

**.UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Evaluación del nivel de estrés en leoncillos (*Cebuella pygmaea*) mediante la medición de cortisol en heces**

**Proyecto de Investigación**

**Juan Bernardo Galindo Sánchez**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniería en procesos Biotecnológicos

Quito, 21 de diciembre de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Evaluación del nivel de estrés en leoncillos (*Cebuella pygmaea*) mediante  
la medición de cortisol en heces**

**Juan Bernardo Galindo Sánchez**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Stella de la Torre, PhD

Firma del profesor

---

Quito, 21 de diciembre de 2016

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Juan Bernardo Galindo Sánchez

Código: 00107446

Cédula de Identidad: 1716897002

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y al Laboratorio de Biotecnología Vegetal por el apoyo que recibí a lo largo de esta investigación.

A Erica Gallerani, por la compañía y el soporte brindado durante el trabajo de campo.

A mis profesores, especialmente a Stella de la Torre y Venancio Arahana por permitirme ser parte de este trabajo y por su constante apoyo.

A mi familia

## RESUMEN

El leoncillo (*Cebuella pygmaea*), es el primate platirrino más pequeño de América del Sur. Perteneció a la subfamilia Callitrichinae (Cebidae). Comúnmente habita cerca a las riveras de los ríos en los bosques siempre verdes de tierras bajas inundables de la Amazonía de Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y Perú. Debido a su reducido tamaño, especificidad de hábitat y alimentación es considerado una de las especies más amenazada en el territorio ecuatoriano. Actividades antropogénicas como la fragmentación de los bosques, el tráfico ilegal de mascotas y la cacería hacen que poblaciones de *C. pygmaea* resulten seriamente afectadas. Esta especie está incluida en la lista de especies vulnerables del Ecuador. El objetivo de este estudio fue estimar los niveles de estrés a los que están sometidas tres poblaciones de leoncillos del oriente ecuatoriano. La población de San Pablo vive en un bosque altamente fragmentado. Los individuos del Puyo se encuentran en el centro de rescate Yanacocha y viven en semicautiverio. Finalmente, Tiputini es el área con menor impacto humano en donde se estudiaron tres grupos de leoncillos (T1, T5 y T6). Como indicador del nivel de estrés se midió el contenido de cortisol fecal mediante ensayos de inmunoanálisis (EIA). En total se analizaron 104 muestras de las tres poblaciones mencionadas anteriormente. La población de Tiputini presentó niveles más elevados de cortisol fecal comparados con Puyo y San Pablo. Al tomar en cuenta factores como la hora de deposición del material fecal no se encontraron diferencias significativas entre la mañana (06h00-12h00) y la tarde (12h01-17h00), por lo tanto, es posible comparar muestras a diferentes horas del día. Al considerar el sexo de los individuos, las hembras tienen ligeramente mayores niveles de cortisol fecal en comparación con los machos, sin embargo, estas diferencias no son significativas.

Palabras clave: *Cebuella pygmaea*, cortisol, metabolitos glucocorticoideos fecales, estrés.

## ABSTRACT

The pygmy marmoset (*Cebuella pygmaea*) is the smallest platyrrhine primate of South America. It belongs to the subfamily Callitrichinae (Cebidae). It commonly inhabits near the gallery forests in the Upper Amazon basin of Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador and Peru. Due to its small body size and specificity of its habitat and diet the pygmy marmoset is considered one of the most threatened species in the Ecuadorian territory. Anthropogenic activities such as forest fragmentation, illegal traffic of pets and hunting seriously affect populations of *C. pygmaea*. This species is included in the list of vulnerable species in Ecuador. The objective of this study was to determine the levels of stress of three populations of pygmy marmosets from the Amazonian Ecuador. The San Pablo population inhabits a heavily fragmented forest. The individuals of El Puyo live in the Yanacocha rescue center in a semi captive environment. Finally, Tiputini is the site with less human impact where three groups of marmosets (T1, T5 and T6) were studied. As an indicator of the level of stress, cortisol content in feces was used. A total of 104 samples were analyzed corresponding to the three populations mentioned above. The population of Tiputini showed higher levels of fecal glucocorticoid metabolites compared to Puyo and San Pablo. When taking into consideration factors such as the time of the deposition of the sample, no significant differences were found between the morning (06h00-12h00) and the afternoon (12h01-17h00), therefore it is possible to compare samples at different times of day. When considering the sex of individuals, females have slightly higher levels of fecal cortisol compared to males. However, the difference was not significant.

Key words: *Cebuella pygmaea*, cortisol, fecal glucocorticoid metabolites, stress.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE .....	9
1.2. BIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN .....	9
1.3. CORTISOL .....	10
1.4. ESTRÉS Y RESPUESTA AL ESTRÉS .....	11
1.5. MÉTODOS PARA MEDIR EL ESTRÉS .....	14
1.6. FACTORES QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE GLUCOCORTICOIDES (CORTISOL) .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	19
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO .....	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>4. ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	<b>21</b>
4.1. POBLACIÓN DEL PUYO, PROVINCIA DE PASTAZA .....	21
4.2. POBLACIÓN DE SAN PABLO, PROVINCIA DE SUCUMBÍOS .....	22
4.3. POBLACIÓN TIPUTINI, PROVINCIA DE ORELLANA .....	22
<b>5. MATERIALES</b> .....	<b>22</b>
5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HECES .....	22
<b>6. MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
6.1. COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	24
6.3. PREPARACIÓN DE DILUCIONES PARA LA CURVA ESTÁNDAR .....	25
6.4. ENSAYOS ENZIMA INMUNOANÁLISIS (EIA) PARA LA MEDICIÓN DE CORTISOL EN HECES	25
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>32</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍAS</b> .....	<b>33</b>
<b>12. TABLAS Y ANEXOS</b> .....	<b>37</b>
<b>13. APÉNDICES</b> .....	<b>40</b>

## TABLA DE ILUSTRACIONES

<p>Figura 1. Media + SD de los niveles de cortisol fecal para las tres poblaciones de <i>C. pygmaea</i> estudiadas. Localidad (F<sub>2, 89</sub> = 19.53, P &lt; 0.0001)          .....36</p>	36
<p>Figura 2. Niveles de cortisol fecal y los grupos de leoncillos estudiados en la estación biológica Tiputini, USFQ. (F<sub>2,38</sub> = 0.31, P= 0.7355) .....37</p>	37
<p>Figura 3. Correlación entre la composición grupal de (T1, T5 y T6) y la concentración de cortisol fecal.....37</p>	37
<p>Figura 4. Niveles de cortisol fecal de muestras excretadas en la mañana (06h00 a 12h00) y tarde (12h01 a 18h00) en las tres poblaciones.....38</p>	38
<p>Figura 5. Niveles de cortisol fecal en machos y hembras.....38</p>	38



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Descripción de la especie

*Cebuella pygmaea*, comúnmente conocido como leoncillo, pertenece a la familia Cebidae y a la subfamilia Callitrichinae. Es la especie de mono más pequeña que habita en el territorio ecuatoriano. Viven en los bosques siempreverdes de tierras bajas de la Amazonía de Ecuador, Colombia, Brasil, Perú y Bolivia (de la Torre et al. 2009).

### 1.2. Biología y Distribución

Específicamente, habita en los bosques de galería que yacen aledaños a los ríos y que se inundan en épocas de precipitación (de la Torre et al. 2009). A los leoncillos se los encuentra generalmente en árboles de *Spondias mombin*, *Sterculia* sp., *Inga marginata* y *Parkia* sp. (Soini, 1982) de cuyos exudados se alimentan. La abundancia de estas especies de árboles puede ser proporcional a la presencia y distribución de los leoncillos, su disponibilidad es esencial para su supervivencia. Complementan su dieta con presas animales como saltamontes (Orthoptera), abejas (Hymenoptera) y polillas (Lepidoptera), así como también de las flores y frutas pero en menor proporción (Townsend, 2001).

Son primates diurnos y arborícolas con locomoción cuadrúpeda. Ocupan áreas entre 0,1-0,5 ha. Los grupos de *C. pygmaea* son cohesivos y por lo general la composición grupal es de 6-7 individuos (Townsend, 2001). Tienen una estructura social monógama y solo el macho y hembra dominante se reproducen. Las hembras, en la mayoría de los casos, dan a

luz a gemelos (67-76%) y el periodo de gestación dura de 130 a 142 días. El destete de las crías se observa a los tres meses y son independientes a los cinco meses (Bairrao, 2010).

Las actividades humanas afectan a los leoncillos de varias maneras, reduciendo sus poblaciones por el tráfico ilegal de especies y el mercado de mascotas. La deforestación y fragmentación del bosque tienen múltiples consecuencias como la reducción de la disponibilidad de alimentos, restricciones espaciales a sus actividades, entre otras (de la Torre & Rylands, 2008). Todo esto constituye una fuente de estrés para estos primates por lo que puede tener repercusiones en su salud y en la dinámica de las poblaciones (Rangel-Negrin et al., 2009). Además, la especialización de hábitat y dieta de los leoncillos los hace aun más vulnerables a los impactos antropogénicos ya que, por lo general, los asentamientos y actividades humanas se centran en los márgenes de ríos (de la Torre et al. 2009).

### **1.3. Cortisol**

En la mayoría de los mamíferos el principal glucocorticoide es el cortisol que es transportado en la sangre de manera libre o unido a globulinas específicas. Se ha encontrado que el cortisol también está presente en las heces de chichicos y marmosetas *Saguinus spp.*, *Callithrix spp.* y *Cebuella pygmaea* (Brousset et al., 2005).

Los glucocorticoides (Gc's), en un nivel molecular, interactúan con dos tipos de receptores. Se unen a receptores mineralocorticoides y glucocorticoides con diferente afinidad. En niveles bajos y moderados los Gc's se unen preferencialmente al receptor mineralocorticoide con alta afinidad. Este receptor se encuentra saturado durante el pico diario de Gc's en el ritmo circadiano de un individuo. En contraste, cuando se desencadena

una alta liberación de Gc's, estos se unen a receptores glucocorticoides con menor afinidad y ocurre una vez que los receptores mineralocorticoides han sido saturados (Romero, 2004).

#### **1.4. Estrés y respuesta al estrés**

En un contexto general el estrés fisiológico es una respuesta multidimensional a estímulos ambientales predecibles o impredecibles que amenazan y alteran la estabilidad interna u homeostasis (Kersey & Dehnhard, 2014). Los estresores pueden ser factores físicos como el cambio inesperado de la temperatura, fisiológicos como la falta de agua y alimento, o inclusive comportamentales como un cambio en la estabilidad social, peleas, entre otros (Wingfield & Romero, nf).

Se conocen dos tipos de estresores, los reactivos y los anticipatorios. Ambos, impactan el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), responsable de iniciar una liberación secuencial de diversas hormonas que termina con la producción de glucocorticoides en la corteza suprarrenal. Sin embargo, los dos tipos de estresores operan por rutas neurales diferentes y pueden actuar de manera aguda o crónica (Boonstra, 2013).

Los estresores reactivos son considerados retos fisiológicos que causan una amenaza inmediata a la homeostasis de un individuo. Son señales físicas transmitidas al hipotálamo por medio de inputs neurales provenientes de fibras sensoriales periféricas a través de la médula espinal, regiones del cerebro posterior o inclusive pueden ser señales transmitidas por vía sanguínea. Señales como el frío, dificultad respiratoria, la pérdida de sangre, dolor somático o visceral, entre otros, son ejemplos de estresores reactivos. En definitiva, este tipo de señales desencadenan respuestas reflexivas que no requieren un procesamiento cognitivo de orden superior (Boonstra, 2013).

Los estresores anticipatorios son señales ambientales percibidas por el organismo que amenazan a la supervivencia, producen una disrupción homeostática y tienen bases psicológicas. La respuesta a este tipo de estresores produce liberación de glucocorticoides y puede ocurrir en total ausencia de una amenaza fisiológica real o inclusive antes de una amenaza directa como es el caso de un intento de depredación. Este tipo de señales requiere que el organismo interprete la significancia del estímulo sensorial ambiental, en donde las interpretaciones pueden ser basadas en respuestas innatas como el miedo instintivo que tiene la presa por su depredador, o inclusive, en recuerdos de experiencias previas como un ataque fallido por parte del predador. Cabe recalcar que este tipo de señales necesitan ser evaluadas en áreas cerebrales de toma de decisiones antes de impactar el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) para así desencadenar una respuesta mediada por la liberación glucocorticoides (Boonstra, 2013).

Los estresores también pueden ser clasificados como agudos (de minutos a horas) o crónicos (días a semanas). Sin embargo, el impacto del estresor sobre la fisiología del animal puede ser de corta o larga duración, y ciertos factores de estrés agudo pueden tener un impacto negativo a largo plazo. Al momento de categorizar a un estresor como agudo o crónico, no se debe tomar en consideración la duración del estresor, más bien, la duración de sus consecuencias en la fisiología del animal (Boonstra, 2013).

Las dos respuestas fisiológicas más importantes a estresores son la estimulación del sistema nervioso simpático que media la liberación de catecolaminas, y la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) que resulta en la secreción de glucocorticoides (GC's) que intervienen en la restauración de la homeostasis. A corto plazo, la liberación de glucocorticoides ayuda al individuo a sobrellevar situaciones que amenacen con su vida;

por el contrario, a largo plazo, en la mayoría de la literatura biomédica, establece que la activación crónica del eje HPA y las elevadas concentraciones de glucocorticoides resultantes pueden tener un efecto perjudicial en el fitness y supervivencia del organismo (Sheriff et al. 2011).

La respuesta inmediata al estrés está dada por la estimulación de las fibras simpáticas colinérgicas que inervan la médula suprarrenal y que causan la liberación de acetil colina, que a su vez estimula la liberación de catecolaminas (epinefrina o norepinefrina). Esta liberación hormonal es extremadamente rápida ocasionando efectos instantáneos como son el aumento del ritmo cardiaco, vasodilatación de las arteriolas en el músculo esquelético, vasoconstricción general, relajación de los músculos bronquiales, dilatación de las pupilas, pilo erección, y lo más importante la movilización de glucógeno hepático y ácidos grasos libres. Todas estas respuestas incrementan la eficiencia de acción para reaccionar ante un estímulo estresante en una escala de tiempo de segundos a minutos (Wingfield & Romero, nf).

Cuando un animal se enfrenta a un estresor la región PVN es estimulada causando que las neuronas parvocelulares liberen CRH hormona liberadora de corticotropina. A su vez, la CRH estimula a que la glándula pituitaria sintetice y transforme el precursor de la molécula pro-opiomelacortina en ACTH también conocida como hormona adrenocorticotropa. La ACTH es liberada en el torrente sanguíneo y estimula a la corteza suprarrenal a secretar altas cantidades de glucocorticoides. Usualmente la concentración de glucocorticoides alcanza su pico tras 15-30 minutos después de que el organismo percibe un estresor y regresa a sus niveles basales después de 60 a 90 minutos. La magnitud en la que los glucocorticoides se secretan depende de la severidad del estresor. Generalmente,

bajo condiciones en donde un estresor es agudo, el mecanismo de retroalimentación negativa opera eficientemente y el sistema retorna a sus niveles normales. Si el estresor es crónico, las señales de retroalimentación son débiles ocasionando que el sistema permanezca activado por más tiempo (Sheriff, 2011).

La proximidad de los primates a los seres humanos y los cambios en la organización social tiene un impacto importante en el nivel de estrés. Además, la dieta, el sexo, la alimentación, son factores que intervienen en la respuesta fisiológica de un individuo al estrés. Se sabe que el estrés interfiere en el desarrollo de comportamientos naturales tan importantes como la reproducción y homeostasis de los individuos (Rangel-Negrin et al., 2009). La respuesta que tienen los animales al estrés se correlaciona con la salud del animal y por lo tanto se asume que también con el estado de la población en general.

### **1.5. Métodos para medir el estrés**

Los glucocorticoides son utilizados como posibles indicadores de estrés fisiológico en vertebrados de vida libre. Por lo tanto, la medición de cortisol puede ser utilizada como un práctico biomarcador para reflejar los efectos combinados de las limitaciones fisiológicas, la salud, la asignación de energía, la calidad de hábitat y determinadas alteraciones antropogénicas a diferentes escalas ecológicas (Romero, 2004).

Es posible medir glucocorticoides en sangre, heces, orina y plumas. Todos los fluidos biológicos mencionados tienen sus pros y contras. Las ventajas de medir hormonas en la sangre es que reflejan un perfil hormonal en tiempo real de ese individuo. Por esta vía, se obtiene directamente los productos hormonales de la corteza suprarrenal, no subproductos o metabolitos como es en el caso de las heces. Además, la sangre obtenida puede

proporcionar información complementaria que permitirá evaluar la condición del animal, como es el caso de la medición de glucosa, ácidos grasos, hematocritos, índices de la función inmunitaria como perfiles de leucocitos, entre otros componentes sanguíneos (Hodges, 2010). Sin embargo, para animales de vida libre, esta técnica es altamente invasiva al momento de capturar y manipular a los individuos en su hábitat natural, consecuentemente al momento de cuantificar hormonas existe la posibilidad de sesgar los resultados por aumentar el nivel de estrés inducido por la manipulación de los animales (Sheriff et al. 2011).

En los últimos 25 años ha sido reconocida y sumamente utilizada la medición de metabolitos glucocorticoides en orina y heces para animales de laboratorio, domésticos y sobretodo para animales silvestres. Las hormonas esteroides circulantes en el plasma eventualmente son metabolizadas en el hígado y posteriormente excretadas como conjugados en la orina por los riñones o en el intestino por medio de los conductos biliares. Sin embargo, los esteroides presentes en los intestinos se someten muchas veces a la circulación enterohepática, es decir son reabsorbidos en el torrente sanguíneo y luego metabolizados intensivamente por la microflora bacteriana (Palme, nf).

Las heces pueden ser recolectadas fácilmente, inclusive por personal no capacitado. Existe la posibilidad de tomar frecuentemente muestras del mismo individuo por largos periodos de tiempo sin afectar su comportamiento o estatus endócrino ya que no hay la necesidad de capturar y manipular al animal (Palme, 2005).

Cuando se toma en cuenta el tiempo de retraso (lag time) entre la liberación de glucocorticoides en el plasma y su posterior aparición como metabolitos fecales en las

heces, se puede encontrar que el patrón del plasma sanguíneo también se ve reflejado en las heces. El tiempo de retraso depende principalmente del tiempo que demora el tránsito intestinal desde el duodeno hasta el recto, tomando en consideración que el tiempo de retraso es en su mayoría especie-específico (Palme, 2005). Por ejemplo, estudios de radiometabolismo han demostrado que en mamíferos de cuerpo grande, los esteroides fecales son secretados en las heces de 24 a 48 horas después de su aparición en la circulación. Para animales de cuerpo pequeño, como es el caso del tití común (*Callithrix jacchus*) el tiempo de tránsito es de 4 a 8 horas. Por lo tanto, conocer el tiempo que demora hasta que los metabolitos fecales son excretados es sumamente importante para poder interpretar correctamente los cambios de glucocorticoides fecales en relación a eventos fisiológicos (Hodges, 2010).

En definitiva, los niveles de metabolitos glucocorticoides fecales reflejan la tasa de producción, acumulación y eliminación de hormonas, durante un periodo de tiempo (Palme, 2005). Por lo que la medición de metabolitos glucocorticoides fecales puede proporcionar una evaluación más precisa de los niveles de glucocorticoides a largo plazo en comparación con una simple medición de glucocorticoides en la sangre (Millspaugh, 2004).

### **1.6. Factores que modifican los niveles de glucocorticoides (cortisol)**

Entre las variables biológicas que complican la interpretación de los resultados de la medición de metabolitos glucocorticoides fecales se encuentran la edad, sexo, estatus reproductivo, patrones diarios y estacionales de glucocorticoides, cautividad, dieta y rutas de excreción de los metabolitos (Dantzer et al. 2014).



Es importante considerar que las heces son defecadas junto a bacterias gastrointestinales y es muy probable que los esteroides sean metabolizados por la microflora bacteriana, teniendo repercusiones directas en la concentración de metabólicos fecales en heces que no han sido preservadas correctamente. Preferiblemente las heces deben ser almacenadas a -20 grados centígrados, en lo posible, previo a su recolección, este es el método más efectivo y recomendado para almacenar heces por largos periodos de tiempo. Esta opción no siempre es viable en el campo, alternativamente, se puede utilizar etanol para preservar las muestras de la degradación bacteriana hasta almacenarlas en el congelador (Heistermann, 2010).

En heces, para cuantificar los metabolitos glucocorticoides fecales es indispensable realizar un procedimiento de extracción en donde se separan los esteroides de la matriz fecal. Actualmente, el procedimiento más utilizado es resuspender la muestra fecal en una solución concentrada de etanol o metanol y agua, posteriormente se centrifuga la muestra para que las partículas fecales suficientemente grandes se sedimenten. Es indispensable elegir un solvente adecuado ya que puede tener diferentes efectos en la polaridad de los esteroides. El etanol es el más utilizado y sirve para preservar la muestra de la degradación microbiana e iniciar al proceso de extracción de las hormonas esteroides. La cantidad de etanol que se añade a cada muestra debería ser proporcional a la masa fecal total de dicha muestra. Es recomendable añadir etanol en una proporción 10:1, ó 1 ml de etanol por cada 0.1 g de heces (Palme et al., 2013).

En cuanto al sexo de los individuos, algunos estudios que analizan glucocorticoides fecales reportan mayores niveles para las hembras como es el caso del tití común, *C. jaccus*, el ratón de laboratorio, *Mus musculus*, el perro doméstico, *Canis lupus familiaris*,

entre otros. Los altos niveles de glucocorticoides en el plasma sanguíneo se ven reflejados también en un incremento en los metabolitos glucocorticoides fecales (Goymann, 2012). Una posible razón para este sesgo es que las globulinas de unión a esteroides presentan cierta afinidad a los glucocorticoides. En hembras, los glucocorticoides circulantes se sabe que tienen afinidad a globulinas de unión a esteroides gonadales, y por lo tanto, la concentración total de glucocorticoides puede ser mayor en comparación con los machos (Palme, 2005).

Los glucocorticoides fluctúan en un ritmo circadiano normal con picos en la sangre que ocurren inmediatamente después de las primeras actividades en la mañana y disminuyen a lo largo del día (Romero, 2002). Inclusive los glucocorticoides pueden fluctuar estacionalmente, usualmente con picos durante la temporada de apareamiento. Debido a la influencia de estas variables, para tener información confiable sobre los niveles de estrés en animales silvestres, lo ideal es recolectar muestras a la misma hora del día o la misma temporada. Si eso no es posible, los efectos de los cambios diarios y estacionales de glucocorticoides deben incorporarse en la interpretación de los resultados (Dantzer, 2014).

En un primer intento por evaluar el nivel de estrés en leoncillos mediante la medición de cortisol en heces, Espinosa y colaboradores (2015) estandarizaron el protocolo de extracción de cortisol utilizando el kit Oxford Biomedical "Cortisol EIA Kit". Al detectarse una tendencia de niveles de cortisol superiores ligados a pesos menores de muestra fecal seca, en este protocolo, el peso mínimo de heces secas para el inmunoensayo fue estandarizado a 0,05 g. En este primer estudio se analizaron 92 muestras colectadas en las localidades de Puyo, San Pablo y Tiputini de las cuales 52 fueron utilizadas para los análisis estadísticos. Espinosa et al. (2015) encontraron que los niveles de cortisol de los

individuos de la localidad del Puyo se diferenciaban significativamente de Tiputini y San Pablo, sugiriendo que el cautiverio tiene un efecto sobre los niveles de cortisol y estrés de estos primates. Sin embargo, en ese análisis no se controló por la influencia de variables como la hora de deposición y el peso de las muestras. El presente estudio tiene como finalidad complementar el estudio realizado por Espinosa et al. (2015) al analizar 40 muestras de heces de grupos de leoncillos de Tiputini, 32 de San Pablo y de 32 de Puyo, todas con un peso estandarizado de 0,05 g. Para los análisis se consideró la hora de deposición de todas las muestras y, en lo posible, la edad y el sexo de los individuos. Con base en la información que existe acerca de los agentes estresantes en los primates y los resultados de Espinosa et al. (2015), se esperaba encontrar mayores niveles de cortisol en las muestras de heces de leoncillos provenientes del Puyo, por su condición de cautiverio, seguido por San Pablo, un área altamente disturbada y al final Tiputini, un bosque en buen estado de conservación.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

- Evaluar los niveles de cortisol en heces de tres poblaciones de leoncillos (*Cebuella pygmaea*) de la Amazonía ecuatoriana mediante pruebas enzimáticas de inmunoanálisis (EIA), con la finalidad de relacionarlos con los niveles de estrés a los que están sometidas estas poblaciones.

### **2.2. Objetivo específico**

- Conocer los niveles de cortisol de las tres poblaciones en estudio.

- Evaluar la influencia de factores antropogénicos como el cautiverio y la fragmentación de los bosques sobre los niveles de cortisol de los leoncillos.
- Estimar los niveles de cortisol dependientes de la edad, sexo y la hora de deposición para evaluar más objetivamente los efectos antropogénicos y ambientales.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En general, los primates son un patrimonio natural único para las presentes y futuras generaciones. Son muy importantes para mantener la estructura y dinámica de los ecosistemas tropicales debido a que distintas especies cumplen roles ecológicos diversos como polinización, dispersión de semillas y como eslabón importante en la cadena trófica (de la Torre, 2010).

Es importante mencionar que todas las especies de primates en el Ecuador están amenazadas por las actividades humanas, y *C. pygmaea* es una de las más vulnerables por su especificidad de su alimentación y hábitat (De la Torre, 2000). Estudiar los niveles de estrés de poblaciones de esta especie que viven en ambientes con diferentes grados de alteración es importante para entender y manejar adecuadamente los factores estresantes que afectan a los individuos y a la viabilidad de las poblaciones.

Esta investigación busca relacionar el nivel de estrés al que están sometidas tres poblaciones de leoncillos debido a factores antropogénicos como el cautiverio y la fragmentación de los bosques. La información generada por este estudio servirá de base para promover mejores programas de manejo y conservación de la especie tanto in situ como ex situ.

#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

El presente proyecto analiza la concentración de cortisol en tres poblaciones de leoncillos de la amazonía ecuatoriana: Tiputini, San Pablo y Puyo. La estación de biodiversidad Tiputini-USFQ, está ubicada en la rivera norte del río Tiputini, cuenta con 638 hectáreas de bosque húmedo tropical, en donde más del 90% de sus bosques son terra firme y el resto representa a ciertas áreas de varzea en la zona riverina y algunos parches de igapó. La estación científica representa un área prístina de la selva amazónica con esencialmente sin impacto humano. De la Torre y colaboradores (2009) han estudiado diversas poblaciones de leoncillos en la localidad de San Pablo desde el año 2001, la misma que representa a un bosque de varzea altamente fragmentado a las orillas del río Aguarico. Los remanentes de bosque en esta localidad están rodeados de parcelas de pasto. Finalmente, en la localidad del Puyo el grupo de leoncillos habitan en el centro de rescate de vida silvestre Yanacocha en donde los animales viven en semicautiverio.

Las muestras de heces pertenecientes a la localidad del Puyo fueron colectadas en Junio de 2013, Diciembre de 2014 y Mayo de 2014; para Tiputini (T1, T5, T6), Mayo-Junio de 2014 y Mayo-Junio del 2016. Finalmente para San Pablo, Marzo y Abril del 2014.

##### **4.1. Población del Puyo, provincia de Pastaza**

Los individuos en cautiverio pertenecen todos a un grupo que vive en el centro de rescate de vida silvestre Yanacocha, localizado en el km 3 de la vía al Tena (UTM, zona 18, 9WGS84 9838712 S- 167707 E), en la Provincia de Pastaza, cantón Pastaza, parroquia Puyo.

#### **4.2. Población de San Pablo, provincia de Sucumbíos**

Los individuos de esta población pertenecen a un solo grupo que habita en un bosque varzea con un alto grado de fragmentación, a orillas del río Aguarico en las coordenadas (UTM, zona 18, PSAD 341767 E- 9969737 N).

#### **4.3. Población Tiputini, provincia de Orellana**

Los grupos de leoncillos viven en zonas aledañas a los senderos de la estación de Biodiversidad Tiputini, USFQ. Esta población está menos expuesta a las actividades antropogénicas, los bosques en esta zona no están fragmentados. Las muestras se obtuvieron de tres grupos con las siguientes coordenadas de referencia UTM, zona 18, WGS84: T1 (371669E – 9929379 S), T5 (371563 E - 9930213 S) y T6 (372797 E- 9928871 S).

### **5. MATERIALES**

#### **5.1. Recolección de muestras de heces**

- Muestras de heces de poblaciones de leoncillos (Puyo, San Pablo, Tiputini)
- Tubos eppendorf 2 mL
- Pinzas
- Red de polipropileno
- Etanol al 96%

#### **5.2. Extracción y medición de cortisol a partir de muestras de heces de leoncillos**

- Muestras de heces de *C. pygmaea* recolectadas en Puyo, San Pablo y Tiputini

- Kit Oxford Biomedical "Cortisol EIA kit" que contiene:
- EIA Buffer
- TMB Substrate
- 10x Wash Buffer
- Cortisol-HRP Conjugate
- Cortisol Standard
- Coated Plate
- Etanol potable 96%
- Vórtex (VWR ®)
- Cama de arena (Thermo Scientific TM)
- Cámara de flujo laminar (Labconco TM)
- Micro centrífuga (Eppendorf TM)
- Lector de microplatos DYNEX MRX (Dynex Technologies ®)
- Programa GraphPad Prism 6.01

## **6. MÉTODOS**

### **6.1. Colección de las muestras**

Para los primates en cautiverio, las heces fueron recolectadas en cuanto fueron excretadas por los animales en la plataforma de alimentación o en otros lugares de la jaula. Para los primates de vida libre, se colocó una red debajo de los árboles de alimentación y se colectaron las muestras, en lo posible, al momento de ser excretadas. De cada muestra se registró información sobre el grupo donde fue colectada, la hora de colección/excreción y, de ser posible, la identidad (sexo, edad) del individuo que la produjo. Se colocaron las heces en tubos Eppendorf de 2 mL con alcohol al 96% y fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal USFQ.

### **6.2. Extracción de cortisol a partir de muestras de heces**

Se utilizó el protocolo propuesto por Ziegler y colaboradores (1995), el mismo que fue estandarizado para utilizar muestras fecales de leoncillos por Espinosa et al. (2015). Cada muestra fue colocada en un pesaobjetos de plástico con su respectiva rotulación, después fue secada en la estufa a 28 grados centígrados durante 6 horas; al finalizar este tiempo se incubó la muestra durante toda la noche a temperatura ambiente en el mismo pesaobjetos de plástico. Se tomaron 0,05g de material fecal seco para el análisis. Las muestras que no alcanzaron el peso indicado fueron descartadas. Luego, se trituró la muestra en un mortero hasta convertirla en polvo fino. Enseguida, se repartió equitativamente la muestra en cuatro tubos Eppendorf de 1.5 ml y se agregó en cada tubo 625 uL de agua destilada conjuntamente con 625 uL de etanol al 96%. Se mezcló con el Vórtex por 10 minutos. Finalmente, se centrifugó a 13200 rpm por 20 minutos. Cuando no



fue posible su procesamiento inmediato, las muestras fueron almacenadas a -20 grados centígrados.

Dentro de la cámara de flujo laminar, de cada uno de los 4 tubos de la muestra se pipetearon 25 uL de sobrenadante en un tubo Eppendorf de 0.2 ml para obtener un volumen final de 100 uL. Se colocaron los tubos abiertos en la cama de arena durante 3-4 horas a 60 grados centígrados hasta que el líquido se evaporó. Se añadieron 100 uL de buffer EIA (buffer de extracción) en cada uno de los tubos y por último se realizó un spin en la centrifugadora por 8 segundos.

### **6.3. Preparación de diluciones para la curva estándar**

Se utilizaron diversas diluciones de cortisol provenientes del kit de Oxford Biomedical “Cortisol EIA kit”. Las diluciones fueron realizadas en base al protocolo establecido en el kit.

### **6.4. Ensayos enzima inmunoanálisis (EIA) para la medición de cortisol en heces**

Para tener un análisis cuantitativo de cortisol en las heces, se añadieron 50 uL de las muestras y de las diluciones de cortisol para la curva estándar en los pocillos del microplato por duplicado. Además, se añadieron 50 uL de la dilución del conjugado de hormona, Cortisol-HRP, en cada pocillo, y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después, muy cuidadosamente, se lavaron los pocillos del microplato, con 300 uL del buffer de lavado por tres ocasiones. Enseguida, se añadieron 150 uL del sustrato TMB en los pocillos utilizados y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se leyó el microplato a 630 nm en el lector DYNEX MRX del laboratorio de Enfermedades Tropicales de la USFQ.

## 6.5 Análisis de datos

Con las concentraciones de cortisol obtenidas se realizó un ANOVA multifactorial con población, hora de deposición (mañana 06h00 a 12h00, y tarde 12h01 a 18h00), y sexo como factores. Los test post-hoc se hicieron con el test de separación de medias de Tukey. Antes de realizar estos análisis se elaboró una prueba de normalidad de los datos por cada población (prueba de D'agostino & Pearson). Se utilizó un valor alfa de 0,05 y todas las poblaciones pasaron la prueba de normalidad.

## 7. RESULTADOS

Los valores promedio de cortisol obtenidos por población fueron, para Tiputini,  $104 \pm 41$  ng/g; para la población del Puyo  $84 \pm 30$  ng/g y para la población de San Pablo  $57 \pm 15$  ng/g. Estas diferencias son significativas (Fig.1). El test de separación de medias de Tukey evidenció que la población de San Pablo se diferencia significativamente de las poblaciones de Tiputini y Puyo. Mientras que entre las poblaciones de Puyo y Tiputini no hay una diferencia significativa en los niveles de cortisol fecal de las poblaciones.

En Tiputini, se analizó si existen diferencias entre los grupos T1, T5 y T6 y se encontró que la diferencia entre los tres grupos en los niveles de cortisol fecales no fue significativa ( $F_{2,38} = 0.31$ ,  $p=0,7355$ ) (Fig. 2).

La hora de deposición del material fecal y el sexo de los individuos no tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de cortisol. (Hora de deposición  $F_{1,14} = 0,4831$   $p=0,4884$ ); sexo ( $F_{1,14} = 1,256$   $p= 0,2813$ ) respectivamente (Fig. 5 y 6).

## 8. DISCUSIÓN

Los estudios de estrés en vertebrados provienen de dos frentes, el más representativo surge de la comunidad biomédica y en la minoría están aquellos que trabajan midiendo el estrés en la naturaleza como es el caso de los biólogos conservacionistas y los ecólogos fisiológicos. Una diferencia fundamental de cómo el estrés es estudiado en la naturaleza y dentro el laboratorio radica en los factores ecológicas que ejercen presión a los animales en estado silvestre y que no se expresan de la misma manera en animales de laboratorio (Boonstra, 2013).

En la literatura biomédica los impactos que tiene los estresores crónicos están relacionados con patología, y esta palabra no está asociada únicamente a enfermedades bacterianas, virales o parasíticas, también incluye una gran cantidad de problemas sistémicos como hipertensión, enfermedades cardiovasculares, úlceras, entre otras. Bajo este punto de vista, las consecuencias que tiene el estrés crónico sobre el eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) implican que este no está siendo regulado de manera óptima o no funciona como debería. El estrés crónico se cree que se da cuando la retroalimentación negativa entre los glucocorticoides y el cerebro falla. Una manera invasiva de evaluar estrés crónico y que permite también monitorear el sistema de retroalimentación negativo en animales de vida silvestre es medir la resistencia a la dexametasona. Este es un glucocorticoide artificial, que al ser inyectado en el animal debería reducir el nivel de glucocorticoides presentes en la sangre, sin embargo, en animales crónicamente estresados esto no ocurre. Como consecuencia del estrés crónico en la fisiología de un animal puede darse supresión de la digestión y reproducción, inmunosupresión. La consecuencia neta es la reducción en el fitness (reproducción y supervivencia) del animal (Boonstra, 2013).

A pesar de que la mayoría de la comunidad científica, incluyendo a ecólogos fisiológicos aceptan que el estrés crónico resulta en patología, existen varios investigadores como Boonstra (2013) y Romero (2014) que sugieren que el estrés crónico a pesar de que tiene repercusiones en el fitness de un individuo, a largo plazo es parte de las experiencias normales de muchos animales que viven en la naturaleza y es parte de las adaptaciones evolutivas a largo plazo a diversas presiones ecológicas.

Entre los objetivos planteados para este estudio estuvo el cuantificar los niveles de cortisol presentes en las heces de individuos de *C. pygmaea* en tres poblaciones de la Amazonía ecuatoriana y relacionarlos con los niveles de estrés a los que están sometidas las poblaciones. Como se observa en la figura 1, hay una mayor concentración de cortisol en las muestras de Tiputini, en comparación con las poblaciones de San Pablo y Puyo.

Es posible que el perfil de cortisol obtenido en Tiputini, el lugar con menor impacto antropogénico, representen una ventaja fisiológica al momento de lidiar con los estresores que pueden predominar en un bosque prístino, como por ejemplo la depredación (Boonstra, 2013).

Fisiológicamente hay dos respuestas que pueden tener las presas frente un alto grado de depredación, la primera es mostrar una respuesta de estrés aguda bajo el intento de depredación. La segunda es mostrar tanto una respuesta de estrés aguda de corta duración, así como una respuesta de estrés crónica de largo plazo. Esta última resulta en una memoria de anticipación del ataque que mejora la vigilancia y aumenta el miedo en el individuo (Boonstra, 2013).

Los efectos directos de la depredación son obvios. Sin embargo, los efectos indirectos son variables, pues existe cierta plasticidad entre las especies en la respuesta a un alto riesgo de depredación a largo plazo. En ciertas interacciones depredador-presa, la presa ve a su depredador como un estresor agudo y no hay manifestaciones de efectos indirectos a largo plazo. En otras ocasiones, la presa está crónicamente estresada por el aumento de riesgo de depredación. Para evaluar si la presa ha estado crónicamente estresada por sus depredadores se deberían examinar todas las manifestaciones de estrés crónico que hay y estas son un aumento en los niveles de glucocorticoides, decaimiento de la globulina de unión a corticoesteroides, resistencia a dexametosona, incremento en la gluconeogénesis con altos niveles de glucosa y una menor cantidad de ácidos grasos libres (Boonstra, 2013).

Es difícil predecir los efectos de la cautividad en relación a los niveles de cortisol presentes en las heces de leoncillos de Yanacocha (Puyo) debido a que no se conoce cuáles son los niveles basales de glucocorticoides para esta especie. Además, existe la posibilidad de introducir un sesgo al estudio por la aclimatación dada al no medir los niveles de cortisol a través del tiempo desde que los animales fueron puestos en semicautiverio. En este estudio se reportó una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de cortisol de las poblaciones de Puyo y San Pablo que, sumada a los resultados obtenidos en la investigación de Espinosa et al. (2015) sugiere que el cautiverio tiene cierto efecto en los niveles de estrés de los individuos. Animales que están en cautividad enfrentan perturbaciones a sus patrones de comportamiento natural y condiciones ecológicas que pueden incrementar el estrés. La presencia continua de humanos (Davis et al., 2005), cambios en patrones de agrupamiento de los individuos y el suministro de recursos alimenticios artificiales pueden ser estresores importantes para animales que están en

cautividad. Un estudio realizado por Rangel-Negrín et al. (2009) encontró que el mono araña (*Ateles geoffroyi*) los niveles de glucocorticoides fecales son menores en individuos que habitan en áreas conservadas comparado con individuos que viven en áreas fragmentadas y en cautividad. Sin embargo, cuando se trabaja con animales en cautiverio, es indispensable tomar en cuenta el tiempo que los animales pasen en cautiverio ya que va a influenciar sus concentraciones basales de glucocorticoides así como su sensibilidad al estímulo. De ser posible, cualquier estudio que se realice con animales en cautividad debe considerar el tiempo para la aclimatación e incorporar esta información en el estudio (Millspaugh, 2004).

Varios estudios se han enfocado en el impacto de la fragmentación y la calidad del hábitat con los niveles de glucocorticoides, la mayoría de estudios encuentran una relación positiva entre las perturbaciones y los niveles de glucocorticoides (Busch & Hayward, 2009), como es el caso del aullador carayá negro (*Alouatta caraya*) y el agateador negro (*Certhia familiaris*) en el estudio realizado por Martínez-Mota et al. (2007) y Soursa et al. (2003) respectivamente. Por el contrario, Munshi-South et al. (2008) encontraron que una población de elefantes africanos del bosque (*Loxodonta cyclotis*) que habitan junto a campos petroleros tiene menor concentración de glucocorticoides fecales comparada con individuos que viven en los alrededores del parque nacional (Busch & Hayward, 2009). Por lo tanto, el impacto en la calidad del hábitat y la fragmentación puede ser variable. Los leoncillos de la localidad de San Pablo habitan en un bosque altamente fragmentado. Sorprendentemente, es la población con menores niveles de cortisol fecal. Es posible que los individuos estudiados se fueran aclimatando gradualmente a su entorno, a la presencia humana y a la escasez de predadores. Desde que de la Torre y colaboradores (2009)

comenzaron a estudiar esta población en el 2001 se han reportado varios casos de desaparición de grupos, el grupo del que se recolectaron las muestras es el único que sobrevive hasta ahora, posiblemente por su capacidad, natural o adquirida, de tener niveles bajos de cortisol y de estrés.

En cuanto al sexo de los individuos se sabe que puede tener un efecto en los niveles de cortisol medidos en heces como es el caso del león marino (*Eumetopias jubatus*) y del tití común (*C. jacchus*). En este último se encontró que los niveles de cortisol fecal en hembras ( $\bar{X} = 216.30 \pm 41.67 \text{ ng/g}$ ) es mayor que en machos ( $\bar{X} = 63.38 \pm 6.99 \text{ ng/g}$ ) (Keay, 2006). En mi estudio la muestra que mayor concentración de cortisol tiene es T40 (con 152,56 ng cortisol/ g muestra), que proviene de una hembra adulta, mientras que la muestra más alta para el sexo opuesto es T24 (con 123,45 ng cortisol/ g muestra). Para ver la influencia del sexo en los niveles de cortisol, se analizaron todas las muestras de las que se tenía información del sexo de los individuos, en total 9 muestras por cada sexo, pero no encontré diferencias significativas entre el nivel de cortisol fecal y el sexo de los individuos ( $p=0,3220$ ) (Fig 6).

En cuanto a la hora de deposición del material fecal, se han reportado ritmos diarios de excreción de los niveles basales de glucocorticoides para muchas especies silvestres incluyendo al tití común (*C. jacchus*), en donde un estudio determinó que en hembras los valores más elevados de cortisol fecal se dan en la tarde. Sin embargo, en los machos no hubo variación significativa en el perfil de cortisol fecal al comparar muestras obtenidas en la mañana de (06h00-12h00) y en la tarde (12h01-17h00), (Ferreira, et al., 2011). En esta investigación no se encontró una influencia significativa de la hora del día ( $F_{1,89} = 7.102e^{-005}$ ,  $p=0,06851$ ) (Fig 5).

## **9. CONCLUSIONES**

- La población de Tiputini presenta los niveles de cortisol más altos y variables, posiblemente por la complejidad de los factores ambientales, incluida la depredación, asociados a bosques bien conservados.
- No encontré diferencias significativas entre los niveles de cortisol fecal y la hora de recolección.
- No encontré una diferencia significativa entre los niveles de cortisol y el sexo de los individuos.
- Existen diferencias significativas en los niveles de cortisol encontrados entre las poblaciones de Puyo y San Pablo, que sugieren que el cautiverio tiene un impacto significativo en los niveles de estrés de los individuos de esta población.

## **10. RECOMENDACIONES**

- En un análisis posterior, deberían relacionarse los registros de intentos de depredación y/o presencia de depredadores potenciales en los territorios de leoncillos, con los niveles de cortisol fecal.
- Se sugiere, recolectar, en lo posible, más muestras que detallen información del sexo, la edad, hora de recolección y actividades previas del individuo, de las poblaciones en estudio y de nuevas poblaciones afectadas diferencialmente por actividades humanas.
- Para evaluar el potencial efecto del estrés sobre la supervivencia y reproducción de los individuos y sobre la dinámica de las poblaciones de esta especie, es necesario



relacionar los niveles de cortisol de cada uno de los grupos con sus tasas de reproducción, así como con las tasas de desaparición de grupos y la densidad de individuos de cada población.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Bairrao, E. (2010). *Cebuella pygmaea*. Guía de manejo para Callitricidos. (Asociación Europea de Zoológicos y Acuarios) EAZA, ZooParc de Beauval. Segunda Edición.
- Brousset, D., Galindo, F., Valdez, R., & Romano, F. (2005). Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals. *Veterinaria México*, 36 (3), 325-337.
- Boonstra, R. (2013). Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology*, 27, 11-23.
- Busch, D., Hayward, L. (2009). Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biological Conservation*, 142, 2844-2853.
- Dantzer, B., Fletcher, Q., Boonstra, R., & Sheriff, M. (2014). Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? *Conservation Physiology*, 2.
- De la Torre, S. (2010). Los primates ecuatorianos, estudios y perspectivas. *Avances en Ciencias e Ingenierías*, Universidad San Francisco De Quito, 2, 27-35.
- De la Torre, S., Yépez, P., and Snowdown, C. T. (2009). "Ecology and conservation of pygmy marmosets in amazonian ecuador." In L. C. Davis, S. M. Ford, and L. Porter, (ed.), *The smallest anthropoids: The Marmoset/Callimico Radiation*, 451-464. Springer Verlag, New York.
- De la Torre, S. (2000). Effects of human activities on wild pygmy marmosets in Ecuadorian Amazonia. *Abstract Biological Conservation*, 94, 153-163.
- De la Torre, S., & Rylands, A. (2008). *Cebuella pygmaea*. The IUCN Red List of Threatened Species. e.T41535A10493764., <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T41535A10493764.en>.
- Ferreira, J. Et al. (2001). Morning and Afternoon Patterns of Fecal Cortisol Excretion among Reproductive and Non-Reproductive Male and Female Common Marmosets, *Callithrix jacchus*, *Biological Rhythm Research*, 32:2, 159-167
- Goymann, W. (2012). On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods in Ecology and Evolution*, 757-765.

- Heistermann, M. (2010). Non-invasive monitoring of endocrine status in laboratory primates: methods, guidelines and applications. *Advances in Science & Research*, 5, 1-9.
- Hodges, K., Brown, J., & Heistermann, M. (2010). Endocrine Monitoring of Reproduction and Stress. En D. Kleiman, *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for zoo Management*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Kersey, D., & Dehnhard, M. (2014). The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- Martínez-Mota, R., Valdespino, C., Sánchez-Ramos, M.A., Serio-Silva, J.C. (2007). Effects of forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. *Animal Conservation* 10, 374–379.
- Millsbaugh, J., & Washburn, B. (2004). Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology*, 138, 189-199.
- Munshi-South, J. Et al. (2008). Physiological indicators of stress in African forest elephants (*Loxodonta africana cyclotis*) in relation to petroleum operations in Gabon, Central Africa. *Diversity and Distributions* 14, 995–1003.
- Palme, R. (n.f). *Stress Hormones in Mammals and Birds*. New York Academy of Sciences, 1040, 162-171.
- Palme, R. (2005). *Measuring Fecal Steroids, Guidelines for Practical Application*. New York Academy of Sciences, 1046, 75-80.
- Palme, R. (2013). Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. *Austria and the Research Group of Psychoneuroendocrinology*, 100, 238-246.
- Townsend, W. (2011). Mammalian Species. *Callithrix pygmaea*. *American Society of Mammalogist*, 655, 1-6.
- Rangel-Negrín, A. (2009). Stress in Yucatan spider monkeys: effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations. *Animal Conservation*, 12, 496-502.
- Romero, M. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 128, 1-24.
- Romero, L. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology and Evolution*, 19 (5), 249-255.

- Sheriff, M., Dantzer, B., Belehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Physiological Ecology*, 166, 869-887.
- Soini, P. (1982). Ecology and Population Dynamics of the Pygmy Marmoset, *Cebuella pygmaea*. *Folia Primatol*, 39, 1-21.
- Suorsa, P., Huhta, E., Nikula, A., Nikinmaa, M., Jantti, A., Helle, H., Hakkarainen, H. (2003). Forest management is associated with physiological stress in an oldgrowth forest passerine. *Proceedings of the Royal Society B* 270, 963–969
- Wingfield, J., & Romero, L. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. *Handbook of Physiology- Coping with the Environment* (págs. 211-233).

## 12. TABLAS Y ANEXOS

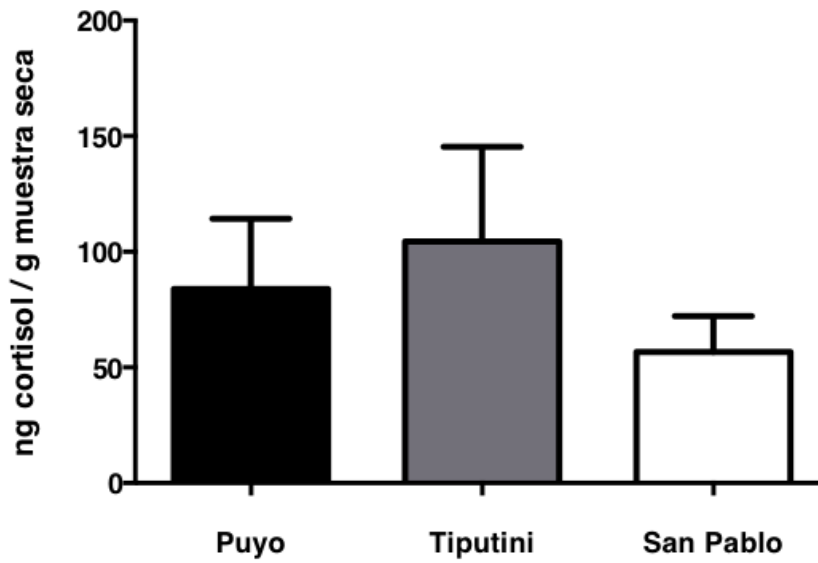
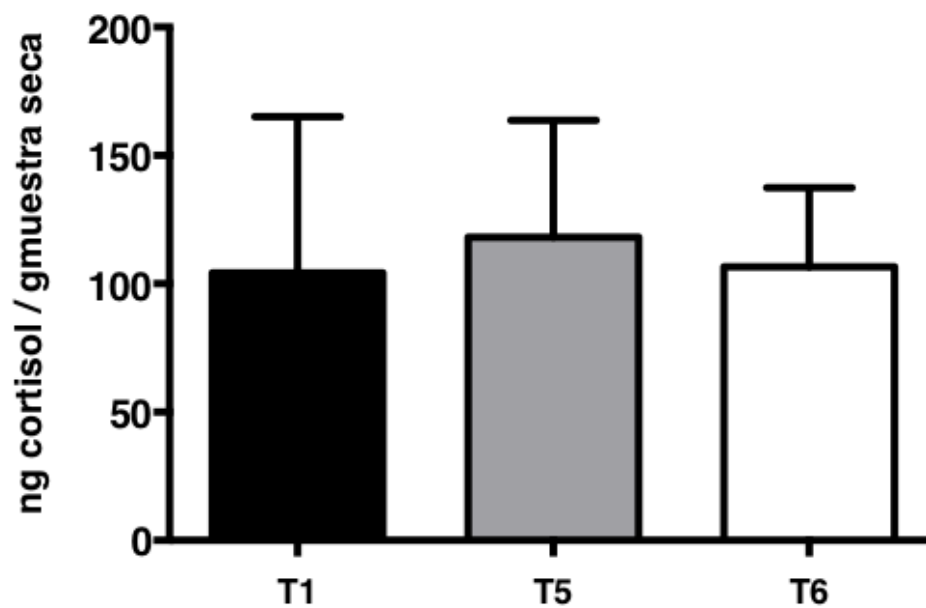
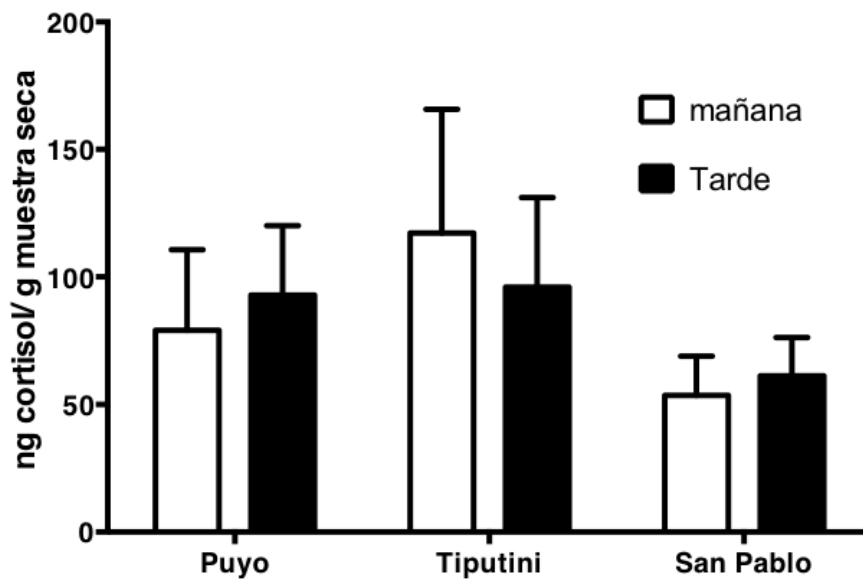


Figura 1. Media + SD de los niveles de cortisol fecal para las tres poblaciones de *C. pygmaea* estudiadas. Localidad ( $F_{2,89} = 19.53$ ,  $P < 0.0001$ ).



**Figura 2. Niveles de cortisol fecal y los grupos de leoncillos estudiados en la estación biológica Tiputini, USFQ. ( $F_{2,38} = 0.31$ ,  $P = 0.7355$ )**



**Figura 3. Niveles de cortisol fecal de muestras excretadas en la mañana (06h00 a 12h00) y tarde (12h01 a 18h00) en las tres poblaciones.**

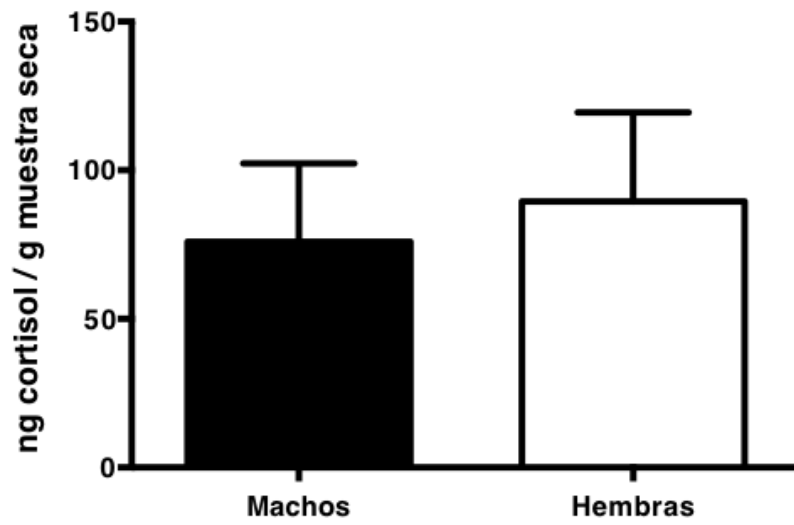


Figura 4. Niveles de cortisol fecal en machos y hembras.

### 13. APÉNDICES

**Tabla 1. Concentración de cortisol en muestras de heces de leoncillos analizadas provenientes de la localidad de Puyo (YC).**

	<b>Nomenclatura muestras</b>	<b>concentración ng cortisol/ml muestra</b>	<b>%B/B0</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol/g muestra</b>
<b>1</b>	YC35	1,29	15,1	0,05	100	128,67
<b>2</b>	YC36	1,19	16,7	0,05	100	118,96
<b>3</b>	YC37	1,06	19,3	0,05	100	106,32
<b>4</b>	YC39	0,97	21,6	0,05	100	97,40
<b>5</b>	YC40	0,74	30,1	0,05	100	73,50
<b>6</b>	YC41	0,85	25,3	0,05	100	85,46
<b>7</b>	YC43	0,62	36,1	0,05	100	62,17
<b>8</b>	YC44	0,68	33	0,05	100	67,60
<b>9</b>	YC45	0,81	26,8	0,05	100	81,26
<b>10</b>	YC47	0,77	28,5	0,05	100	77,21
<b>11</b>	YC19	1,55	20,5	0,05	100	155,02
<b>12</b>	YC24	1,31	25,48	0,05	100	131,49
<b>13</b>	YC28	1,31	25,56	0,05	100	131,16
<b>14</b>	YC18	1,13	30,58	0,05	100	112,67



15	YC9	1,11	30,99	0,05	100	111,33
16	YC13	1,06	32,69	0,05	100	106,04
17	YC1	1,06	32,77	0,05	100	105,80
18	YC26	0,96	36,23	0,05	100	96,13
19	YC16	0,88	39,7	0,05	100	87,63
20	YC20	0,78	44,28	0,05	100	77,91
21	YC29	0,74	46,08	0,05	100	74,48
22	YC8	0,67	50,25	0,05	100	67,24
23	YC27	0,65	51,4	0,05	100	65,39
24	YC14	0,65	51,46	0,05	100	65,30
25	YC6	0,64	52,03	0,05	100	64,41
26	YC15	0,58	56,26	0,05	100	58,24
27	YC7	0,57	57,17	0,05	100	57,01
28	YC5	0,57	57,33	0,05	100	56,80
29	YC11	0,56	58,24	0,05	100	55,60
30	YC12	0,43	68,82	0,05	100	43,48
31	YC23	0,35	78,67	0,05	100	34,57

32	YC30	0,28	88,13	0,05	100	27,53
----	------	------	-------	------	-----	-------

**Tabla 2. Concentración de cortisol en muestras de heces de leoncillos analizadas provenientes de la localidad de San Pablo (SP).**

	Nomenclatura muestras	concentración ng cortisol/ml muestra	%B/B0	g muestra seca	Factor de dilución	Concentración cortisol ng cortisol/g muestra
1	SP1	0,52	54,7	0,05	100	52,13
2	SP2	0,49	57,2	0,05	100	49,35
3	SP3	0,64	44,9	0,05	100	64,48
4	SP6	0,75	38,1	0,05	100	74,93
5	SP7	0,67	42,9	0,05	100	67,37
6	SP9	1,47	14,3	0,05	100	146,86
7	SP10	0,62	46,9	0,05	100	61,68
8	SP15	0,48	58,4	0,05	100	48,02
9	SP17	0,42	64,1	0,05	100	42,15
10	SP22	0,51	55,5	0,05	100	51,15
11	SP33	0,67	51,7	0,05	100	67,38
12	SP40	0,72	48,4	0,05	100	72,08

13	SP41	0,65	53,7	0,05	100	64,58
14	SP45	0,59	58,3	0,05	100	58,76
15	SP44	0,61	56,2	0,05	100	61,33
16	SP46	0,71	48,9	0,05	100	71,32
17	SP35	0,68	51	0,05	100	68,36
18	SP48	0,64	54,4	0,05	100	63,65
19	SP8	0,65	52,7	0,05	100	65,37
20	SP11	0,87	40,7	0,05	100	87,38
21	SP16	0,77	45,7	0,05	100	77,17
22	SP19	0,51	63	0,05	100	51,48
23	SP21	0,60	56,7	0,05	100	59,60
24	SP25	0,71	48,9	0,05	100	71,42
25	SP32	0,91	39,3	0,05	100	90,63
26	SP34	0,47	67	0,05	100	46,97
27	SP42	0,59	57,3	0,05	100	58,79
28	SP43	0,53	61,9	0,05	100	52,88
29	SP47	0,94	37,8	0,05	100	94,38
30	SP49	0,42	71,4	0,05	100	42,41
31	SP50	0,57	58,5	0,05	100	57,12
32	SP51	0,59	56,9	0,05	100	59,30

**Tabla 3. Concentración de cortisol en muestras de heces de leoncillos analizadas provenientes de la localidad de Tiputini (T).**

	<b>Nomenclatura muestras</b>	<b>concentración ng cortisol/ml muestra</b>	<b>%B/B0</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol/g muestra</b>
<b>1</b>	T2	0,82	42,15	0,05	100	82,24
<b>2</b>	T3	0,62	53,83	0,05	100	61,70
<b>3</b>	T4	0,81	42,68	0,05	100	81,13
<b>4</b>	T5	2,10	12,54	0,05	100	210,20
<b>5</b>	T6	1,77	16,89	0,05	100	176,62
<b>6</b>	T7	1,11	31,05	0,05	100	111,13
<b>7</b>	T8	0,94	36,94	0,05	100	94,29
<b>8</b>	T9	1,82	16,12	0,05	100	181,88
<b>9</b>	T10	1,18	29,09	0,05	100	117,71
<b>10</b>	T11	0,79	43,64	0,05	100	79,18
<b>11</b>	T15	0,90	38,52	0,05	100	90,40
<b>12</b>	T16	1,11	31,05	0,05	100	111,13
<b>13</b>	T17	1,97	14,16	0,05	100	196,52
<b>14</b>	T18	0,82	42,15	0,05	100	82,24

<b>15</b>	T20	0,96	36,46	0,05	100	95,52
<b>16</b>	T21	0,79	43,59	0,05	100	79,28
<b>17</b>	T22	0,92	37,85	0,05	100	92,02
<b>18</b>	T23	0,72	47,22	0,05	100	72,40
<b>19</b>	T24	1,23	27,51	0,05	100	123,45
<b>20</b>	T26	1,22	27,99	0,05	100	121,66
<b>21</b>	T28	2,06	12,97	0,05	100	206,41
<b>22</b>	T29	1,40	23,44	0,05	100	140,38
<b>23</b>	T30	0,53	60,48	0,05	100	52,76
<b>24</b>	T27	0,57	57,18	0,05	100	57,00
<b>25</b>	T31	0,64	52,15	0,05	100	64,23
<b>26</b>	T32	0,74	46,27	0,05	100	74,13
<b>27</b>	T33	1,47	22,15	0,05	100	146,52
<b>28</b>	T34	1,33	25,17	0,05	100	132,77
<b>29</b>	T35	3,16	4,31	0,05	100	315,65
<b>30</b>	T36	1,68	18,18	0,05	100	168,36
<b>31</b>	T38	0,98	35,41	0,05	100	98,30

<b>32</b>	T39	0,85	40,77	0,05	100	85,22
<b>33</b>	T40	1,53	20,96	0,05	100	152,56
<b>34</b>	T41	0,72	47,32	0,05	100	72,23
<b>35</b>	T42	1,44	22,63	0,05	100	144,18
<b>36</b>	T43	0,68	50	0,05	100	67,64
<b>37</b>	T44	1,03	33,64	0,05	100	103,23
<b>38</b>	T45	1,05	33,11	0,05	100	104,78
<b>39</b>	T46	0,69	49,09	0,05	100	69,16
<b>40</b>	T47	0,89	39,28	0,05	100	88,60
<b>41</b>	T48	0,80	43,06	0,05	100	80,35
42	T49	0,70	48,47	0,05	100	70,21
43	T50	0,52	61,34	0,05	100	51,72