande Oaxaca.



ÁREA DE ESTUDIO

La Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán forma parte de la Sierra Madre del Sur y ocupa la zona noroccidental de la sub provincia de la Meseta de Oaxaca. Se localiza en el extremo sudeste del estado de Puebla y nordeste del estado de Oaxaca entre las latitudes $17^{\circ}39' - 18^{\circ}53' N$ y longitudes $96^{\circ}55' - 97^{\circ}44' W$. Su extensión territorial es de 490,187 ha con una altitud que varía de los 600 a los 2,950 msnm (Figura 1). La temperatura media anual en el Valle de Tehuacán oscila de $18^{\circ}C$ a $22^{\circ}C$. El clima árido es controlado en gran parte por la Sierra de Zongolica que se encuentra entre el valle y el Golfo de México ya que los vientos húmedos y las nubes cargadas de agua son interceptados por las montañas. El promedio anual de precipitación en la región del valle varía de 250 a 500 mm de mayo a octubre siendo mayor entre junio y septiembre (Duque-Dávila, 2007).

A

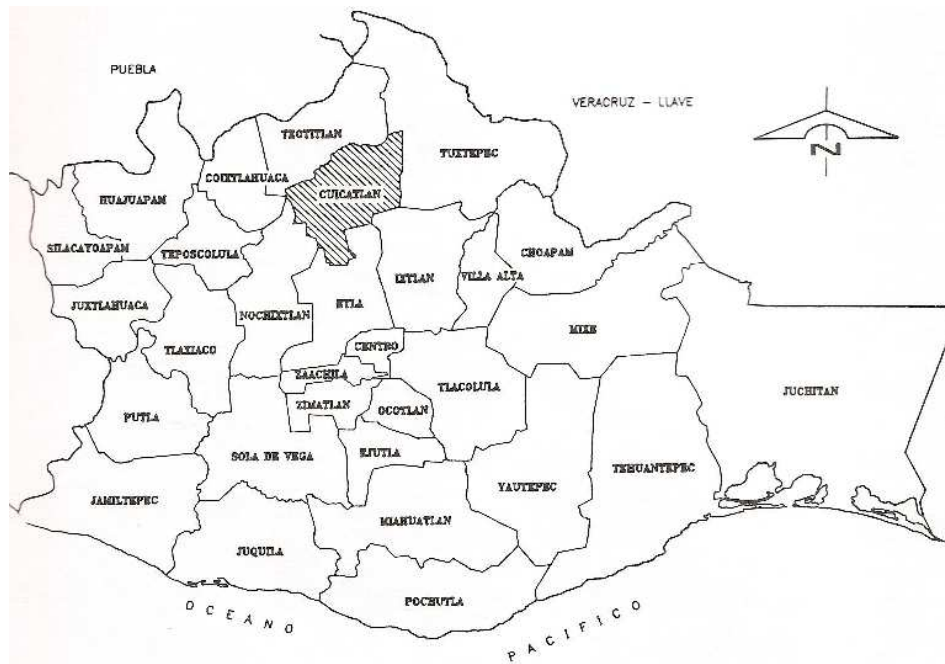


Fig. 1. Localización del distrito de Cuicatlán (A; San Juan Bautista Cuicatlán 1993).



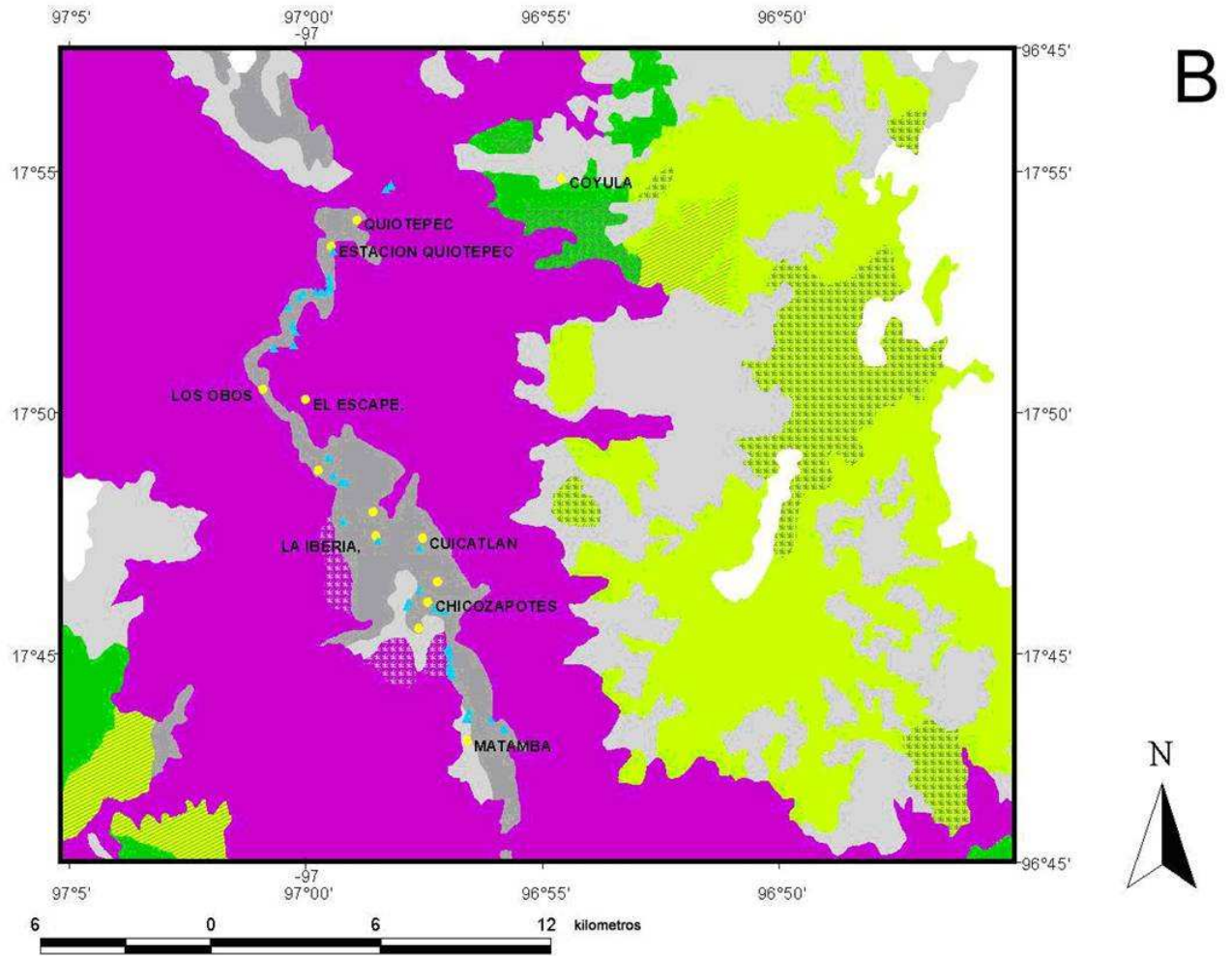


Fig. 2 Localización de Río Grande y ubicación de las localidades donde se recolectaron las muestras de heces (B, Duque-Dávila; 2007)



Topografía

El valle de Tehuacán-Cuicatlán surge en la altiplanicie del Eje Neovolcánico a una altura aproximada de 2060 msnm. El valle es una depresión orientada de nor-noroeste a sureste y tiene su parte más alta cerca de los 2000 msnm. Limitado por elevaciones montañosas de más de 2500 msnm. La depresión desciende hacia el sur y gradualmente se ensancha hasta 10 Km en la población de Tehuacán, a una altura de 1600 msnm, donde se unen las corrientes provenientes del noroeste y sureste (Ochoa, 2001).

Hidrología

Cuicatlán pertenece a la región hidrológica del Papaloapan, cuenca del Río Papaloapan y subcuenca del Río Quiotepec. Su principal corriente hidrológica es el Río Grande, el cual recorre la zona en dirección sureste-noreste, se une al río Salado a la altura de Santiago Quiotepec para formar el río Santo Domingo y desemboca en el Golfo de México.

El Río Grande es la formación hidrológica que recorre mayor distancia en la Cañada Oaxaqueña y es alimentado por varios afluentes, Río la Venta, Río las Vueltas, Río Tomellin, Río Apoala, Río Sabino (Reyes *et al.*, 2004).

Clima

El valle de Tehuacán-Cuicatlán presenta los subgrupos climáticos de los áridos: el semiárido (BS₁), ocupa el segundo lugar en extensión en el valle se encuentra entre los 1000 y los 2000 msnm (Ochoa, 2001). Cubre parte de los valles de Tehuacán, Zapotitlán y Cuicatlán. La precipitación es originada por los vientos alisios, ondas del este, ciclones tropicales y las invasiones de aire polar. La mayoría de la lluvia se presenta durante una estación que normalmente inicia a principios de mayo, aumentando en junio, disminuye hacia julio y agosto: puede ocurrir nuevamente en el mes de septiembre. El régimen de lluvias es de verano, el cual presenta el fenómeno de sequía intraestival, el porcentaje de precipitación invernal en la mayor parte del valle es menor a 5 %, en el extremo norte aumenta a valores de 5 y 10.2 % (Ochoa, 2001).



Vegetación

La Región de Cuicatlán, pertenece a la provincia florística Tehuacán- Cuicatlán con elementos vegetales distintivos y únicos (Rzedowski, 1978).

Vegetación acuática y subacuática: Tular está representada por comunidades de plantas acuáticas, cuyos componentes principales son monocotiledóneas de no mas de 30 m de alto que representan hojas angostas o bien carente de órganos foliares, estas plantas están arraigadas en cuerpos de agua poco profundos, de corrientes lentas o estacionarias: en la región de Cuicatlán esta bien representada en la ribera del Río Grande y sobre áreas anegadas continuas cercanas a este como la presa “Matanba” en San José el Chilar y en las pozas de la localidad de la Iberia entre otras. Las especies predominantes son *Typha domingensis* *Cyperus spp* y *Xanthoxoma robustum* (Reyes et al., 2004).

Matorral Xerófilo: Generalmente se compone de arbustos y plantas suculentas, muchas de ellas endémicas. En la región de Cuicatlán el matorral xerófilo esta compuesto principalmente por cactáceas columnares, plantas rosetófilas, arbustos espinosos y algunas cactáceas globosas; se desarrolla sobre suelos calizos. Se le puede encontrar en las partes bajas cerca del río Grande en Guadalupe los Obos, San Juan Bautista Cuicatlán y San José El Chilar. Las especies dominantes del matorral xerófilo son “cardoneras” con poblaciones abundantes de *Neobuxbaumia tetetzo* (tetecho) y *Escontria chiotilla* (chonosle), acompañada de *Stenocereus pruinosus* (tuna o pitayo), *Hechita sphaeroblata* (lechuguilla) (Reyes et al., 2006).



MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección de muestras:

El río se dividió en cuatro zonas de aproximadamente 8 km cada una, partiendo de la localidad “Quiotepec” hasta “El chilar” (Fig.2). Se realizaron siete muestreos para recolectar heces de nutria neotropical siguiendo el método de transecto libre, el cual consiste en recorrer las orillas del río en busca de rastros de la especie (Gallo, 1989; Simon, 2003).

Almacenamiento y conservación de las muestras:

Las muestras recolectadas fueron las más frescas (Soto *et al.*, 2004), estas se identificaron *in situ* con la ayuda de un manual de huellas y rastros (Aranda, 2000). Se colocó una porción de cada una de ellas (de 5 cm aproximadamente) dentro de un frasco de plástico con etanol al 70 % para que la muestra no se contaminara, el cual se etiquetó con la fecha, localidad y número de muestra. Cada frasco se almacenó en un lugar fresco hasta el procesamiento de las muestras.

Extracción total de esteroides (ETE)

Cuantificación de las hormonas esteroides. El método se dividió en dos procedimientos; extracción de esteroides totales y cuantificación de cortisol. (Soto *et al.*, 2004. Anexo I

Extracción Total de Esteroides (ETE). (Soto *et al.*, 2004)

1. Se tomó una muestra de heces colocándola en un tubo cónico con tapa esmerilada y se pesó.
2. Se agregó 3 ml de agua destilada.
3. A cada tubo cónico con la muestra y agua se le agregó aproximadamente 2 ml de éter etílico y se agitó en vórtex durante unos 15 segundos. Después se colocaron en una centrífuga clínica durante 10-20 segundos a 3000 rpm a temperatura ambiente.
4. Separada del agua la fase orgánica, la cual contiene el extracto total de esteroides (ETE), se transfirió a un tubo cónico.



Agregándole nuevamente al tubo con la muestra de heces y agua otros 2 ml de éter etílico para realizar una segunda extracción de ETE.

5. El tubo cónico conteniendo las fases orgánicas del ETE se colocó en un baño de María a una temperatura de 30-35°C hasta evaporarse el éter.
6. Una vez evaporado el disolvente orgánico, se le agregó a cada tubo aproximadamente 100 µL (por duplicado) de éter con una pipeta Pasteur, transfiriéndose a un tubo Eppendorf el cual se evaporó en baño de María.

Principio del análisis para cortisol con EIA.

El procedimiento sigue el principio básico de enzoinmunoensayo que consiste en la competencia entre un antígeno sin marcar y otro marcado con enzimas unidas a los lugares de unión de los anticuerpos. La cantidad de antígeno marcado con enzima que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito no marcado presente. El material que no se haya unido se elimina mediante decantación y lavado de pocillos (Carranza-Castro 2007).

Cuantificación.

La cuantificación de los esteroides se llevó a cabo por medio de un Inmuno Ensayo Enzimático (EIA), siguiendo las especificaciones del fabricante de los kits para cortisol. Soto *et al.*, 2004). Anexo I

Procesamiento de datos.

Los resultados obtenidos sobre la concentración de cortisol en heces se agruparon por meses de muestreo y localidad de muestreo. Se analizaron por medio de un análisis de varianza de un factor (ANOVA) según lo propuesto por (Zar 1999) y (Daniel 2004). Se utilizó una prueba de comparación múltiple de Tukey para saber si existían diferencias significativas. Se realizó una búsqueda bibliográfica de trabajos publicados referentes a la especie *Lontra longicaudis* y cortisol encontrando solo una publicación sobre el género *Lontra*, realizado por (Rothschild, 2004), en el que trabajó con glucocorticoides fecales como una técnica no invasiva para medir el estrés en nutria neártica de río (*Lontra canadensis*) en Pennsylvania.



Para comparar las concentraciones de cortisol fecal obtenidas en heces de organismos en cautiverio y en heces de organismos en vida libre se agruparon los datos obtenidos en tres grupos y se les aplicó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de Tukey para saber si existían diferencias significativas. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 12.0 para Windows.



RESULTADOS

Durante los siete meses de muestreo se recolectaron un total de 57 heces de nutria en las 4 localidades de muestreo; para la localidad de Quiotepec/Obos 23 heces, Obos/Cuicatlán 18 heces, Cuicatlán/Chico 5 heces y Chico/Chilar 11 heces. (Tabla 1).

Tabla 1. Número de heces de *Lontra longicaudis* analizadas para determinar la concentración de cortisol. En las columnas se encuentran las localidades y en los renglones el mes de colecta.

LOCALIDADES DE MUESTREO

Fecha	Quiotepec/ Obos	Obos / Cuicatlán	Cuicatlán / Chico	Chico / Chilar
Octubre 2005	7	2		
Enero 2006	11	9	3	1
Febrero 2006	1	6	1	4
Marzo 2006	1			5
Mayo 2006	2			
Junio 2006	1			
Agosto 2006		1	1	1
TOTAL	23	18	5	11



Contenido de cortisol en heces por localidad de muestreo

El contenido de cortisol más alto se registró en la localidad de Quiotepec /Obos con 0.0478 $\mu\text{g}/\text{gr}$ seguida de la localidad Obos /Cuicatlán con 0.0359 $\mu\text{g}/\text{gr}$, Cuicatlán/ Chico con 0.0283 $\mu\text{g}/\text{gr}$ y Chico / Chilar con 0.0312 $\mu\text{g}/\text{gr}$ (Fig. 3). No se encontraron diferencias significativas al comparar las cuatro localidades mediante el análisis de varianza de 1 un factor (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% ($p > 0.05$).

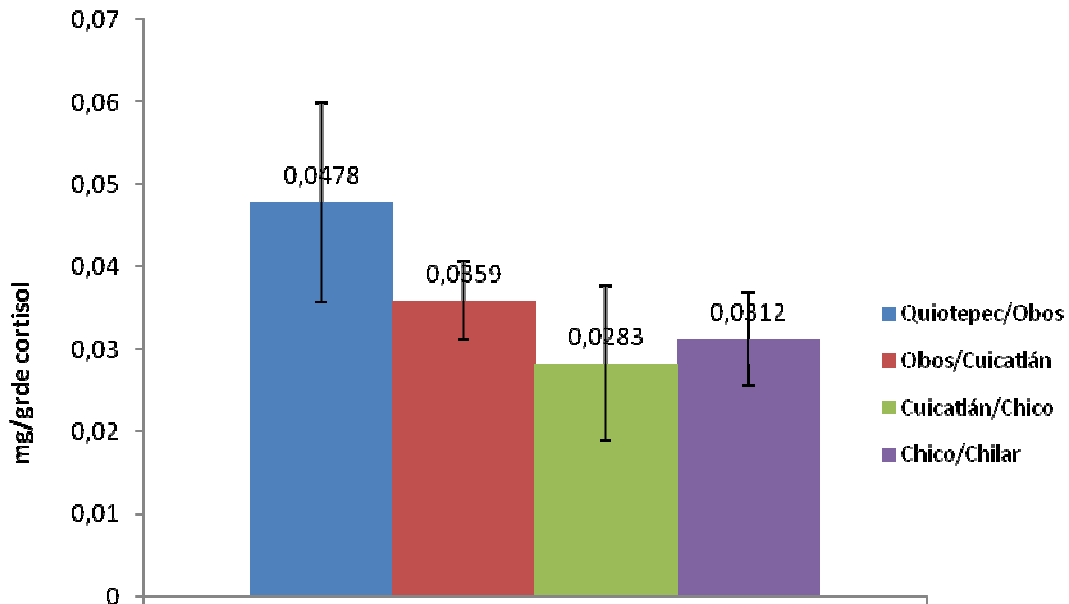


Fig.3 Concentración de cortisol por localidades de muestreo. Se muestra la media y el error estándar.



Contenido de cortisol mensual

El contenido de cortisol más elevado que se registró en las muestras fue en el mes de enero 0.0495 µg/gr, seguido por el mes octubre, 0.0428 µg/gr. En el mes de febrero se registró un nivel de 0.0311 µg/gr, decreciendo en los meses de marzo y mayo hasta 0.0120 µg/gr y teniendo un incremento a 0.0203 µg/gr en el mes de agosto no encontrando diferencias significativas mediante el análisis de varianza de 1 factor (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% (.541 $p > 0.05$) entre los seis meses de muestreo. (Fig. 4)



Tabla 2. Contenido de cortisol por localidades de muestreo y meses de muestreo

LOCALIDADES DE MUESTREO	Meses de muestreo / niveles de cortisol µg/gr						
	Octubre 2005	Enero 2006	Febrero 2006	Marzo 2006	Mayo 2006	Junio 2006	Agosto 2006
Quiotepec/ Obos	0.0833	0.0100	0.0120	0.0384	0.0123	0.0312	
	0.0424	0.2785			0.0117		
	0.0280	0.0120					
	0.0182	0.0185					
	0.0109	0.0344					
	0.0737	0.0840					
	0.0322	0.0110					
		0.0344					
		0.1141					
		0.0384					
		0.0700					
Obos/ Cuicatlán	0.0230	0.0176	0.0214				0.0272
	0.0739	0.0776	0.0440				
		0.0414	0.0125				
		0.0394	0.0277				
		0.0136	0.0714				
		0.0467	0.0153				
		0.0393					
		0.0281					
Cuicatlán/ Chico		0.0005	0.0434				0.0117
		0.0379					
		0.0484					
Chico/ Chilar		0.0666	0.0175	0.0125			
			0.0214	0.0526			
			0.0482	0.0210			
			0.0384	0.0050			
			0.0388			0.0218	



Contenido de cortisol en heces en los meses de muestreo

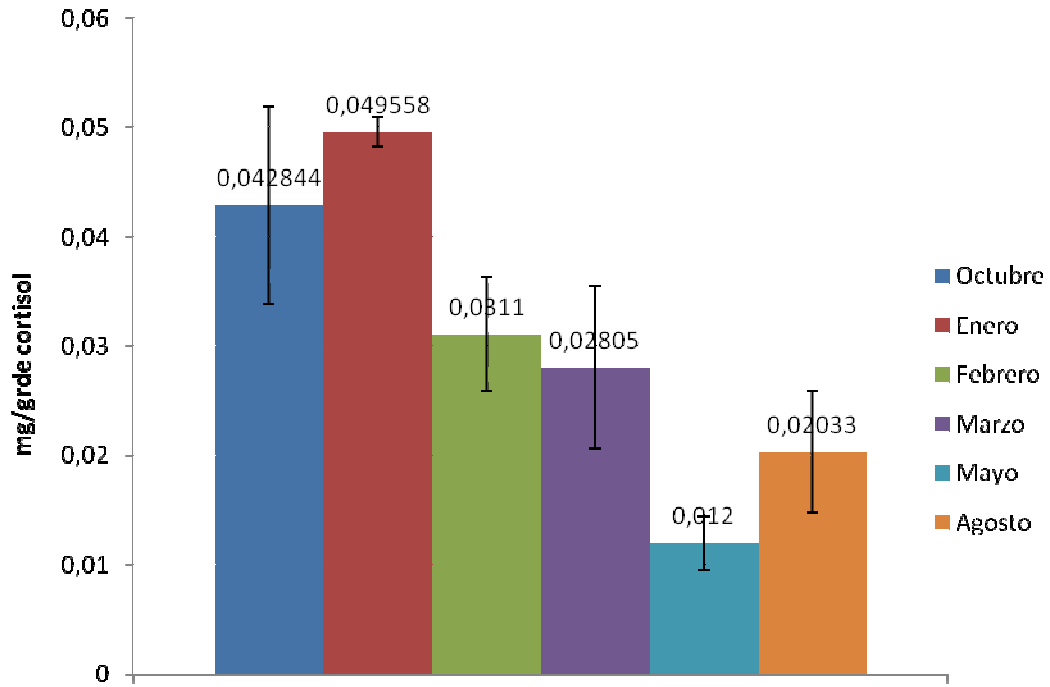


Fig.4 Contenido de cortisol en los meses de muestreo. Se muestra la media y el error estándar



Comparación de Nutria neotropical de río (*Lontra longicaudis*) y Nutria neártica de río (*Lontra canadensis*)

A pesar de no haber encontrado publicaciones que reporten contenido de cortisol en heces de *Lontra longicaudis*, se realizó la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los resultados reportados por (Rothschild 2004) para *Lontra canadensis* con el conocimiento previo de que ambas especies pueden variar significativamente debido a condiciones inherentes a las especies y no debido a variables ambientales.

(Rothschild 2004) reporta los contenidos de cortisol para dos grupos de nutrias, utilizando para su estudio 154 heces de nutria de las cuales 117 pertenecen a el primer grupo compuesto por ocho individuos (dos machos jóvenes, cuatro machos adultos, una hembra adulto y una hembra joven) provenientes de Nueva York compradas a tramperos para un proyecto de reintroducción y 37 heces para el segundo grupo compuesto por tres individuos (dos adultos machos y un macho adulto joven) proveniente de Maryland capturados para este estudio. Las heces fueron obtenidas diariamente desde el primer día que estuvieron en cautiverio durante los primeros 14 días, después del los 14 días de cautiverio las heces fueron obtenidas cada tercer día. Los datos de contenido de cortisol son más elevados que los obtenidos en el presente estudio y las diferencias fueron significativas al analizarlas por medio de un análisis de Varianza de un 1 factor (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% (.000 $p < 0.05$; Fig. 5).



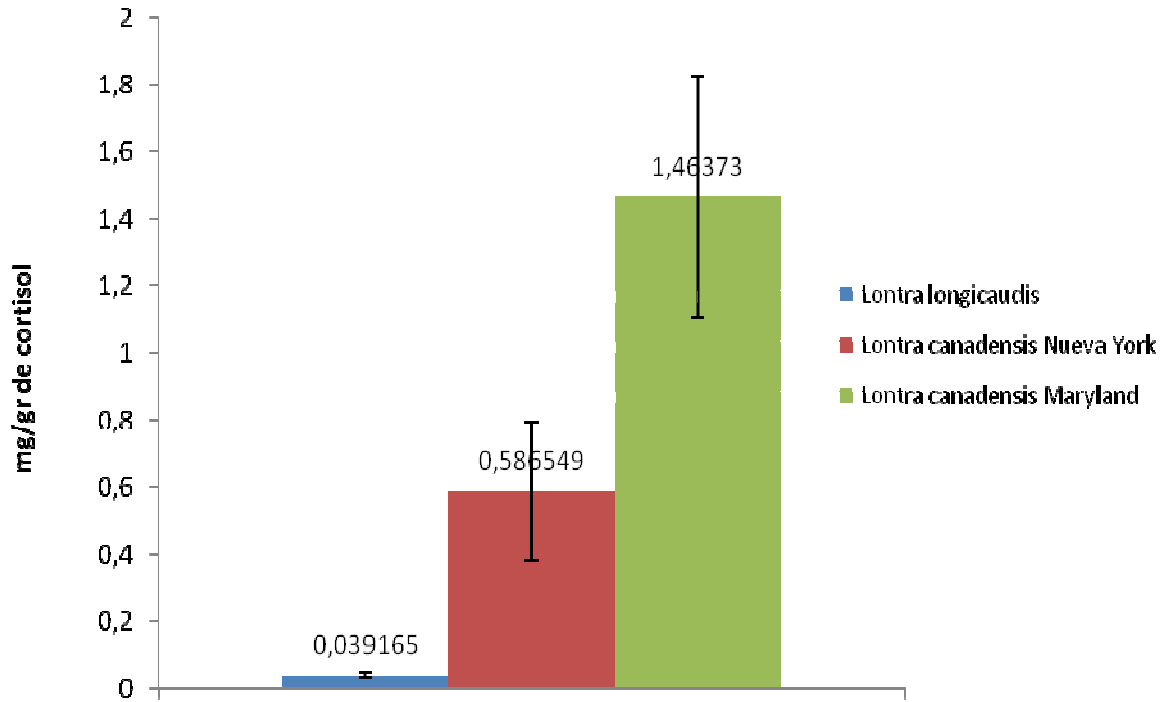


Fig.5 Comparación del contenido de cortisol entre *Lontra longicaudis* de vida libre y *Lontra canadensis* en cautiverio. Se muestra la media y el error estándar.



DISCUSIÓN

La evaluación de glucocorticoides a partir de muestras obtenidas en forma no invasiva, ha abierto la posibilidad de llevar estas determinaciones en especies de mamíferos silvestres, lo que ha facilitado los estudios sobre estrés y el impacto de diferentes estímulos.

Las diferencias del contenido de cortisol encontradas en las muestras analizadas no fueron significativas comparando estaciones o meses de muestreo. Y los niveles encontrados no sugieren la presencia de ninguna condición aguda o crónica que pudiera afectar negativamente su comportamiento, reproducción o sobrevivencia, lo cual podría indicar una población saludable.

Los meses que presentaron los niveles mas altos de cortisol fueron octubre y enero.

Los glucocorticoides participan en una infinidad de funciones del organismo no solo como respuesta al estrés; una gran diversidad de estímulos desencadenan la activación del eje hipotálamo -hipófisis- corteza adrenal y la respuesta puede variar entre individuos y también en un mismo individuo de acuerdo con la época del año, etapa reproductiva, condición temporal e incluso experiencia y habituación (Brousset *et al.*, 2005). Durante el mes de octubre, el Río Grande se desbordó como consecuencia del paso del huracán Stan por los estados de Veracruz y Oaxaca, lo que pudo destruir sus refugios, zonas de juegos, rascaderas y sitios de captura de alimento, obligándolas a desplazarse superponiendo territorios, por lo que niveles elevados de estrés podrían estar relacionados a los niveles elevados de cortisol en las muestras analizadas.

Por otro lado, los datos de elevada concentración de cortisol durante el mes de enero podrían estar relacionados con el nacimiento de las crías en la zona, puesto que según la bibliografía (Lariviere, 1999, Aranda, 2000) en México las crías nacen entre enero y marzo. Durante los meses de Febrero, Marzo, Mayo, Junio, Agosto los niveles de cortisol registrados fueron más bajos que durante los meses de Octubre y Enero.



Si la suposición anterior es cierta, los elevados niveles de cortisol encontrados en la localidad de “Quiotepec” podrían estar indicándonos que esta localidad, es una de las más conservadas en cuanto al flujo de agua y a las riberas del río se refiere, ya que es utilizada como una zona de crianza de la nutria. Sin embargo, otra localidad en donde las muestras tenían elevado contenido de cortisol es “Los Obos”, en donde la población humana y los cultivos están muy cercanos al margen del río y existe extracción de grava de las orillas del río. Por lo anterior, es importante utilizar otros métodos con los que podamos discernir entre estrés y etapa reproductiva, con lo que se podrán definir zonas prioritarias de conservación y o restauración.

El cortisol es uno de los principales glucocorticoides, así como indicador del grado de estrés. Este ha sido reportado en mustélidos del género *Lontra*, especie *L. canadensis*, en donde reportan que el uso de glucocorticoides fecales es un método efectivo para determinar los niveles de estrés en nutria neártica de río neártica en Pennsylvania.

Las nutrias de este estudio no tuvieron ningún tipo de manejo que pudiera dar por resultado una alteración en la concentración de contenido de cortisol, como en el caso que las nutrias del trabajo consultado ya que aunque eran silvestres se les capturó y estuvieron en cautiverio para después ser reintroducidas, todo esto pudo haber provocado que presentaran un grado de estrés crónico y por lo tanto sus niveles de cortisol fueron elevados. Los dos grupos de nutria analizados por (Rothschild 2004) los cuales presentaron diferencias significativas en el contenido de cortisol en heces. Las nutrias de Maryland presentaron los niveles más elevados de cortisol Mientras tanto el contenido de cortisol de nutria neotropical de río *Lontra longicaudis* (este trabajo) es el más bajo de los tres grupos.

Otro factor fundamental que no se menciona en el trabajo anteriormente citado, así como que en este estudio no se menciona si el lugar donde se capturaron mostraba algún grado de perturbación que implicara algún grado de estrés y por lo tanto dar como resultado los niveles de cortisol tan elevados; como se menciona anteriormente los glucocorticoides participan en una infinidad de funciones del organismo no solo como



respuesta al estrés y la respuesta puede variar entre individuos y también en un mismo individuo de acuerdo con la época del año, etapa reproductiva, condición temporal e incluso experiencia y habituación (Brousset *et al.*, 2005).

El presente, es el primer trabajo desarrollado sobre el posible estrés de la nutria neotropical de río (*Lontra longicaudis*) en vida libre en México y se enfatiza su importancia como base para integrar los parámetros fisiológicos, reproductivos y biológicos de la población, como herramientas que coadyuven en la conservación de la nutria de río.



CONCLUSIONES

- ✦ Se determinó el contenido de cortisol en heces de nutría neotropical (*Lontra longicaudis*) en río Grande.
- ✦ No se encontraron diferencias significativas del contenido de cortisol a nivel temporal y espacial.
- ✦ Los niveles de cortisol encontrados son bajos en comparación con la especie *Lontra canadensis*.



Recomendaciones generales

- ✦ Es importante que se continúe con el estudio de las poblaciones de nutria neotropical de río en Río grande Cuicatlán, durante todo el año, estación lluvias secas y localidades.
- ✦ Establecer un proyecto de seguimiento permanente en aquellas áreas con mas probabilidad de que la población pueda se afectada.
- ✦ Enfatizar y continuar los estudios espacio/ temporales de la nutria de río en río grande Cuicatlán, ya que ello ayudara a establecer con mayor precisión la utilización del hábitat con los eventos sociales (conducta) y biológicos (fisiológicos) que tienen estos organismos.
- ✦ Por último, pero no menos importante, es el de aprovechar cualquier oportunidad para generar y ampliar la escasa información sobre la dinámica y biología en las poblaciones de nutria.



ANEXO 1

Lectura con EIA

Preparación de reactivos:

- A. Solución de lavado: vierta 60ml de concentrado de lavado en un recipiente limpio y diluye añadiendo hasta 1500ml de agua desionizada (25x). La solución de lavado es estable durante 1 mes a temperatura ambiente (25° C).

- B. Solución de conjugado de enzima: el concentrado de conjugado de enzima debe diluirse, en la porción de una parte de concentrado de conjugado en enzima en 50 partes del diluyente del conjugado. Pocillos de microtitulación: seleccionar el número de pocillos recubiertos de anticuerpo que se necesiten para el ensayo.

(Los reactivos y muestras deberán de alcanzar una temperatura ambiente 25°C aproximadamente)

1. Marcar las tiras de microtitulación que se vayan a utilizar.

2. Pipetear 50 µl de cada estándar, control y muestra problema en los pocillos correspondientes.

3. Preparar la solución de conjugado de enzima diluyendo el concentrado de enzima en el diluyente.

4. Añadir 100µl de solución de conjugado de enzima a cada pocillo empleando un dispensador semiautomático.



5. Añadir 100 μ l de antisuero frente a cortisol a cada pocillo empleando un dispensador semiautomático.
6. Incubar los pocillos, agitando a alta velocidad (5000 – 700 rpm) en un agitador orbital de microplacas, durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Aspirar y lavar cada pocillo cinco veces con la solución de lavado, empleando un lavador automático de microplacas. Secar invirtiendo la placa sobre el material absorbente.
8. Añadir 100 μ de solución de cromógeno TMB a cada pocillo empleando un dispensador semiautomático.
9. Incubar los pocillos, agitando a alta velocidad (500 – 700 rpm) en un agitador orbital de microplacas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Añadir 100 μ de solución de parada (Ácido sulfúrico 0.2 M) a cada pocillo empleando un dispensador semiautomático.
11. Leer la absorbancia de la solución en los pocillos al cabo de 30 minutos, utilizando un lector de microplacas programado a 450 nm.

Nota: los pasos de la técnica varían de acuerdo a la hormona esteroide a cuantificar.



ANEXO I

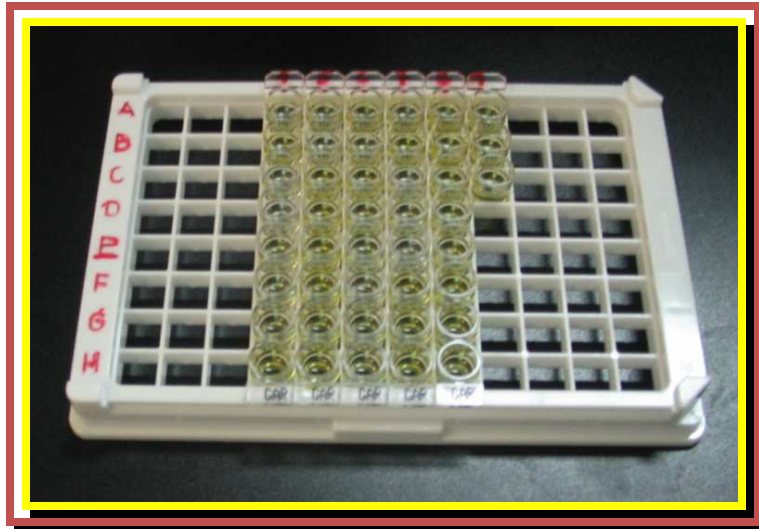


Heces de nutria neotropical de río (*Lontra longicaudis*)

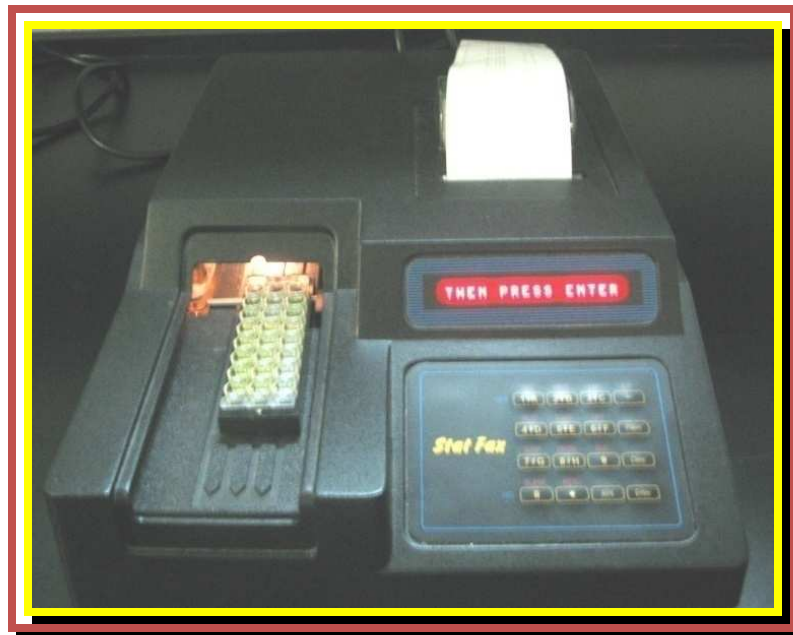


Extracción total de hormonas esteroides





Pocillos con muestras de hormonas esteroides



Lector de microplacas



Referencias bibliográficas

Aranda-Marcelo. 2000. Huellas y rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. CONABIO. Instituto de Ecología A, C., Xalapa, México. 75 – 77 pp.

Ayala-Cano, S. G. 2000. Desarrollo de una metodología para determinar los niveles de hormonas esteroides (P4, T, E2) en excretas de la población de borrego cimarrón (*Ovis canadiensis cremnobates*) en la Sierra de San Pedro Mártir, Baja, California, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. 69 pp.

Ayala-Cano, S. G. 2003. Estrés fisiológico relacionado con la dinámica reproductiva del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis cremnobates*) en la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México. 159 pp.

Botello F, Salazar J.M, Illoldi-Ranger P, Linaje M, Duque D, Sánchez-Cordero V. 2006. Primer registro de la nutria neotropical del río (*Lontra longicaudis*) en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Oaxaca, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 77:133-135.

Brousset Hernández –Jáuregui, D. M. F. Galindo Maldonado, R. A. Valdez Pérez, M. Romano Pardo & A. Schuneman de Aluja. 2005. Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. Vet. Méx. 36 (3): 325-337.

Carranza- Castro, P.H. 2007. Cuantificación de estradiol, progesterona, testosterona y cortisol en heces de Chimpancé (*Pan troglodytes*) en cautiverio. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México. 32 pp.

Daniel, W. W. 2004. Bioestadística. Base para el análisis de ciencias para la salud. Limusa, México, 485 pp.



Duque-Dávila, D. L. 2007. Distribución, Abundancia y Hábitos alimentarios de la nutria (*Lontra longicaudis annectens* Major, 1897), en el Río Grande, Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán Oaxaca, México. Tesis de licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México, 77 pp.

Gallo, J. P. 1989. Distribución y estado actual de la nutria o perro de agua (*Lutra longicaudis annectens* Mayor 1897) Sierra Madre del Sur, México. Tesis de maestría en ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México, 236 pp.

Gallo, J. P. 1997. Situación y distribución de las nutrias en México, con énfasis en *Lontra longicaudis annectens* Mayor, 1897. Revista Mexicana de Mastozoología 2: 10-32.

Lariviere S., 1999. *Lontra longicaudis*. Mammalian Species 609:1-5.

Martínez-Romero, L. E. 2004. Determinación de fechas de aprovechamiento del venado cola Blanca (*Odocoileus virginianus*) a través de hormonas sexuales y comportamiento. Instituto de ecología, A .L. Xalapa, Veracruz. 80 pp.

Ochoa, V. 2001. Geomorfología, Clima y Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán Pue-Oax. México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 88 pp.

Palacios-Martínez, D. J. 2007. Cuantificación de hormonas esteroides sexuales y su relación con el ciclo estral del Puma (*Puma concolor*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México. 39 pp.

Patterson, B.D., G. Ceballos, W. Sechrest, M. F. Tognelli, T. Brooks, L. Luna, P. Ortega, I. Salazar, Y B.E. Young. 2005. Digital distribution maps of the mammals of the western hemisphere, version 2.0. NatureServe, Arlington, Virginia.



Pérez- García, L. 2005. Determinación del estrés fisiológico en Borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*) relacionado con el manejo extensivo en Sonora y Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California.

Reyes, J., C. Brachet, J. Pérez y A. Gutiérrez. 2004. Cactáceas y otras plantas de la cañada. Cuicatlán, Oaxaca, México. Sociedad Mexicana de Cactología, A.C.-Comisión Federal de Electricidad. México, D.F.

Reyes, J., C. Brachet, J. Pérez y A. Gutiérrez. 2006. Orquídeas y otras plantas nativas de la cañada. Cuicatlán, Oaxaca, México. Sociedad Mexicana de Cactología, A.C.-Comisión Federal de Electricidad. México, D.F.

Rothschild, Devon. 2004 "Fecal Glucocorticoids: A Non-Invasive method of Measuring Stress In River Otters (*Lontra canadensis*)." Thesis.

Rzedowski, J. 1988. Vegetación de México. Limusa. México. 432 pp.

San Juan Bautista Cuicatlán, Oaxaca. Cuaderno Estadístico Municipal. Edición 1993. INEGI. 11 -13 pág.

Santos –Moreno, J., M. Briones-Salas, G. González-Pérez y T. De J. Ortiz. 2003. Noteworthy records of two rare mammals in Sierra Norte de Oaxaca, México. The Southwestern Naturalist 48(2): 312-313.

Simon, M. S. 2003. Distribución y hábitat actual de la nutria (*Lontra longicaudis*) en la subcuenca del río Temascaltepec, Estado de México. Tesina de Licenciatura. FES-Iztacala UNAM.89 pp.

Soler, A. 2002. Nutrias en todo México. Biodiversitas. 47: 13 – 15.



Soto, M; Salame-Méndez, A; Ramírez-Pulido, J; Yáñez, L y Armella, M. 2004. Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo mexicano (*Canis lupus bailey*) en cautiverio. Acta Zoológica Mexicana. (n.s) 20(2):187-197.

Villa, B. Y F. Cervantes. 2003. Los mamíferos de México. Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México-Grupo Editorial Iberoamericana, México D.F. 140 p.

Zar, J.H., 1999. Bioestatalical análisis. 4ª ed., Prentice may, New Jersey, 931 pp.

