



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

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

**ALEXANDRA ESTEFANÍA ESPINOSA MATA**

**Venancio Arahana, Ph.D, Director de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito  
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, Diciembre 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

## HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

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

Alexandra Estefanía Espinosa Mata

Venancio Arahana, Ph.D.  
Director de Tesis y  
Miembro del Comité de Tesis

---

Stella de la Torre, Ph.D.  
Codirectora de Tesis y  
Miembro del Comité de Tesis

---

María de Lourdes Torres, Ph.D.  
Miembro del Comité de Tesis

---

Stella de la Torre, PhD.  
Decana del Colegio de Ciencias  
Biológicas y Ambientales

---

Quito, diciembre de 2014

## © DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: Alexandra Estefanía Espinosa Mata

C. I.: 1716720691

Fecha: Quito, diciembre del 2014

## DEDICATORIA

*“Nuestra recompensa se encuentra en el  
esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo  
total es una victoria completa”*  
(Mahatma Gandhi)

A mi Papá y mamá, con todo mi cariño y amor por ser las personas que han hecho todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar. A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Gracias a ustedes soy lo que soy ahora.

A mi abuelito, mi segundo padre, porque desde el cielo se que me estás cuidando. A mi hermano, Paúl, el mejor amigo que la vida me pudo dar, gracias por todo el apoyo incondicional, por ser mi fuerza para seguir siempre adelante y por toda la confianza que siempre me has depositado. A mi hermana, Johanna, por ser mi amiga, mi compañera de juegos siempre y por enseñarme el valor de la paciencia.

A mis mejores amigos, por compartir conmigo los momentos importantes de mi vida, brindándome una amistad sincera, contagiándome su alegría a través de sus ocurrencias, y enseñándome diferentes maneras de ver y disfrutar la vida.

A mis profesores, principalmente Lourdes y Venancio, que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias para formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida.

A la USFQ por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional, por ser mi casa durante este tiempo y darme todas las facilidades para crecer. En general a todos mis amigos, compañeros, profesores de la USFQ y a todos quienes pertenecen al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por formar parte de esta aventura ya que siempre se quedarán en mis recuerdos.

De manera especial quiero agradecer a Charles T. Snowdon del Departamento de Psicología de la Universidad de Wisconsin, Madison y a Toni Ziegler del Wisconsin Regional Primate Center por todo su apoyo y ayuda en esta investigación.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las que me encantaría agradecerles por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones. Gracias a todos ustedes que creyeron en mí.

*La investigación de campo se realizó bajo los permisos 0010-2012-FAU-MAE-DPO-PNY, 006-2013-IC-FAU-DPAP/MAE, 012-2014-FAU-MAE-DPAO-PNY y 004-IC-FAU-DPS/NA del Ministerio del Ambiente a Stella de la Torre.*

## RESUMEN

El tití pigmeo o leoncillo (*Callithrix pygmaea*), es la especie de primates platirrinos más pequeña. Habita en bosques siempre verdes de tierras bajas inundables de la Amazonía de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil. Aunque todas las especies de primates en el Ecuador están amenazadas por las actividades humanas, ésta es una de las más vulnerables, debido a su tamaño reducido y a la especificidad de su alimentación y hábitat. Considerando su área de distribución y los problemas de fragmentación de los bosques, junto con el tráfico ilegal de mascotas, la población de *C. pygmaea* se ha visto seriamente afectada, por lo que actualmente ha sido incluida en la lista de especies vulnerables en el Ecuador. El objetivo de esta investigación fue determinar los niveles de estrés a los que están sometidas tres poblaciones de leoncillos del oriente ecuatoriano debido a los factores mencionados anteriormente. Como indicador del nivel de estrés se usó el contenido de cortisol en heces de leoncillos. Se analizaron 92 muestras de las poblaciones del Puyo, Tiputini y San Pablo de las cuales 52 fueron incluidas para los análisis estadísticos. Se determinó diferentes niveles de estrés en las tres poblaciones (ANOVA,  $p=0.00033$ ). La población de Puyo es la que presentó mayor nivel de estrés en comparación con Tiputini y San Pablo (Tukey  $p=0.0043848$  y  $p=0.0006135$ ) respectivamente. El método no invasivo de determinación de los niveles de cortisol en muestras de heces, parece ser una técnica confiable, sin embargo para mayor confiabilidad de los resultados sería conveniente complementar la información respecto de las horas de colección de la muestra, el sexo, la edad del individuo y sus actividades previas.

## ABSTRACT

The pigmy marmoset or leoncillo (*Callithrix pygmaea*) is the smallest known platyrrhine primate species. It lives only in gallery forests in the Upper Amazon basin of Colombia, Ecuador, Peru and Brazil. Although, all the species of primates in Ecuador are threatened by human activities, pigmy marmoset is the most vulnerable, due to its limited size and the uniqueness of its diet and habitat. Considering the area of distribution, the fragmentation of the forests, and the illegal traffic of pets, the populations of *C. pygmaea* have been seriously affected. As a result, this primate, has been included in the list of vulnerable species in Ecuador. The objective of this research project was to determine the levels of stress to which 3 populations of leoncillos from the eastern zone of Ecuador are subjected due to the previously mentioned factors. As an indicator of the level of stress, cortisol content in feces was used. A total of 92 samples were analyzed corresponding to the populations of Puyo, Tiputini and San Pablo, from which only 52 were included for the statistical analyses. Different levels of stress were determined among the three populations (ANOVA,  $p=0.00033$ ). The population from Puyo was the one with the highest level of stress in comparison with the populations from Tiputini and San Pablo (Tukey  $p=0.0043848$  and  $p=0.0006135$ ) respectively. The non-invasive method to determinate the levels of cortisol in the feces samples, seems to be a reliable and safe technique; nevertheless, for a major reliability of the results it would be suitable to enhance the information about the time of collection of the sample, the sex, the age and the previous activities of the individuals.

## Tabla de contenido

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>13</b>
1.1	Características generales de la especie en estudio	13
1.2	Hábitat y alimentación	13
1.3	Comportamiento	15
1.4	Importancia ecológica y vulnerabilidad	15
1.5	Fragmentación de los bosques, pérdida de biodiversidad y estrés	16
1.6	Estrés y respuesta al estrés	17
1.7	Cortisol	19
1.8	Factores que modifican los niveles de cortisol	19
1.9	Métodos para medir el estrés	21
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>24</b>
2.1	Objetivo general	24
2.2	Objetivos específicos	24
<b>3</b>	<b>Justificación</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Área de estudio</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Materiales</b>	<b>28</b>
5.1	Recolección de muestras de heces	28
5.2	Extracción y medición de cortisol en partir de muestras de heces de leoncillos	28
<b>6</b>	<b>Métodos</b>	<b>29</b>
6.1	Descripción de las poblaciones en estudio	29
6.1.1	Población del Puyo (“Yanacocha”), provincia de Pastaza	29
6.1.2	Población de San Pablo, provincia de Sucumbíos	29
6.1.3	Población Tiputini, provincia de Orellana	29
6.2	Recolección de muestras de heces	30
6.2.1	Recepción de muestras de las poblaciones silvestres (Tiputini y San Pablo):	30
6.2.2	Recolección de muestras de la población en cautiverio (Puyo):	30
6.3	Extracción de cortisol a partir de muestras de heces	30
6.4	Preparación de diluciones para la curva estándar	31
6.5	Ensayos enzima inmunoanálisis (ELISA) para la medición de cortisol en heces	31
6.6	Determinación de la curva estándar y medición de concentración de cortisol en muestras	32
6.7	Validación biológica del protocolo de cuantificación de cortisol	33
6.8	Determinación de los niveles de cortisol a partir de muestras con un peso seco estandarizado de 0.07g	33
6.8.1	Análisis de muestras con peso estandarizado	33
6.8.2	Determinación de niveles de cortisol según el sexo, la hora de colección y la forma de vida de los leoncillos	34
6.9	Análisis estadísticos	34
<b>7</b>	<b>Resultados</b>	<b>34</b>
7.1	Muestras de heces de leoncillos obtenidas a partir de las poblaciones de Tiputini, Puyo y San Pablo de la Amazonía ecuatoriana	34
7.2	Validación biológica	35
7.3	Valores de cortisol en muestras de heces con pesos normalizados	35

7.4	Variación en las concentraciones de cortisol en muestras de heces de acuerdo al sexo y hora de colección.....	36
7.5	Variación interpoblacional en las concentraciones de cortisol.....	37
<b>8</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>38</b>
<b>9</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>45</b>
<b>11</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>46</b>
<b>12</b>	<b>Tablas .....</b>	<b>52</b>
<b>13</b>	<b>Figuras.....</b>	<b>61</b>
<b>14</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>65</b>

## Índice de Tablas

<i>Tabla 1.</i> Número total de muestras colectadas de heces de leoncillos. ....	52
<i>Tabla 2.</i> Concentración de cortisol en muestras de heces de leoncillos analizadas. Las muestras representan un rango de peso de muestra fecal seca entre 0.05 y 0.1g. ....	53
<i>Tabla 3.</i> Validación biológica del protocolo de extracción usando un individuo (PY1) cuyas características eran conocidas. Las muestras fueron rotuladas de acuerdo a la fecha de colección de la muestra, siendo PY1.1 la muestra más lejana a la muerte del individuo y PY1.3 la más cercana. ....	54
<i>Tabla 4.</i> Concentración de cortisol en muestras de heces de leoncillos con peso seco de 0.07g. ....	55
<i>Tabla 5.</i> Concentración de cortisol en muestras de heces de individuos de <i>Callithrix pygmaea</i> de los que se conoce el sexo, la posible edad, las actividades previas a la colección de la muestra, y la hora de colección. Peso de muestra fecal de 0.07g. ....	57
<i>Tabla 6.</i> Valores promedio y desviación estándar de las 3 poblaciones analizadas de leoncillos. ....	58
<i>Tabla 7.</i> Análisis de varianza ANOVA de las poblaciones de San Pablo, Tiputini y Puyo. ....	59
<i>Tabla 8.</i> Análisis de Tukey de separación de medias entre las poblaciones de San Pablo, Tiputini y Puyo. (Pob.1= Tiputini, Pob.2 = San Pablo, Pob.3 = Puyo). ....	60

## Índice de Figuras

<i>Figura 1.</i> Mapa de distribución de las tres poblaciones de <i>Callithrix pygmaea</i> en estudio (San Pablo, Tiputini (4 grupos – T1, T2, T3, T5) y Puyo).....	61
<i>Figura 2.</i> Mapa de las poblaciones de Tiputini: T1, T2, T3 y T5. ....	62
<i>Figura 3.</i> Gráfica de dispersión de los niveles de cortisol encontrados en las tres poblaciones de leoncillos (San Pablo, Tiputini y Puyo).....	63
<i>Figura 4.</i> Diagrama de cajas de las poblaciones en estudio (Tiputini, Puyo y San Pablo). Se observa una predominancia de los valores de cortisol en la población del Puyo (Pob. 3) versus las otras dos poblaciones (Pob. 1= Tiputini, Pob. 2= San Pablo). ....	64

## Índice de Anexos

<i>Anexo 1.</i> Volumen requerido para la preparación de los stocks para la curva estándar que se utilizó en cada uno de los ensayos realizados en el estudio. ....	65
<i>Anexo 2.</i> Volumen requerido para la preparación de los puntos para la curva estándar, estos valores son establecidos por el kit Oxford Biomedical “Cortisol EIA kit” .....	65
<i>Anexo 3.</i> Valores de concentración de ng cortisol/g muestra, del primer grupo de muestras analizadas en este estudio.....	66
<i>Anexo 4.</i> Valores de concentración de ng cortisol /g muestra, del pool de muestras analizado.....	69
<i>Anexo 5.</i> Valores de concentración ng cortisol/g muestra, del segundo y tercer grupo de muestras analizadas en este estudio.....	69
<i>Anexo 6.</i> Valores de concentración de ng cortisol/g muestra, de todas las muestras analizadas de los tres grupos de leoncillos. En esta tabla se muestran todas las muestras de las cuales se calculó la concentración de cortisol, sin excluir las muestras que se encontraban fuera del rango 0.05 – 0.1g. ....	71

## **1 Introducción**

### **1.1 Características generales de la especie en estudio**

*Callithrix pygmaea*, conocido también como leoncillo o tití pigmeo, pertenece a la familia Cebidae y a la subfamilia Callitrichinae. El género *Callithrix* se divide en tres grupos: *C. argentata*, representado por especies que habitan la sabana brasilera; *C. jacchus*, que habitan el bosque del Atlántico; y *C. pygmaea*, que habita en la cuenca alta del Amazonas (Tagliaro et al., 2000)

Los leoncillos son los primates más pequeños de América del Sur. Tienen el cuerpo de color leonado y la cabeza dorada grisácea semejante a la melena de un león. Crecen hasta 136 mm, con una longitud de la cola de 202 mm y pesan entre 126 y 130g (Bairrao, 2010).

La estructura social es de grupos familiares monógamos con camadas 2 crías, aunque excepcionalmente pueden ser hasta cuatro. El destete de las crías se produce a los 3 meses y son totalmente independientes a los cinco meses. La gestación dura de 130 a 143 días. Las hembras en el medio natural tienen su primera camada (generalmente gemelos) a los 24 meses, y el intervalo entre camadas es de 5 a 7 meses. El estro postparto se produce tres semanas después del parto. El tamaño del grupo es por lo general de 6 individuos, pudiendo variar entre 2 y 9 en su medio natural (Bairrao, 2010; de la Torre et al. 2009).

### **1.2 Hábitat y alimentación**

Los leoncillos habitan en bosques siempre verdes de tierras bajas inundables de la Amazonía de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil (de la Torre et al., 2009). En Ecuador habitan en los bosques tropicales de la Amazonía, entre 200 y 940 msnm aunque con frecuencia están por debajo de los 400 metros (Boada, 2011). Estos

primates tienen una fuerte especialización de hábitat, se los encuentra solo en bosques de galería a orillas de ríos y lagunas (de la Torre et al. 2009), aunque ciertos autores sugieren también que tienen preferencia por hábitats borde (Defler, 2004).

Los leoncillos se encuentran generalmente en ciertos árboles como *Quararibea rhombifolia*, *Vochysia lomatophylla*, *Trichilia* y *Spondias mombin*. Se alimentan principalmente de los exudados de estas especies de árboles y artrópodos (Townsend, 2001). Sin embargo, tienen preferencias por ciertas especies de árboles dependiendo del lugar en el que se encuentran las poblaciones; en el caso del Ecuador, las especies más comunes de las cuales se alimentan son *Sterculia apetala*, *Cedrela odorata*, *Inga marginata*, *Colubrina arborescens* y *Parkia balslevii* (Yépez et al. 2005). Los leoncillos hacen agujeros en la corteza de los árboles y los revisitan cada día para procurar un suministro constante de exudado (Bairrao, 2010). Las frutas, flores y su néctar conforman una pequeña parte de su dieta. Al ser la abundancia de estas especies de árboles proporcional a la presencia y distribución de los leoncillos, su disponibilidad es esencial para la supervivencia de estos monos (Townsend, 2001). Cambian regularmente de territorio, dependiendo de la disponibilidad de exudados. Aunque normalmente no se alimentan a nivel del suelo, pueden bajar de los árboles para capturar saltamontes (Bairrao, 2010).

Los leoncillos ocupan áreas que varían desde cerca de 0.1 ha hasta 0.5 ha, con un promedio de alrededor de 0.3 ha. Realizan recorridos diarios de 200 a 300 m. El presupuesto de actividades calculado para esta especie corresponde a 41% del tiempo de descanso, 11% moviéndose, 32% alimentándose de exudados y 16% alimentándose de insectos (para un total de alimentación de 48%). Una pareja sexualmente activa invierte 68% de su tiempo descansando y acicalándose, y solo cerca del 30% de tiempo alimentándose (Defler, 2004)

### 1.3 Comportamiento

Son animales diurnos y arborícolas. Su locomoción es muy similar a la de una ardilla, es decir cuadrúpeda, trepan verticalmente y dan saltos (hasta de 5 metros), y se muestran siempre muy nerviosos con numerosas y frecuentes paradas y partidas erráticas e impredecibles (Bairrao, 2010). Adoptan un comportamiento de “congelamiento de movimiento” posiblemente como estrategia anti-depredadora, puesto que estos animales son difíciles de ver cuando no están en movimiento. Habitualmente y quizá con el propósito de esconderse de los observadores o depredadores, se mueven hacia el lado opuesto del tronco o rama en que se encuentran (Defler, 2004)

Las horas pico para mejor observación de los leoncillos son: en la mañana, de 06h00 a 9h00 y en la tarde, de 15h00 a 18h00, horarios en los que presentan mayor actividad, principalmente, alimentación de exudados (Yépez et al. 2005).

### 1.4 Importancia ecológica y vulnerabilidad

El papel de los primates es importante para mantener la estructura y la dinámica de los ecosistemas. Son además un eslabón importante en la cadena trófica, ayudando a la regulación de poblaciones de insectos (de la Torre et al. 2009).

Aunque todas las especies de primates en el Ecuador están amenazadas por las actividades humanas, *C. pygmaea* es una de las más vulnerables, debido a la especificidad de su alimentación y hábitat (de la Torre et al., 2005). Es por esta razón que en el 2011 fue incluida en la lista de especies vulnerables de mamíferos del Ecuador (Tirira, 2011).

Las aves de rapiña, los felinos pequeños, las serpientes que suben a los árboles y algunos primates como los capuchinos, son depredadores comunes de los leoncillos (de la Torre & Rylands, 2008).

Los leoncillos han sido populares como mascotas. Esta especie se encuentra incluida en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas (CITES) lo que indica que el comercio internacional de esta especie debe ser monitorizado cuidadosamente (de la Torre & Rylands, 2008)

### **1.5 Fragmentación de los bosques, pérdida de biodiversidad y estrés**

En todo el mundo, el crecimiento de las poblaciones humanas y las presiones económicas están llevando a una extendida conversión de los bosques –entre ellos los bosques tropicales– en un mosaico de hábitats alterados y remanentes aislados. La reducción y fragmentación de estos hábitats naturales, representa sin duda una de las amenazas más frecuentes y ubicuas para la conservación de la biodiversidad (Vegas-Carrilo, 2008).

Los primates son especialmente vulnerables a los efectos de la fragmentación del hábitat. El 90% de sus poblaciones está asociado a la distribución de las selvas (IUCN, 2007), de manera que la destrucción y fragmentación de este ecosistema ha sido una de las causas principales del declive mundial de este grupo de mamíferos (Vegas-Carrilo, 2008).

La fragmentación del bosque tiene múltiples consecuencias para los primates, además de las restricciones espaciales a sus actividades, la reducción de la disponibilidad de alimentos, la alteración de la demografía y la dinámica de la población, aumentan la susceptibilidad a enfermedades, desequilibrando la homeostasis de los individuos y resultando en estrés (Rangel-Negrin et al. 2009).

Los efectos de la fragmentación en los leoncillos son difíciles de predecir. Teniendo en cuenta las pequeñas áreas de distribución de los grupos, por lo general de menos de una hectárea, se puede esperar que los leoncillos resisten relativamente altos

niveles de fragmentación. Sin embargo, se ha reportado que la fragmentación puede causar un comportamiento "nómada" de las poblaciones, los grupos ocupan pequeñas áreas núcleo por períodos cortos, moviéndose continuamente entre ellas. Este nuevo comportamiento puede estar relacionado con la escasez de fuentes de exudado, cuando las áreas núcleo contienen fuentes de exudado viejas, los leoncillos se ven obligados a moverse. Además algunos estudios sugieren que la fragmentación del hábitat puede estar afectando a la dispersión de las poblaciones e influye en la variabilidad genética de los grupos (de la Torre et al. 2013).

## **1.6 Estrés y respuesta al estrés**

Estrés es el estado en el que la homeostasis de un individuo se ha perdido debido a factores ambientales como las temperaturas extremas o factores fisiológicos como la escasez de agua y/o alimento, y factores psico-sociales como peleas, subordinación social o carencia de control sobre una situación dada (Álvarez & Arias, 2005).

La acción de estímulos nerviosos y emocionales provocados por el ambiente sobre los sistemas nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo de un animal, produce cambios medibles en los niveles funcionales de estos sistemas. Esto altera la homeostasis interna induciendo cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical-HPA (Romero et al., 2011).

De acuerdo con la duración y sus efectos, el estrés puede ser agudo (transitorio) o crónico (de largo efecto). En cualquier caso, una vez que el sistema nervioso central percibe una amenaza, se desarrolla una respuesta que consiste en una combinación de las cuatro respuestas generales de defensa biológica: comportamiento, sistema nervioso autónomo, inmune y neuroendócrino. A pesar de que las cuatro respuestas de defensa biológicas están disponibles para que el animal responda a un factor estresante, no todas las cuatro son necesariamente utilizadas contra todos los factores de estrés. En particular,

la homeostasis se mantiene cuando solo las dos primeras respuestas (el comportamiento y el sistema nervioso autónomo) están involucradas. Por el contrario, cuando las cuatro respuestas se ven implicadas, algunas de las funciones biológicas pueden verse modificadas adversamente y los animales estarán en peligro de sufrir estrés crónico (Romero et al., 2011).

La respuesta inicial frente al estrés, mediada por la parte simpática del sistema nervioso autónomo, implica la secreción de catecolaminas desde la médula adrenal (Brousset et al., 2005). Estas moléculas, que facilitan un estado general de la excitación y la vigilancia, tienen efectos fisiológicos de amplio alcance que incluyen un aumento en la frecuencia cardíaca, y los cambios en la constricción arteriolar que funcionan para desviar la sangre hacia músculos en ejercicio (Muller & Wrangham, 2004).

La respuesta secundaria de estrés implica un aumento en la concentración de glucocorticoides circulantes, esteroides de 21 carbonos producidos por la corteza suprarrenal bajo la estimulación de ACTH (hormona adrenocorticotrópica) de la pituitaria. Este incremento se produce a los pocos minutos del inicio de un factor estresante (Muller & Wrangham, 2004).

Un agente estresante o estresor es aquel que produce una variación del estado interno considerado como óptimo en el animal. Utilizando esta aproximación podríamos identificar la existencia de estados estresantes en organismos biológicos a través de la reacción a estresores específicos, y de esta forma, medir la intensidad del estrés inducido por medio de la extensión de la reacción fisiológica producida (Menargues, 2011).

La respuesta al estrés es fisiológicamente costosa y puede tener efectos negativos sobre los procesos esenciales del cuerpo cuando se da durante períodos prolongados. El

estrés además puede afectar tanto a la aptitud individual como a la viabilidad de la población (Rangel-Negrin et al., 2009).

## **1.7 Cortisol**

En la mayoría de los mamíferos el principal glucocorticoide es el cortisol, éste junto con otros corticosteroides son transportados en la sangre de manera libre o unidos a globulinas específicas. Su catabolismo se lleva a cabo principalmente en el hígado, aunque también ocurre en el riñón, tejido conectivo, fibroblastos y músculo. En el intestino estos metabolitos pueden ser reabsorbidos por la circulación enterohepática, desconjugados y separados por las bacterias de la flora intestinal, y eliminados por las heces (Brousset et al., 2005).

No es posible predecir el tipo de metabolito que predominará en cada especie, por ejemplo, entre los primates el cortisol está presente en las heces de chichicos y marmosetas (*Saguinus* spp. y *Callithrix* spp.), pero no ha sido detectado en papiones (*Papio* sp.), macacos (*Macaca* sp.) y chimpancés (*Pan troglodytes*), por esta razón es necesario identificar la ruta de excreción más importante del cortisol en la especie de interés (Brousset et al., 2005).

## **1.8 Factores que modifican los niveles de cortisol**

Las variaciones individuales de los niveles de estrés relacionadas con el sexo, condiciones reproductivas o condición social tienen efectos demostrados sobre los perfiles de cortisol de las especies de primates estudiadas. El estado reproductivo de un animal, que también puede afectar los niveles de estrés, puede muy bien afectar a los niveles de cortisol en heces y se debe considerar en la evaluación de cortisol fecal (Keay et al., 2006).

Un estudio demostró que los machos tienen niveles de cortisol significativamente mayores en comparación con las hembras. Se sabe que en cautividad los machos de algunas especies de primate, por ejemplo *Ateles geoffroyi*, tienen niveles de cortisol significativamente mayores en comparación con las hembras (Rangel-Negrin et al., 2009). En cuanto a la diferencia sexual: las hembras en cautiverio pueden ser menos fértiles, y así el cortisol, y las hormonas reproductivas, pueden ser muy bajos. Sin embargo estudios realizados en especies de la subfamilia Callithrichidae, *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* y *Callithrix kuhlli*, muestran que existe una variación significativa en los niveles de cortisol de las hembras, principalmente aquellas en embarazo. Los estudios indican que durante el primer trimestre de embarazo los niveles de cortisol son inferiores y luego se produce una subida significativa de dichos niveles en el tercer trimestre (Ziegler et al. 1995; Ziegler & Sousa, 2002; Bales et al. 2005).

La proximidad de los primates a los seres humanos y los cambios en la organización social tiene un impacto importante en el estrés. La disponibilidad de alimentos puede ser un factor de estrés importante en primates. Las diferencias estacionales también pueden influir en las concentraciones de cortisol debido a las fluctuaciones naturales en la disponibilidad de alimentos (Rangel-Negrin et al., 2009). Estudios muestran que los primates que viven en áreas expuestas regularmente a grupos de turistas presentan mayores niveles de cortisol, en comparación con aquellos que experimentan contacto humano limitado. El comportamiento de los turistas y los guías es mucho más intrusivo que el de los investigadores, ya que los turistas hacen más ruido y los guías golpean en los árboles, en un intento de poder observar los primates (Behie et al., 2010).

Varios factores pueden explicar por qué los primates que viven en cautiverio se enfrentan a varios trastornos a sus patrones de conducta naturales y las condiciones

ecológicas que pueden aumentar el estrés (Rangel-Negrin et al. 2009). El estrés interfiere en el desarrollo de comportamientos naturales tan importantes como la reproducción (Álvarez & Arias, 2005). La presencia continua de los seres humanos, la provisión artificial de los recursos alimentarios, los cambios en los patrones de agrupamiento, y las perturbaciones ambientales, tales como eventos ecológicos o sociales pueden alterar la homeostasis de los primates, lo que lleva a que se los considere como estresores importantes (Rangel-Negrin et al., 2009).

Se sabe que la dieta que consume un primate puede tener un efecto sobre los niveles de cortisol y de metabolitos excretados en las heces. La dieta en sí también puede afectar a la excreción de glucocorticoides. Una dieta alta en fibra puede resultar en un aumento del tiempo de tránsito intestinal, lo que podría resultar en menos tiempo para la reabsorción de glucocorticoides (Keay et al., 2006).

## **1.9 Métodos para medir el estrés**

Existe una variedad de parámetros de comportamiento, fisiológicos, bioquímicos, inmunológicos y patológicos que han sido propuestos para evaluar la capacidad de respuesta de los animales ante el estrés. Dentro de los biomarcadores sobresalen la medición de cortisol y progesterona, las concentraciones de albúmina plasmática, úrea, globulina, proteínas totales, entre otras. Estas variables se utilizan como indicadores de estrés, especialmente cuando se están comparando valores previos y posteriores a un determinado manejo que se cree induce estrés (Romero et al., 2011).

De forma creciente, los niveles de glucocorticoides están siendo usados en estudios de ecología y biología de la conservación como indicadores de estrés fisiológico en vertebrados en libertad. Se asume que la amplitud de la respuesta de estrés se correlaciona con la salud del animal y, por extensión, con el estado de la población. Por tanto, los niveles de cortisol pueden ser usados como biomarcadores para

reflejar los efectos combinados de la salud, las limitaciones fisiológicas, la asignación de energía, la calidad de hábitat y determinadas alteraciones antropogénicas a diferentes escalas ecológicas (Romero, 2004).

El cortisol, a pesar de su variabilidad y corta vida, es uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar el estrés experimentado por animales. El cortisol puede ser medido en sangre, saliva, orina y heces. Mostrando cada uno de estos fluidos diversas ventajas y desventajas (Romero et al., 2011).

La sangre es la muestra más usada para estudios de estrés y proporciona una medición directa de cortisol, sin embargo es un método invasivo que puede alterar las concentraciones de cortisol al momento de tomar la muestra (Romero et al., 2011). Tradicionalmente, los glucocorticoides se han medido en el plasma sanguíneo; las principales ventajas de este método derivan de su elevada precisión, ya que mide las concentraciones hormonales proporcionales a las que reciben los tejidos, y de su capacidad para permitir hacer medidas seriadas sobre un mismo individuo (Harper & Austad, 2000).

Sin embargo, en el caso de animales en libertad, la captura y manejo de los mismos para obtener las muestras de sangre genera un estrés adicional que falsearía la información real de partida (Harper & Austad, 2000). Este manejo puede también ocasionar diversos efectos negativos sobre el individuo objeto del estudio tanto durante como después de la captura, lo cual podría poner en peligro su integridad (Vegas-Carrilo, 2008).

La saliva por otro lado, es un método no invasivo y el cortisol se encuentra presente en forma libre, sin embargo dentro de las desventajas se debe considerar que la concentración del mismo es un 10% menor al valor en sangre, puede haber problemas

de contaminación con alimentos y una baja sensibilidad y especificidad de la técnica usada para la medición (Romero et al., 2011).

Actualmente, son más los investigadores que realizan los análisis hormonales a partir de orina (Ziegler *et al.*, 1995) y, especialmente, de heces procedentes de animales en libertad. Estos métodos no invasivos, tales como la medición de los glucocorticoides en las heces, son deseables porque los animales no necesitan ser capturados, y se pueden obtener varias muestras de los individuos sin alterar su comportamiento o estado endocrino (Goymann et al., 1999).

Los glucocorticoides excretados proporcionan una mejor imagen del estrés total que los glucocorticoides en sangre, pues se ven menos afectados por fluctuaciones episódicas o por la pulsatilidad de la secreción hormonal y reflejan además la secreción acumulativa de varias horas (Harper & Austad, 2000).

En particular, la recolección de muestras fecales es más factible para la valoración de esteroides de animales en libertad que las muestras de orina, ya que son más fácilmente identificables y manipulables. Por ello, los estudios sobre niveles de estrés de animales en libertad, se llevan a cabo más frecuentemente a partir de heces (Vegas-Carrilo, 2008).

Los análisis básicos para detectar compuestos químicos en materiales biológicos son tres: biológicos, fisicoquímicos y de unión. Los análisis o técnicas de unión se han definido como aquellos que utilizan moléculas que se enlazan específica y reversiblemente a las sustancias que interesen detectar o cuantificar (Montes-Pérez, 1995).

Los ensayos inmuno enzimáticos son técnicas que combinan la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de un ensayo enzimático. Esta técnica es utilizada para

medir tanto antígenos como anticuerpos de manera cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa. Los ensayos ELISA son métodos analíticos que dependen de la reacción antígeno-anticuerpo, lo que permite que se determine la concentración de un antígeno o de un anticuerpo, mediante el uso de uno de ellos inmovilizado en fase sólida y el otro en solución. El producto de la reacción puede ser detectado y cuantificado mediante un marcador enzimático con un sustrato apropiado (Fernández, 2007). Se pueden agrupar en dos clases, de acuerdo al proceso de unión. Cuando el ligador enlaza al ligando sin que ocurra desplazamiento de la unión del trazador con el anticuerpo, se denomina inmunoanálisis no competitivo; por ejemplo, los ensayos de inmunoadsorción con enzima ligada (ELISA). Por otro lado si al unir el ligando ocurre desplazamiento del trazador, entonces son inmunoanálisis competitivos, tal como ocurre con el RIA, EIA o FIA para cuantificar hormonas (Montes-Pérez, 1995).

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

- Evaluar los niveles de cortisol en tres diferentes poblaciones de leoncillos (*Callithrix pygmaea*) de la Amazonía ecuatoriana mediante pruebas de enzima inmunoanálisis (EIA), para relacionarlos con los niveles de estrés a los que se encuentran sometidos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estandarizar el protocolo de extracción de cortisol a partir de muestras de heces de leoncillos
- Estandarizar el protocolo de cuantificación de las concentraciones de cortisol en muestras de heces

- Determinar las concentraciones de cortisol en muestras de heces de leoncillos en cautiverio y leoncillos silvestres.
- Relacionar los niveles de cortisol con la influencia de factores ambientales y antropogénicos

### **3 Justificación**

Los primates son un patrimonio natural único para las presentes y futuras generaciones. Sin embargo, a pesar de su importancia y de las graves amenazas antropogénicas que los afectan, como la pérdida de hábitat, la cacería y el tráfico de animales vivos, los primates ecuatorianos han recibido poca atención por parte de la comunidad científica nacional e internacional (de la Torre, 2010).

Los leoncillos son los monos más pequeños de la Amazonía. Habitan en la cuenca del alto Amazonas de Ecuador, Colombia, Perú, Bolivia y Brasil. Su especialización de hábitat en bosques de galerías a orillas de ríos y lagunas los hace particularmente vulnerables a los impactos antropogénicos, ya que los asentamientos y actividades humanas se centran en los hábitats ribereños (de la Torre et al. 2009).

Por lo tanto, y a pesar de la relativamente amplia distribución de los leoncillos en el este del Ecuador, existe una creciente evidencia de que esta especie está severamente perturbada por las actividades humanas, lo que lleva a una alteración de su comportamiento social y, posiblemente, a una reducción de su tamaño poblacional (de la Torre et al. 2013). Se ha encontrado evidencia de que el grado de impacto tiene una relación directa con las actividades humanas como tala y agricultura, y las densidades de leoncillos tienden a ser menores en zonas más impactadas. La destrucción y fragmentación de los bosques de galería para la agricultura y ganadería, el aumento del

ruido ambiental y de tráfico humano, la cacería y la captura de animales vivos para el mercado de mascotas son factores que afectan negativamente a las poblaciones de esta especie (de la Torre, 2010).

Debido a los posibles efectos perjudiciales del estrés crónico, existe un gran interés en la medición de estrés en los animales. Los biólogos conservacionistas a menudo se refieren a efectos de las condiciones ambientales y las perturbaciones provocadas por el hombre en la vida silvestre (Millspaugh & Washburn, 2004). El rápido proceso de transformación y fragmentación de los bosques tropicales está forzando a una gran cantidad de poblaciones de primates en libertad a ocupar un paisaje cada vez más humanizado. Para conservar estas especies es fundamental, por tanto, conocer cuáles son las causas y los procesos por los que se ven amenazadas en este nuevo medio. Dados los efectos negativos que el estrés puede provocar sobre la salud y la reproducción de múltiples organismos, resulta de mayor interés en ecología y biología de la conservación, determinar hasta qué punto la fragmentación puede provocar estrés en las poblaciones de primates (Vegas-Carrilo, 2008).

La evaluación de glucocorticoides a partir de muestras obtenidas en forma no invasiva ha abierto la posibilidad de llevar a cabo estudios en poblaciones en cautiverio de mamíferos, sobre el estrés y el impacto de diferentes estímulos. Esta evaluación se ha utilizado para valorar respuestas a cambios en el tipo de manejo, la introducción de nuevos animales, manipulaciones ambientales, transporte, reubicación, procedimientos veterinarios o de reproducción asistida (Brousset et al., 2005).

En este contexto, este estudio para evaluar el impacto de la fragmentación y el cautiverio sobre el nivel de estrés de los leoncillos conduce a generar información objetiva que permita mejorar los programas de conservación y manejo de la especie.

#### 4 Área de estudio

Este proyecto analiza la variación de la concentración de cortisol en tres poblaciones de *Callithrix pygmaea*: Puyo, Tiputini y San Pablo, ubicadas en la Amazonía del Ecuador. Las poblaciones fueron muestreadas entre Marzo del 2011 y Junio del 2014. Las muestras de heces fecales de la población del Puyo, fueron colectadas en Junio del 2013, Diciembre del 2014 y Mayo del 2014; las muestras de la población de San Pablo fueron colectadas en Marzo y Abril del 2011; y, finalmente, las de la población del Tiputini (grupos T1, T2, T3 y T5), fueron colectadas en Junio, Septiembre, Diciembre del 2012; Enero y Febrero del 2013 y Mayo y Junio del 2014.

El área de la población San Pablo se encuentra ubicada a orillas del río Aguarico (UTM, 18 Zona, Datum PSAD 341767 E, 9969737 N). La localidad de San Pablo tiene una altitud de 260 msnm y originalmente estuvo cubierta de bosque varzea (Figura 1).

El área de estudio de la población del centro de rescate Yanacocha del Puyo, se encuentra ubicada en el kilómetro 3 de la vía al Tena, en el barrio de las Américas. Localizado en las coordenadas: 9838712 N - 167707 E , en la Provincia de Pastaza, en el Cantón Pastaza, en la Parroquia Puyo (Figura 1).

Finalmente el área de estudio del Tiputini, se encuentra en la Amazonía norte del Ecuador en la provincia de Orellana, a orillas del río Tiputini. Las coordenadas de referencia del grupo T1 fueron 9929379 N - 371669 E, según el sistema de coordenadas UTM. Las coordenadas del grupo T2 fueron 9930965 N - 371147 E, UTM, las coordenadas del grupo T3 fueron 9929278 N - 371986 E UTM, y finalmente las coordenadas del grupo T5 fueron 371563 E - 9930213 S UTM. El grupo T3 se encuentra hacia el sur del río Tiputini, mientras que T1 y T2 se encuentran hacia el norte, separados por una distancia de alrededor de 1.67 Km (Figura 2).

La extracción de cortisol proveniente de heces y los análisis enzimáticos, así como estadísticos, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), campus Cumbayá.

## **5 Materiales**

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

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

### **5.2 Extracción y medición de cortisol en 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 <sup>TM</sup>)

- Cámara de flujo laminar (Labconco <sup>TM</sup>)
- Micro centrifuga (Eppendorf <sup>TM</sup>)
- Lector de microplatos DYNEX MRX (Dynex Technologies <sup>®</sup>)

## **6 Métodos**

### **6.1 Descripción de las poblaciones en estudio**

#### **6.1.1 Población del Puyo (“Yanacocha”), provincia de Pastaza**

Es una población en cautiverio que se encuentra en el centro de rescate de vida silvestre Yanacocha. Actualmente consta de un grupo de 12 individuos, que habitan dentro de una jaula amplia con vegetación, separada varios metros del sendero por el que circula la gente.

Las muestras de los individuos identificados fueron rotuladas con la nomenclatura PY1.1, PY1.2 y PY1.3.

Las muestras de los individuos no identificados, por otro lado, fueron rotuladas a partir de PY2.

#### **6.1.2 Población de San Pablo, provincia de Sucumbíos**

Los individuos de esta población se encuentran expuestos a actividades humanas que incluyen un alto grado de fragmentación de los bosques. Las muestras fueron tomadas de un grupo de 6 individuos, la nomenclatura para estos individuos fue SP y el número de muestra correspondiente.

#### **6.1.3 Población Tiputini, provincia de Orellana**

La población de leoncillos del Tiputini está menos expuesta a actividades humanas. Las muestras de heces fueron tomadas en 4 grupos diferentes, y recibieron la nomenclatura dependiendo del grupo al que pertenecían. En el caso del grupo 1, la

nomenclatura fue T1 y el número correspondiente a cada muestra empezando desde 1, para el grupo 2 la nomenclatura fue T2 y el número correspondiente a cada muestra empezando desde 1, para el grupo 3 la nomenclatura fue T3 y el número correspondiente a cada muestra empezando desde 1, y para el cuarto grupo la nomenclatura fue T5 y el número correspondiente a cada muestra empezando desde 1.

## **6.2 Recolección de muestras de heces**

### **6.2.1 Recepción de muestras de las poblaciones silvestres (Tiputini y San Pablo):**

Se recibieron las heces de las poblaciones silvestres que fueron colectadas entre el 2011 y el 2014.

### **6.2.2 Recolección de muestras de la población en cautiverio (Puyo):**

En la población en cautiverio de Yanacocha (Puyo), se colectaron las heces en cuanto éstas eran excretadas por los animales en la plataforma de alimentación o en otros lugares de la jaula. Se colocaron las heces recogidas en tubos Eppendorf de 2 mL con alcohol al 96%. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) Campus Cumbayá, y se mantuvieron en un congelador a -20 °C hasta realizar los análisis de laboratorio.

Se utilizaron en total para el análisis 92 muestras (Tabla 1).

## **6.3 Extracción de cortisol a partir de muestras de heces**

Se utilizó el protocolo propuesto por Ziegler y colaboradores (1995). Este protocolo recomienda usar entre 0.05 y 0.1 g de material fecal seco. Sin embargo, debido a que para la mayoría de muestras no existía tal cantidad, se utilizó todo el material disponible, cuyos pesos varió entre 0.01 y 0.13g por muestra.

Se pesó cada muestra en fresco, y se secó en la estufa a 28°C por 6 horas, luego se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación se determinó el peso en seco y se trituró la muestra en un mortero hasta convertirla en polvo fino.

Se repartió equitativamente la muestra en cuatro tubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregó en cada tubo, 625 uL de agua destilada y 625 uL de etanol al 96%.

Se mezcló usando el vórtex por 10 minutos, y se centrifugó a 13200 rpm por 20 minutos.

De cada uno de los 4 tubos de la muestra se pipeteó 25 uL de sobrenadante en un tubo Eppendorf de 0.2 uL para un volumen final de 100 uL.

Se colocaron los tubos abiertos en la cama de arena y se los mantuvo durante 4 horas a 60°C. Esto se hizo dentro de la cámara de flujo laminar, con el flujo de aire encendido.

Se añadió 100 uL de buffer EIA (buffer de extracción) en cada uno de los tubos, se mezcló mediante pipeteo y se centrifugó por pocos segundos.

#### **6.4 Preparación de diluciones para la curva estándar**

Para obtener una curva estándar en la cual basar el análisis de concentración de cortisol, se realizaron diluciones en base al protocolo propuesto por el kit de Oxford Biomedical “Cortisol EIA Kit”. Para estas diluciones se utilizaron concentraciones específicas de cortisol a partir de la solución stock del kit (Anexos 1 y 2).

#### **6.5 Ensayos enzima inmunoanálisis (ELISA) para la medición de cortisol en heces**

El kit usado fue un ELISA para el análisis cuantitativo de los niveles de cortisol en fluido biológico. Este kit opera sobre la base de la competencia entre el conjugado de

la hormona y el cortisol en la muestra para un número limitado de sitios de unión en la placa recubierta de anticuerpos (OBR, n.d.).

Se añadieron 50 uL de las muestras y de las diluciones de cortisol para la curva estándar en los pocillos del microplato por duplicado.

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 (durante la incubación, se lleva a cabo la competencia por los sitios de unión).

Se lavaron los pocillos del microplato, con 300 uL del buffer de lavado por tres veces. (Este lavado tiene la finalidad de retirar todo el material no unido).

Se añadieron 150 uL del sustrato TMB en los pocillos utilizados, y adicionalmente, en dos pocillos vacíos que se consideraron como blancos (al momento de leer el microplato el valor promedio de los blancos es restado automáticamente de cada una de las muestras).

Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se leyó el microplato a 630 nm en el lector DYNEX MRX.

La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de cortisol en la muestra o estándar. Por ejemplo, la ausencia de cortisol en la muestra dará lugar a un color azul brillante, mientras que la presencia de cortisol se traducirá en el desarrollo de color disminuido o ausencia de color (OBR, n.d.).

## **6.6 Determinación de la curva estándar y medición de concentración de cortisol en muestras**

La lectura se realizó a 630 nm en el lector de microplatos DYNEX MRX, cuyo software generó la curva de "Densidad óptica (OD) vs. Concentración de cortisol", y una matriz con el valor exacto de densidad óptica para cada punto, tanto para los puntos de la curva estándar, así como para los puntos de cada muestra y control. Con la curva

estándar se determinó la concentración de cortisol de cada muestra en ng por ml de muestra. Este valor se multiplicó por el factor de dilución de cada muestra.

## **6.7 Validación biológica del protocolo de cuantificación de cortisol**

Para realizar la validación biológica del protocolo de cuantificación de cortisol, se usó un individuo del Puyo identificado (PY1), del cual se conocía el sexo, la edad, la hora de colección de la muestra, las actividades del individuo previas a la deposición y la fecha de la muerte del individuo.

Se colectaron tres muestras (PY1.1, PY1.2 y PY1.3) del individuo conocido que estuvo sometido a altos niveles de estrés (cautiverio). La muestra PY1.1 fue colectada en mayo, la muestra PY1.2 a principios de junio y la muestra PY1.3, que fue la muestra más próxima a la muerte del individuo, se colectó a mediados de junio.

Se analizaron las 3 muestras del individuo identificado, de la misma forma como se indica en el punto 6.4.

## **6.8 Determinación de los niveles de cortisol a partir de muestras con un peso seco estandarizado de 0.07g**

Al observarse una influencia del peso seco de las muestras en los cálculos de los niveles de cortisol, se decidió eliminar la influencia de este factor, eligiéndose un peso que se encontraba dentro del rango propuesto por el protocolo de Ziegler et al. (1995) (0.05 – 0.1g).

### **6.8.1 Análisis de muestras con peso estandarizado**

Se analizaron en total 29 muestras con un peso estandarizado de 0.07g.

### **6.8.2 Determinación de niveles de cortisol según el sexo, la hora de colección y la forma de vida de los leoncillos**

Dentro de las 29 muestras analizadas en este grupo, se conocía la hora de colección, el sexo y la edad aproximada del individuo en 7 de las muestras.

## **6.9 Análisis estadísticos**

Se realizaron diagramas de cajas, análisis de varianza (ANOVA) y prueba de separación de medias de Tukey para comparar las concentraciones de cortisol entre las poblaciones.

## **7 Resultados**

### **7.1 Muestras de heces de leoncillos obtenidas a partir de las poblaciones de Tiputini, Puyo y San Pablo de la Amazonía ecuatoriana**

En total se obtuvieron 92 muestras de heces de leoncillos de tres poblaciones de la Amazonía ecuatoriana. Treinta muestras se colectaron en el Puyo, 12 muestras en San Pablo y las restantes 50 muestras fueron colectadas en el Tiputini (Tabla 1).

Según su disponibilidad, las muestras fueron analizadas en tres grupos diferentes. Primero se analizó un grupo de 57 muestras (Anexo 3), y se observó que los valores más altos de cortisol correspondían a las muestras más pequeñas en peso seco, lo que hizo suponer la ocurrencia de algún sesgo en estas determinaciones.

Para comprobar este posible sesgo relacionado con el peso, se unieron 15 muestras, que no estaban incluidas dentro del estudio. Esta muestra global se subdividió en 4 submuestras con un peso de 0.008, 0.01, 0.05 y 0.09g. Al analizarlos se observó

que se mantenía la tendencia de mayores niveles de cortisol en muestras con menor peso (Anexo 4).

Por este motivo se excluyó del análisis las muestras cuyos valores de peso seco estaban fuera del rango de 0.05 a 0.1g, de acuerdo al protocolo Ziegler y sus colaboradores (1995), quedando por tanto 29 muestras de las 57 del grupo inicial.

Los siguientes dos grupos de muestras que se analizaron constaron en conjunto de 35 muestras, de las cuales quedaron 23 (Anexo 5) luego de excluir las que tenían pesos secos fuera del rango 0.05 – 0.1g.

Entonces, de las 92 muestras colectadas, solo 52 fueron incluidas para los análisis estadísticos. En este grupo, los niveles de cortisol parecían ser más congruentes. Los valores se encontraron entre 867,69 y 239,14 ng de cortisol/g muestra seca (Tabla 2).

## **7.2 Validación biológica**

De las tres muestras analizadas del individuo del Puyo identificado (PY1) se observó el mayor valor para la muestra PY1.3 de 799,44 ng de cortisol/g muestra seca, ésta fue la muestra colectada en la fecha más próxima a la muerte del individuo. La muestra PY1.2 tuvo un valor intermedio 738,61 ng de cortisol/g muestra seca y la muestra PY1.1 presentó el menor valor 365,64 ng de cortisol/g muestra seca (Tabla 3).

## **7.3 Valores de cortisol en muestras de heces con pesos normalizados**

En un intento adicional por visualizar el efecto de las variaciones de cortisol dependiendo del peso de las muestras, se analizaron solo las muestras cuyo peso seco era de 0.07g en adelante (Tabla 4).

Se observó que en este grupo de muestras (29), los valores de los niveles de cortisol presentaron una menor variación en relación a los valores de los niveles de

cortisol de las muestras que se encontraban entre 0.05-0.1g. La concentración de los niveles de cortisol de las 29 muestras analizadas en este grupo, variaron entre 667,60 y 301,10 ng cortisol/g muestra seca.

#### **7.4 Variación en las concentraciones de cortisol en muestras de heces de acuerdo al sexo y hora de colección**

Dentro de las 29 muestras analizadas con un peso de 0.07g, se poseía información de 7 muestras sobre el sexo del individuo, la hora de colección, y el estado en el que se encontraban los individuos (cautiverio o silvestre).

De estas 7 muestras (Tabla 4), 4 muestras pertenecían a hembras adultas y 3 pertenecían a machos adultos. Se observó que las hembras tuvieron niveles de cortisol más altos que los machos, y principalmente aquellas hembras que estaban en cautiverio. Las tres muestras de las hembras del Puyo presentaron como valor máximo 644,57 ng cortisol/g muestra seca, mientras que el valor máximo de la hembra del Tiputini fue de 422,11 ng cortisol/g muestra seca. Comparando estos resultados con los de los machos de ambas poblaciones, el valor máximo de los machos del Puyo fue de 415,02 ng cortisol/g muestra seca (1 muestra), mientras que en el Tiputini fue de 337,45 ng cortisol/g muestra seca (2 muestras). Estos resultados sugieren que en ambos casos (tanto en cautiverio como silvestres) las hembras poseen niveles de cortisol mayores en comparación con los machos. Es necesario mencionar que en el caso de las muestras de las hembras del Puyo, puede tratarse del mismo individuo ya que se describe una actividad previa idéntica (hembras perseguidas) en todas las muestras.

En cuanto a la hora de colección (Tabla 5), se observó que los valores de los niveles de cortisol de las muestras colectadas en la tarde (667,60 ng cortisol/g muestra seca, n= 2 muestras) son mayores a los de la mañana (494,81 ng cortisol/g muestra seca, n= 5 muestras).

## 7.5 Variación interpoblacional en las concentraciones de cortisol

Como se puede observar en la Figura 3, la población del Puyo presentó los niveles de cortisol más elevados, lo que indicaría que esta población en cautiverio se encontraba con un nivel de estrés superior que las dos poblaciones silvestres, también es fácil observar que la población del Tiputini presentó varios picos de cortisol (es decir, el nivel de cortisol de las muestras fue muy variable). Por otro lado, las muestras de San Pablo presentaron una leve tendencia a tener niveles de cortisol menos variables (en un rango de 435,73 – 245,03 ng cortisol/g muestra seca) que las otras dos poblaciones.

Los valores promedio de cortisol obtenidos por población fueron, para Tiputini,  $6.01 \pm 0.26$  ng/g; para la población del Puyo  $6.26 \pm 0.23$  ng/g y para la población de San Pablo  $5.89 \pm 0.22$  ng/g (Tabla 6).

En el análisis del diagrama de cajas, se observó que la caja y los bigotes más largos los presentó la población del Puyo, lo que indicaría que la distribución de los datos en esta población es mucho más dispersa en comparación con los datos de las poblaciones de Tiputini y San Pablo (Figura 4).

El análisis de varianza (ANOVA) para las tres poblaciones indicó que existe una diferencia altamente significativa ( $p = 0.00033$ ) entre las poblaciones (Tabla 7). El test de separación de medias de Tukey, evidenció que la población de Puyo se diferencia significativamente de las poblaciones de Tiputini y San Pablo ( $p = 0.0043848$  y  $p = 0.0006135$  respectivamente) (Tabla 8). Estos resultados sugieren que el cautiverio tiene un efecto significativo sobre los niveles de cortisol (y de estrés) en esta especie de primate.

## 8 Discusión

*Callithrix pygmaea* es una de las especies de primates más amenazada en el Ecuador debido a su tamaño corporal pequeño y a su especificidad de alimento y de hábitat. Las actividades antropogénicas como la construcción de carreteras, viviendas y tala de árboles han reducido seriamente su hábitat (de la Torre et al. 2009).

El impacto humano puede tener repercusiones en el comportamiento, la eficiencia reproductiva y la viabilidad de las poblaciones y puede verse reflejado en los niveles de estrés que estos primates experimentan (de la Torre et al. 2009). Sin embargo, es importante considerar que si bien la influencia de los seres humanos puede aumentar los niveles de estrés en los leoncillos, de forma natural en el ecosistema éstos pueden estar sometidos a condiciones de selección o supervivencia que también influirían en su nivel de estrés (de la Torre et al. 2009). En este contexto, es importante conocer las características de las poblaciones y de los individuos en estudio, saber si están o no relacionados con los humanos para posteriormente poder identificar el factor responsable del estrés.

Entre los objetivos de la presente tesis estuvo el cuantificar los niveles de cortisol en las heces de individuos de la especie *C. pygmaea* que se encuentran en vida silvestre y en cautiverio, y relacionarlos con los niveles de estrés a los que están sometidas las poblaciones. Adicionalmente, se buscaba analizar la influencia del sexo y la hora de deposición de la muestra fecal en los niveles de cortisol presentes en las heces. Para esto se analizaron tres poblaciones de la Amazonía ecuatoriana, Tiputini, Puyo y San Pablo, con diferentes niveles de afectación de sus hábitats. A futuro esta información obtenida, puede permitir tener un parámetro que guíe la adopción de medidas conducentes a controlar las fuentes de estrés en estas poblaciones.

La Amazonía norte del Ecuador es una de las zonas con mayor diversidad biológica

en el mundo y también una de las más afectadas por las actividades humanas. Ecuador tiene una de las tasas de deforestación más altas de Sudamérica y, dentro del país, esta actividad se concentra en la Amazonía norte. La pérdida y fragmentación de los bosques por deforestación es uno de los fenómenos ecológicos más importantes de los últimos tiempos y una de las amenazas más severas para la conservación de la biodiversidad (de la Torre et al. 2013). De las poblaciones de leoncillos estudiadas en el Ecuador desde 1996, la población de San Pablo ha sido considerada una de las más afectadas debido a la destrucción y fragmentación de los bosques, lo cual ha tenido un impacto tanto en el tamaño de la población, como en el patrón de uso de las áreas de distribución de los leoncillos de dicha población (de la Torre et al. 2013). Por otro lado, la población del Puyo es una población en cautiverio, y la población de Tiputini (incluyendo todos sus grupos) se encuentra menos afectada por las actividades humanas.

A lo largo de este estudio fue necesario considerar métodos de validación del protocolo de extracción y cuantificación de cortisol en las heces de leoncillos. Un primer método, validación biológica, consistió en tomar tres muestras de heces de uno de los individuos en cautiverio (PY1), del cual se conocía sus condiciones de vida, sexo, edad, la actividad antes de la colección de la muestra y la hora de deposición. Se esperaba con esto obtener resultados concordantes con las condiciones del animal. En un caso coincidió que pocas horas antes de la muerte de un individuo se colectó una muestra de sus heces, y esta muestra presentó niveles de cortisol elevados pues se esperaba que este hecho eleve la concentración del cortisol. Otra prueba de validación del protocolo de extracción de cortisol, ha sido sugerida por Wasser et al. (1996), para especies pequeñas donde los volúmenes de sus deposiciones no alcanzan los pesos mínimos recomendados por el protocolo. Esta prueba consiste en unir todas las heces de un cierto período de tiempo para obtener una muestra fecal más grande, y a partir de ella

realizar varias diluciones. Para esto, en este estudio, se formó un pool de muestras (Anexo 5) y se determinó el nivel de cortisol de cada una de las diluciones. Se encontró, tanto en la validación biológica como en la validación de las distintas diluciones del pool de muestras, que el peso de material fecal seco influía en la concentración final de cortisol de las muestras. Así, los valores más altos de cortisol correspondían a los pesos más pequeños de muestra. Esto coincide con varios trabajos de laboratorio que sugieren que muestras de heces muy pequeñas (por ejemplo, <0,02 g) pueden resultar en concentraciones de glucocorticoides proporcionalmente mayores por lo que podría generarse un sesgo en el estudio (Tempel & Gutierrez, 2004). Se conoce que en algunas situaciones, particularmente aquellas que involucran animales pequeños (por ejemplo, pájaros o monos del nuevo mundo), la muestra de masa fecal del individuo puede presentar un peso menor al requerido (Tempel & Gutierrez, 2004).

La razón de este sesgo aún es desconocida, pero una posibilidad sería que el volumen de buffer de extracción, etanol y agua al no variar dependiendo de la cantidad de la muestra, puede resultar en que volúmenes mayores de estos reactivos por unidad de masa de la muestra, darán como resultado una mayor extracción de glucocorticoides de las heces (Millsbaugh & Washburn, 2004).

Estudios realizados en distintas especies de primates, y en otros animales, demuestran que son varios factores los que pueden alterar a los animales provocándoles etapas de estrés continuas, etapas de estrés agudas, y en otros etapas crónicas. Esta serie de cuestiones biológicas, como la duración de tiempo en cautiverio, los cambios estacionales y diarios en la excreción de glucocorticoides, el estado reproductivo, el sexo, la condición corporal, y la dieta del animal, pueden confundir la interpretación de las medidas de glucocorticoides. Es necesario conocer los valores normales de glucocorticoides de cada especie, es decir los valores de concentración de cortisol

cuando los primates no han sido sometidos a alguna actividad que demande un costo biológico. Sin conocer los valores normales de concentración de cortisol es difícil evaluar si los niveles obtenidos son elevados, ya que es difícil relacionar las medidas de cortisol con la influencia de factores naturales o inducidos por el hombre en las poblaciones (Millspaugh & Washburn, 2004).

Aunque las técnicas no invasivas de colección de muestras están siendo aplicadas en la actualidad para muchas especies, varios factores pueden inhibir su utilidad pues la interpretación de los estudios sigue siendo problemática. Se conoce que los glucocorticoides disminuyen en respuesta al secado de la muestra con un horno solar o un horno convencional. Estas diferencias podrían estar relacionadas con cambios bioquímicos en la inmunorreactividad, la degradación de los esteroides, o el metabolismo bacteriano. Es recomendable recoger muestras frescas (es decir, menos de un par de horas después de la deposición) ya que los niveles de glucocorticoides pueden cambiar en periodos cortos de tiempo (Millspaugh & Washburn, 2002; Touma et al. 2003; Khan et al. 2002).

Idealmente, las heces recogidas, deben ser a partir de un individuo conocido del que adicionalmente se conozca la edad; sin embargo, esto es a menudo difícil en estudios de campo. La opción de muestreo más atractivo para muchas especies evasivas, como los leoncillos, implica la recogida de muestras fecales que tienen ya varios días. En la recolección de muestras no frescas se debe asumir que las heces contienen todavía cantidades biológicamente representativas de glucocorticoides (Millspaugh & Washburn, 2004).

En relación con la hora de recolección (Tabla 5), se puede observar que las muestras con mayor concentración de cortisol fueron aquellas colectadas en la tarde (PY16 y PY20). Se sabe que las mayores concentraciones de cortisol se miden en torno

al inicio de la actividad locomotora. Esto ocurre por la mañana en especies diurnas y por la noche en especies nocturnas. En especies diurnas, los niveles de cortisol disminuyen gradualmente durante todo el día para convertirse al mínimo justo antes de que el animal se retire por la noche. Los altos niveles de cortisol al despertar probablemente sirven para movilizar las reservas de energía en preparación para la actividad (Coe & Levine, 1995; Cross & Rogers, 2004). La secreción de cortisol durante todo el ciclo circadiano se produce en ráfagas, sin embargo un estudio mostró que para los tíes comunes (*Callithrix jacchus*), los niveles más altos de cortisol ocurrían en la tarde, lo cual es inesperado ya que este animal es una especie diurna (Sousa & Ziegler, 1998). Pese a esto y basándose en la literatura, es posible atribuir este resultado a la longitud de tiempo que el cortisol se mantiene en los productos fecales en el intestino antes de ser excretados fuera del cuerpo. En este caso, los niveles de cortisol medidos pueden indicar en realidad las concentraciones de cortisol circulante que se produjeron en el cuerpo del individuo muchas horas antes (Cross & Rogers, 2004). Esto podría explicar los valores obtenidos en este estudio, ya que pese a ser solamente 7 de 52 muestras aquellas de las que se posee la suficiente información, las dos muestras fecales recolectadas en la tarde poseen los valores más altos de cortisol. Sin embargo es muy difícil concluir con solo dos muestras, de manera que es necesario analizar más muestras colectadas en la tarde que permitan obtener datos más sólidos.

En relación al sexo del individuo (Tabla 5), los valores de concentración de cortisol que presentaron los machos (PY30, T5.1, y T5.6) son inferiores a los valores de concentración de cortisol que presentaron las hembras (PY16, PY20, T5.4 y PY29). Es importante mencionar que en las tres muestras de hembras de la población del Puyo analizadas, los individuos presentaban una misma actividad previa, ser perseguidas, lo cuál es un indicio para pensar que se trataba del mismo individuo. Se sabe que en los

titíes comunes las hembras tienen valores de referencia de cortisol tres veces mayores que los machos, independientemente de si éstas se están reproduciendo o no. Además de las estrategias reproductivas de machos y hembras que podrían estar influenciando el perfil de excreción de cortisol en las heces de los titíes comunes, también se puede especular que machos y hembras pueden tener diferentes mecanismos para la excreción de cortisol fecal, que pueden influir en la cantidad o la velocidad de excreción de esta hormona (Ferreira et al., 2010). Al analizarse solo 7 muestras, es difícil concluir la tendencia general de concentración de cortisol en los individuos relacionada con el sexo, ya que el grupo de muestras analizadas es muy pequeño.

Al relacionar los niveles de cortisol con la forma de vida de los animales, si se encuentran en cautiverio o viven de forma silvestre, se debe considerar que las especies individuales pueden responder de manera diferente al cautiverio y el período de aclimatación puede ser bastante variable, por este motivo, cualquier estudio que se realice con animales en cautividad debe considerar el tiempo para la aclimatación e incorporar esta información en el estudio (Wingfield et al. 1982). A menudo, los animales salvajes que son capturados y mantenidos en cautiverio son usados para evaluar los efectos de los posibles factores de estrés en el animal. Varias investigaciones demuestran que animales silvestres que son sometidos a cautiverio suelen tener niveles de corticosterona más altos en comparación con los individuos de la misma especie en libertad (Marra et al. 1995; Romero & Wingfield, 1999; Washburn et al. 2003). En este estudio se observó que de las 7 muestras de individuos conocidos (Tabla 5), 4 pertenecían a individuos en cautiverio y presentaron los niveles más altos de cortisol alcanzando un valor máximo de 667,60 ng de cortisol/g muestra seca, lo que lleva a concluir que estos niveles se relacionan directamente con la cautividad de los individuos.

Debido al pequeño tamaño de muestras utilizadas en este estudio (7), no es posible aún determinar completamente si los leoncillos que viven en hábitats más fragmentados y afectados por actividades humanas tienen niveles más altos de estrés, sin embargo los datos mostrados sugieren que el cautiverio aumenta los niveles de estrés.

## 9 Conclusiones

- Se estandarizó el protocolo de extracción de cortisol utilizando el kit Oxford Biomedical “Cortisol EIA kit”
- Se estandarizó el protocolo para determinar las concentraciones de cortisol en muestras de heces de leoncillos.
- Ya que se observó una clara tendencia de niveles de cortisol superiores ligados a pesos menores de muestra fecal seca, se determinó que el umbral de peso para el análisis es de 0.05 g.
- La población del Puyo presenta los valores de cortisol más altos, lo que estaría asociado a los niveles de estrés a los que se encuentran sometidos los individuos en cautiverio.
- La concentración de cortisol de las hembras es superior a la de los machos. Esto podría explicarse por diferencias en el perfil de excreción de cortisol entre sexos, una pequeña influencia del estado reproductivo de la hembra, y la fidelidad de las hembras al macho. Sin embargo, dado el escaso número de muestras, estos resultados deben interpretarse con cautela.
- La concentración de cortisol en heces según la hora de colección de la muestra, sugiere que existe mayor concentración en la tarde que en la mañana.

## 10 Recomendaciones

- Reolectar muestras de las que se conozca el individuo, la hora de colección de la muestra, y las actividades del individuo previas (aprox. 12 horas antes, considerando el metabolismo del cortisol) a la colección de muestras.
- Estandarizar los pesos de muestra fecal seca, estableciendo un mismo peso para todas las muestras a ser analizadas.
- Ampliar el número de individuos y muestras colectadas con el fin de obtener resultados más representativos, tratando de usar un mismo número de muestras para cada población.
- Considerar el volúmen de agua y etanol que se utiliza al momento de extracción de cortisol, ya que debería variar dependiendo del peso de la muestra seca con la que se va a trabajar.

## 11 Bibliografía

- Álvarez C. & L. Arias. (2005). *Validación y aplicación de la prueba ELISA para medir cortisol fecal*. Medicina Veterinaria N° 10: 53-64. COLCIENCIAS: Colombia
- Bairrao, E. (2010). *Cebuella pygmaea*. Guía de manejo para Callitricidos. (Asociación Europea de Zoológicos y Acuarios) EAZA, ZooParc de Beauval. Segunda Edición.
- Bales K., J. French, C. Hostetler & J. Dietz. (2005). *Social and reproductive factors affecting cortisol levels in wild female golden lions tamarins (Leontopithecus rosalia)*. American Journal of Primatology. 67: 25-35.
- Behie A., M. Pavelka & C. Chapman. (2010). *Sources of variation in fecal cortisol levels in Howler Monkeys in Belize*. American Journal of Primatology. 72, 600-606
- Boada, C. (2011). *Callithrix pygmaea*. Mamíferos de Ecuador. Quito: Ecuador. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado desde <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/mamiferos/FichaEspecie.aspx?Id=2078>
- Brousset D., F. Galindo, R. Valdez, M. Romano & A. Schuneman. (2005). *Cortisol in saliva, urine and feces: non-invasive assessment of wild animals*. Etiología, fauna Silvestre y animales de laboratorio. Universidad Nacional Autónoma de México: México D.F. Pp. 335:337
- Coe C. L. & S. Levine. (1995). *Diurnal and annual variation of adrenocortical activity in the squirrel monkey*. American Journal of Primatology, 35, 283–292.
- Cross, N. & L. Rogers. (2004). *Diurnal cycle in salivary cortisol levels in Common Marmosets*. Centre for neuroscience and animal behaviour, School of Biological Biomedical and Molecular Science. University of New England. Pp. 134-139.

- Defler, T. (2004). *Leoncito. Cebuella pygmaea*. Primates de Colombia. Conservación Internacional, serie de guías tropicales de campo: Colombia. Pp. 131-141.
- De la Torre S., P. Yépez, C. Snowdon & A. Pyaguaje. (2005). *Ecología, comportamiento y conservación del leoncillo Callithrix (Cebuella) pygmaea en Tierras Secoya*". Primate Info Net.
- De la Torre, S. & A. Rylands. (2008). *Cebuella pygmaea*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <http://www.iucnredlist.org/details/41535/0>
- De la Torre S., P. Yépez & C. Snowdon. (2009). *Conservation Status of Pygmy marmosets (Cebuella pygmaea) in Ecuador*. Chapter 22. Springer Science-Business Media. Pp. 451-464
- De la Torre S. (2010). *Los primates ecuatorianos, estudios y perspectivas*. Artículo Avances en Ciencias e Ingenierías, Vol. 2, Pags. B27-B35. ISSN: 1390-5384. Universidad San Francisco de Quito.
- De la Torre S., P. Yépez, D. Nieto & H. Payaguaje. (2013). *Preliminary evaluation of the effects of habitat fragmentation on habitat use and genetic diversity of pygmy marmosets in Ecuador*. Chapter 29. Primates in fragments: Complexity and resilience, development in primatology: Progress and prospects. DOI 10.1007(978-1-4614-8839-2\_29. New York. Pp. 437-445.
- Fernández, N. (2007). *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*. Ensayos ELISA. Presentación.
- Ferreira J., M. Cordeiro, M. Sousa & M. Freire. (2010). *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., E. Mostl, T. Van't Hof, M. East & H. Hofer. (1999). *Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, Crocuta crocuta*. General and Comparative Endocrinology. 114, 340-348
- Harper J. & S. Austad. (2000). *Fecal glucocorticoids: a noninvasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents*. Physiological and Biochemical Zoology. 73 (1): 12-22.
- IUCN. (2007). *IUCN Red List of Threatened Species*. Web edition. <<http://www.iucnredlist.org>>
- Keye J., B. Jatinder, C. Matthew, B. Gaunt & K. Taranjit. (2006). *Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literature review*. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 37 (3): 234-244
- Khan M. Z., J. Altmann, S. S. Isani & J. Yu. (2002). *A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis*. General and Comparative Endocrinology 128, 57–64.
- Marra P. P., K. T. Lampe & B. L. Tedford. (1995). *Plasma corticosterone levels in two species of Zonotrichia sparrows under captive and free-living conditions*. Wilson Bulletin 107, 296–305.
- Menargues, M. (2011). *Evaluación del bienestar del elefante asiático (Elephas maximus) y del rinoceronte indio (Rinoceros unicornis) en cautividad a través de cortisol salivar*. Tesis para la obtención del título de Doctora en Biología. Universitat d'Alacanta: España
- Millspaugh J. & B. Washburn. (2004). *Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation*. General and Comparative Endocrinology. 138, 189-199

- Montes-Pérez, R. (1995). *Las técnicas de union para medir hormonas*. Universidad Autónoma de Yucatán: México. Rev Biomed. Vol. 6: 33-46
- Muller M. & R. Wrangham. (2004). *Dominance, cortisol and stress in wild chimpanzees (Pan troglodytes schweinfurthii)*. Behavioral Ecol Sociobiol 55: 332-340. Recuperado desde base de datos Jstor en Septiembre, 2014.
- OBR. (n.d.). *Cortisol EIA kit*. Enzyme Immunoassay for cortisol. Oxford Biomedical Resarch. Superior Science. Disponible en artículo web. Recuperado en agosto 2014 desde [http://www.oxfordbiomed.com/sites/default/files/spec\\_sheet/EA65.pdf](http://www.oxfordbiomed.com/sites/default/files/spec_sheet/EA65.pdf)
- Rangel-Negrín A., J. Alfaro, R.Valdez, M. Romano & J. Serio-Silva. (2009). *Stress in Yucatan spider monkeys: effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations*. Animal Conservation ZSL. Print ISSN: 1367-9430. Pp. 496-502.
- Romero L. M. & J. C. Wingfield. (1999). *Alterations in hypothalamic– pituitary– adrenal function associated with captivity in Gambelõs white–crowned sparrows (Zonotrichia leucophrys gambelii)*. Comparative Biochemistry and Physiology B 122, 13–20.
- Romero, L. (2004). *Physiological stress in ecology: Lessons from biomedical research*. Trends in Ecology and Evolution. 19 (5): 249-255
- Romero M., L. Uribe & J. Sánchez. (2011). *Stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming*. BioSalud. Volumen 10, No. 1. Enero-Junio. Pp. 71-87. ISSN: 1657.9550
- Sousa M. B. C. & T. E. Ziegler. (1998). *Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (Callithrix jacchus) females*. American Journal of Primatology, 46, 105–117.

- Tagliaro C., M. Cruz, H. Schneider, I. Stanhope & M. Stanhope. (2000). *Molecular studies of Callithrix pygmaea (Primates, Platyrrhini) based on transferrin intronic and NDI regions: implications for taxonomy and conservation*. Genetics and molecular biology, 23, 4, 729-737.
- Tempel D. J. & R. J. Gutiérrez. (2004). *Factors related to fecal corticosterone levels in California Spotted Owls: implications for assessing chronic stress*. Conservation Biology 18, 538–547.
- Tirira, D. (2011). *Mamíferos*. Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador. 2ª edición. Fundación mamíferos y conservación. Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador. Publicación Especial sobre mamíferos del Ecuador 8. Quito.
- Touma C., N. Sachser, E. Möstl & R. Palme. (2003). *Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice*. General and Comparative Endocrinology 130, 267–278.
- Townsend, W. (2001). *Callithrix pygmaea*. Mammalian Species. The American Society of Mammalogists. No. 665, Pp. 1-6.
- Vegas-Carrillo, S. (2008). *Efectos de la transformación del hábitat en la conducta y niveles de estrés de Alouatta palliata mexicana*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona: Barcelona.
- Washburn B. E., J. J. Millspaugh, J. H. Schulz, S. B. Jones & T. W. Mong. (2003). *Using fecal glucocorticoids for stress assessment in mourning doves*. Condor 105, 696–706.
- Wasser S.K., S. Papageorge, C. Foley & J. L. Brown. (1996). *Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (Loxodonta africana) and patterns of*

*fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle.* General and Comparative Endocrinology 102, 255–262.

Wingfield J. C., J. P. Smith, & D. S. Farner. (1982). *Endocrine responses of white-crowned sparrows to environmental stress.* Condor 84, 399–409.

Yépez P., S. de la Torre & C. Snowdon. (2005). *Interpopulation Differences in exudate feeding of Pygmy marmosets in Ecuadorian Amazonia.* American Journal of Primatology 66:145-158.

Ziegler T., G. Scheffler, C. Snowdon. (1995). *The relationship of cortisol levels to social environment and reproductive functioning in female cotton top tamarins, Sanguinus oedipus.* Hormones and Behavior 29: 407-424.

Ziegler T. & M. Sousa. (2002). *Parent-daughter relationships and social controls on fertility in female common marmosets, Callithrix jacchus.* Hormonal Behavioral. 42: 356-367.

## 12 Tablas

*Tabla 1.* Número total de muestras colectadas de heces de leoncillos.

<b>Lugar de colección</b>	<b># muestras</b>	
<b>Puyo</b>	30	
<b>San Pablo</b>	12	
<b>Tiputini</b>	<b>T1</b>	14
	<b>T2</b>	3
	<b>T3</b>	13
	<b>T5</b>	20
<b>Total muestras</b>	<b>92</b>	

*Tabla 2.* Concentración de cortisol en muestras de heces de leoncillos analizadas. Las muestras representan un rango de peso de muestra fecal seca entre 0.05 y 0.1g.

(Nomenclatura de las muestras: SP para San Pablo; PY para Puyo; T1, T2, T3, T5 para Tiputini, en las 3 poblaciones el # usado al lado de cada nombre corresponde al número de la muestra)

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
1	SP9	0,13	38,46	315,20
2	SP10	0,12	41,67	239,14
3	T1.3	0,12	41,67	261,70
4	SP3	0,10	50,00	245,03
5	PY1.1	0,10	50,00	365,64
6	SP2	0,09	55,56	408,18
7	T3.2	0,09	55,56	450,14
8	SP8	0,08	62,50	412,72
9	SP5	0,08	62,50	415,06
10	SP6	0,08	62,50	416,60
11	SP4	0,08	62,50	436,73
12	T3.1	0,08	62,50	302,04
13	T1.13	0,08	62,50	410,64
14	SP11	0,07	71,43	363,09
15	T1.5	0,07	71,43	367,23
16	T1.12	0,07	71,43	371,85
17	T1.11	0,07	71,43	486,78
18	T2.2	0,07	71,43	526,35
19	PY14	0,07	71,43	392,45
20	PY11	0,07	71,43	413,06
21	PY13	0,07	71,43	434,87
22	PY18	0,07	71,43	484,57
23	PY17	0,07	71,43	490,63
24	PY16	0,07	71,43	644,57
25	PY20	0,07	71,43	667,60
26	T3.9	0,07	71,43	319,47
27	PY5	0,07	71,43	527,20
28	PY4	0,07	71,43	564,55
29	PY8	0,07	71,43	621,95
30	T5.20	0,07	71,43	350,10
31	T5.13	0,07	71,43	355,00
32	PY30	0,07	71,43	415,02

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
33	T5.14	0,07	71,43	442,06
34	T5.8	0,07	71,43	499,10
35	T5.1	0,07	71,43	337,45
36	T5.7	0,07	71,43	391,97
37	T5.4	0,07	71,43	422,11
38	PY26	0,07	71,43	436,14
39	PY29	0,07	71,43	494,81
40	PY27	0,07	71,43	556,00
41	T5.6	0,07	71,43	333,54
42	T3.12	0,07	71,43	301,10
43	T5.5	0,06	83,33	390,47
44	SP7	0,06	83,33	411,45
45	SP1	0,06	83,33	416,20
46	T3.10	0,06	83,33	453,53
47	T3.13	0,05	100,00	447,63
48	PY1.2	0,05	100,00	799,44
49	T3.6	0,05	100,00	594,37
50	PY1.3	0,05	100,00	738,61
51	T3.8	0,05	100,00	867,69
52	PY9	0,05	100,00	634,28

*Tabla 3.* Validación biológica del protocolo de extracción usando un individuo (PY1) cuyas características eran conocidas. Las muestras fueron rotuladas de acuerdo a la fecha de colección de la muestra, siendo PY1.1 la muestra más lejana a la muerte del individuo y PY1.3 la más cercana.

	<b>Muestras</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
1	PY1.3	0,05	799,44
2	PY1.2	0,05	738,61
3	PY1.1	0,1	365,64

Tabla 4. Concentración de cortisol en muestras de heces de leoncillos con peso seco de 0.07g.

(Nomenclatura de las muestras: SP para San Pablo; PY para Puyo; T1, T2, T3, T5 para Tiputini, en las 3 poblaciones el # usado al lado de cada nombre corresponde al número de la muestra)

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>mg muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
1	SP11	5,08	0,07	70	71,43	363,09
2	T1.5	5,14	0,07	70	71,43	367,23
3	T1.12	5,21	0,07	70	71,43	371,85
4	T1.11	6,81	0,07	70	71,43	486,78
5	T2.2	7,37	0,07	70	71,43	526,35
6	PY14	5,49	0,07	70	71,43	392,45
7	PY11	5,78	0,07	70	71,43	413,06
8	PY13	6,09	0,07	70	71,43	434,87
9	PY18	6,78	0,07	70	71,43	484,57
10	PY17	6,87	0,07	70	71,43	490,63
11	PY16	9,02	0,07	70	71,43	644,57
12	PY20	9,35	0,07	70	71,43	667,60
13	T3.9	4,47	0,07	70	71,43	319,47
14	PY5	7,38	0,07	70	71,43	527,20
15	PY4	7,90	0,07	70	71,43	564,55
16	PY8	8,71	0,07	70	71,43	621,95

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>mg muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
17	T5.20	4,90	0,07	70	71,43	350,10
18	T5.13	4,97	0,07	70	71,43	355,00
19	PY30	5,81	0,07	70	71,43	415,02
20	T5.14	6,19	0,07	70	71,43	442,06
21	T5.8	6,99	0,07	70	71,43	499,10
22	T5.1	4,72	0,07	70	71,43	337,45
23	T5.7	5,49	0,07	70	71,43	391,97
24	T5.4	5,91	0,07	70	71,43	422,11
25	PY26	6,11	0,07	70	71,43	436,14
26	PY29	6,93	0,07	70	71,43	494,81
27	PY27	7,78	0,07	70	71,43	556,00
28	T5.6	4,67	0,07	70	71,43	333,54
29	T3.12	4,22	0,07	70	71,43	301,10

Tabla 5. Concentración de cortisol en muestras de heces de individuos de *Callithrix pygmaea* de los que se conoce el sexo, la posible edad, las actividades previas a la colección de la muestra, y la hora de colección. Peso de muestra fecal de 0.07g.

(Nomenclatura de las muestras: PY para Puyo; T1, T2, T3, T5 para Tiputini, en las 2 poblaciones el # usado al lado de cada nombre corresponde al número de la muestra)

	<b>Nomenclatura Muestra</b>	<b>Individuo</b>	<b>Hora de colección</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Concentración ng cortisol /g muestra</b>
1	PY16	Hembra adulta	16:30 p.m.	Perseguida	644.57
2	PY20	Hembra adulta	15:40 p.m.	Perseguida	667.60
3	PY30	Juvenil nervioso	10:47 a.m.	Llora todo el día	415.02
4	T5.1	Macho adulto	7:00 a.m.		337.45
5	T5.4	Hembra adulta	8:15 a.m.		422.11
6	PY29	Hembra adulta	9:30 a.m.	Perseguida	494.81
7	T5.6	Macho	6:00 a.m.		333.54

En las tres muestras de heces de la población del Puyo el individuo fue perseguido, lo que podría deberse a que se trataba del mismo individuo.

*Tabla 6.* Valores promedio y desviación estándar de las 3 poblaciones analizadas de leoncillos.

<b>Población analizada</b>	<b>Tamaño del grupo</b>	<b>Concentración total de cortisol</b>	<b>Valor promedio de la concentración</b>	<b>Desviación estándar</b>
Puyo	15	108.76	6,26	0,23
San Pablo	11	68.10	5,89	0,22
Tiputini	12	74.85	6,01	0,26

En esta tabla las muestras que se analizaron en cada grupo se encontraban en un rango de peso de muestra fecal seca entre 0.05 y 0.1g. Se presenta además el valor promedio y la desviación estándar.

Tabla 7. Análisis de varianza ANOVA de las poblaciones de San Pablo, Tiputini y Puyo.

ANÁLISIS DE VARIANZA							
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>	
Entre grupos	1,09	2	0,54653	9,46283	0,00033	3,18658	
Dentro de los grupos	2,83	49	0,05776				
Total	3,92	51					

En análisis fue realizado en el programa estadístico R.

*Hipótesis nula:* El contenido de cortisol es el mismo en todos los individuos de las tres poblaciones en estudio

*Hipótesis Alternativa:* Existen diferencias en los niveles de cortisol entre las tres poblaciones en estudio.

*Tabla 8.* Análisis de Tukey de separación de medias entre las poblaciones de San Pablo, Tiputini y Puyo. (Pob.1= Tiputini, Pob.2 = San Pablo, Pob.3 = Puyo).

TukeyHSD(do2.aov)

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = values ~ ind, data = Pob)

\$ind

	<i>diff</i>	<i>lwr</i>	<i>upr</i>	<i>p adj</i>
Pob.2-Pob.1	-0.1145850	-0.32732561	0.09815565	0.4010081
Pob.3-Pob.1	0.2530918	0.07046562	0.43571795	0.0043848
Pob.3-Pob.2	0.3676768	0.14558235	0.58977119	0.0006135

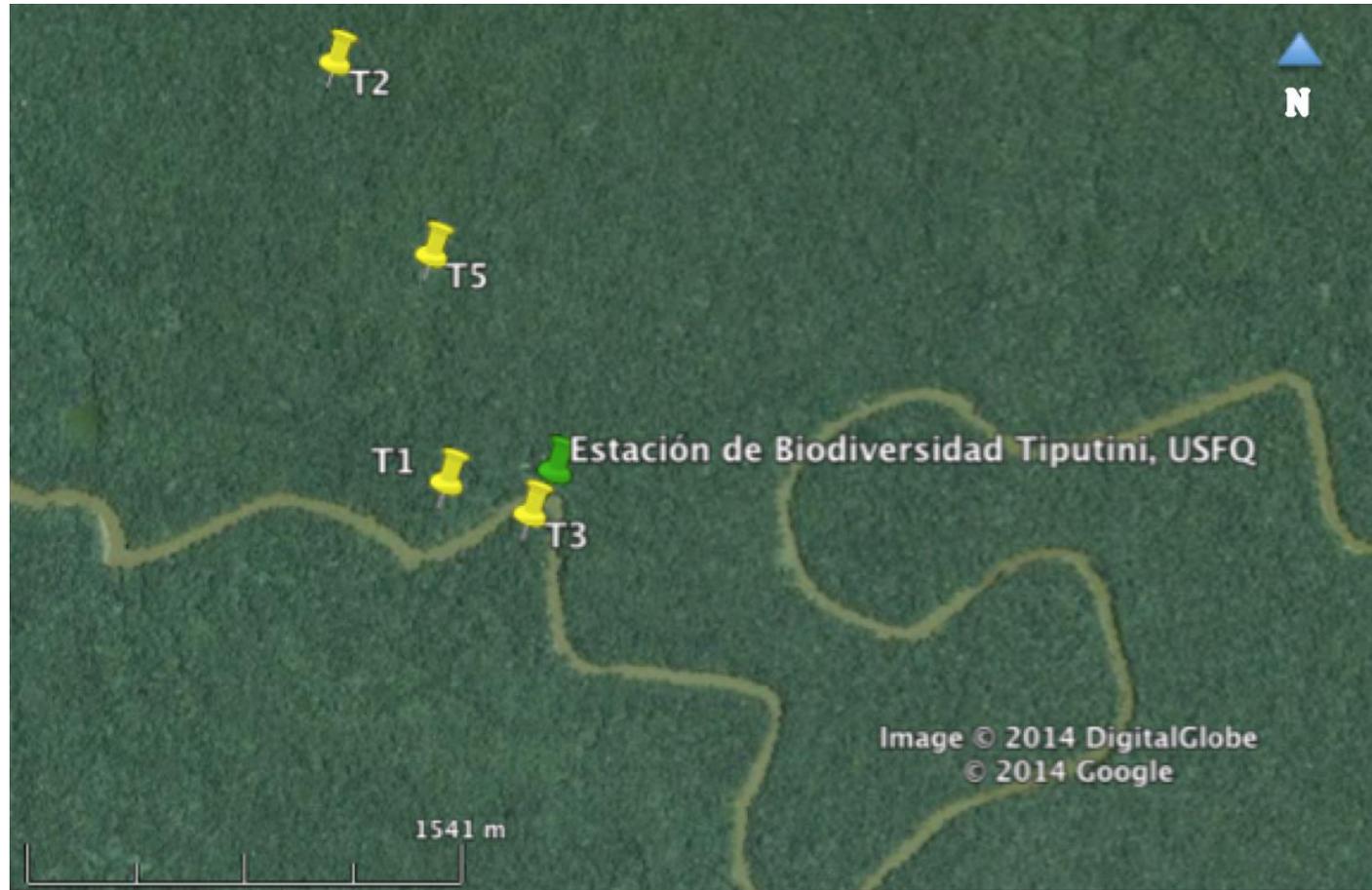
### 13 Figuras

Figura 1. Mapa de distribución de las tres poblaciones de *Callithrix pygmaea* en estudio (San Pablo, Tiputini (4 grupos – T1, T2, T3, T5) y Puyo).



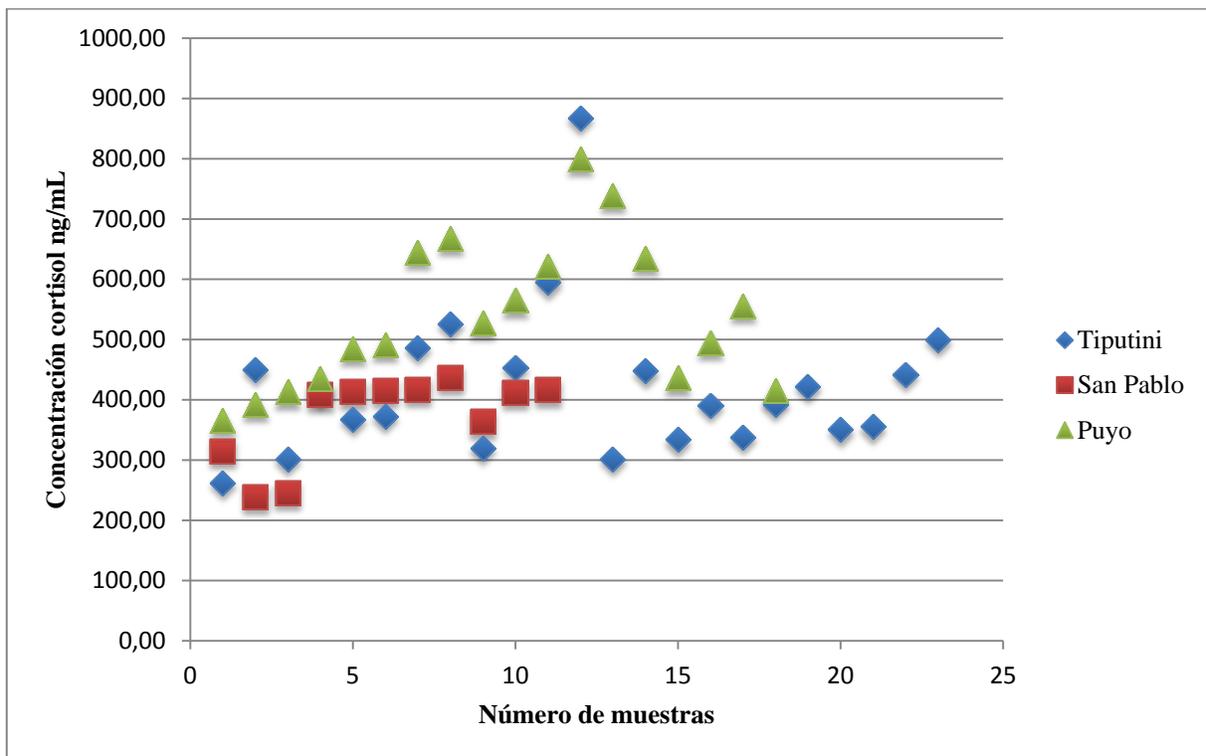
(Mapa generado en el programa Google earth ® derechos reservados 2014)

Figura 2. Mapa de las poblaciones de Tiputini: T1, T2, T3 y T5.

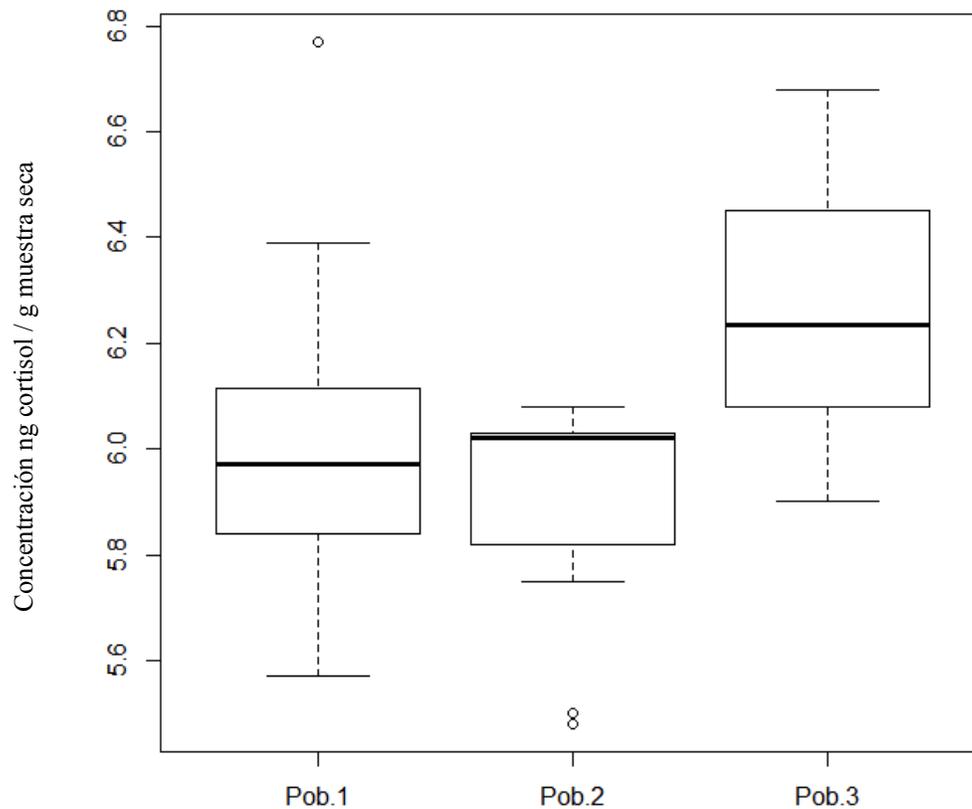


(Mapa generado en el programa Google earth ® derechos reservados 2014)

Figura 3. Gráfica de dispersión de los niveles de cortisol encontrados en las tres poblaciones de leoncillos (San Pablo, Tiputini y Puyo).



*Figura 4.* Diagrama de cajas de las poblaciones en estudio (Tiputini, Puyo y San Pablo). Se observa una predominancia de los valores de cortisol en la población del Puyo (Pob. 3) versus las otras dos poblaciones (Pob. 1= Tiputini, Pob. 2= San Pablo).



(Gráfico generado en el programa estadístico R ® derechos reservados 2014)

## 14 Anexos

*Anexo 1.* Volumen requerido para la preparación de los stocks para la curva estándar que se utilizó en cada uno de los ensayos realizados en el estudio.

Estándar	Conc. Cortisol (ng/mL)	Vol. de Buffer EIA (uL)	Vol. transferencia (uL)	Vol. Final (uL)
A	1000	-	-	80
B	20	980	20 uL de A	800
C	2	1800	200 uL de B	1800
D	0.2	1800	200 uL de C	2000

*Anexo 2.* Volumen requerido para la preparación de los puntos para la curva estándar, estos valores son establecidos por el kit Oxford Biomedical “Cortisol EIA kit”.

Estándar	Conc. Cortisol (ng/mL)	Vol. de Buffer EIA (uL)	Vol. de Stock B (uL)	Vol. de Stock C (uL)	Vol. de Stock D (uL)
S0	0	1000	-	-	-
S1	0.04	800	-	-	200
S2	0.1	500	-	-	500
S3	0.2	-	-	-	1000
S4	0.4	800	-	200	-
S5	1.0	500	-	500	-
S6	2.0	-	-	1000	-
S7	10.0	500	500	-	-

Anexo 3. Valores de concentración de ng cortisol/g muestra, del primer grupo de muestras analizadas en este estudio.

(Nomenclatura de las muestras: SP para San Pablo; PY para Puyo; T1, T2, T3, T5 para Tiputini, en las 3 poblaciones el # usado al lado de cada nombre corresponde al número de la muestra)

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>mg muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
1	SP9	8,37	0,13	130	38,46	321,87
2	SP10	8,57	0,12	120	41,67	357,24
3	T1.3	8,53	0,12	120	41,67	355,35
4	SP3	8,64	0,10	100	50,00	432,19
5	PY1	8,44	0,10	100	50,00	422,11
6	SP2	8,23	0,09	90	55,56	457,48
7	T3.2	8,19	0,09	90	55,56	454,77
8	SP8	8,28	0,08	80	62,50	517,67
9	SP5	8,28	0,08	80	62,50	517,52
10	SP6	8,28	0,08	80	62,50	517,42
11	SP4	8,26	0,08	80	62,50	516,12
12	T3.1	4,83	0,08	80	62,50	302,04
13	T1.13	6,57	0,08	80	62,50	410,64
14	SP11	5,08	0,07	70	71,43	363,09
15	T1.5	5,14	0,07	70	71,43	367,23
16	T1.12	5,21	0,07	70	71,43	371,85
17	T1.11	6,81	0,07	70	71,43	486,78
18	T2.2	7,37	0,07	70	71,43	526,35

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>mg muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
19	T3.9	4,47	0,07	70	71,43	319,47
20	PY5	7,38	0,07	70	71,43	527,20
21	PY4	7,90	0,07	70	71,43	564,55
22	PY8	8,71	0,07	70	71,43	621,95
23	SP7	4,94	0,06	60	83,33	411,45
24	SP1	4,99	0,06	60	83,33	416,20
25	T3.10	5,44	0,06	60	83,33	453,53
26	PY2	7,99	0,05	50	100,00	799,44
27	T3.6	5,94	0,05	50	100,00	594,37
28	PY3	7,39	0,05	50	100,00	738,61
29	T3.8	8,68	0,05	50	100,00	867,69
30	T1.4	2,87	0,04	40	125,00	358,84
31	TB3	5,89	0,04	40	125,00	736,77
32	TB4	6,28	0,04	40	125,00	785,09
33	T1.1	6,91	0,04	40	125,00	863,49
34	T1.6	7,60	0,04	40	125,00	949,39
35	T2.1	3,14	0,04	40	125,00	392,52
36	T1.10	4,57	0,04	40	125,00	571,37
37	T3.3	5,21	0,04	40	125,00	651,06
38	T3.4	5,44	0,04	40	125,00	679,98
39	T1.8	7,01	0,03	30	166,67	1169,08
40	TB1	4,48	0,03	30	166,67	746,22
41	T1.2	5,47	0,03	30	166,67	911,88
42	T1.7	5,89	0,03	30	166,67	981,57

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>mg muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
43	T1.14	4,64	0,03	30	166,67	773,26
44	T3.7	5,58	0,03	30	166,67	930,02
45	SP12	4,37	0,02	20	250,00	1093,68
46	T3.5	3,78	0,02	20	250,00	945,73
47	TB2	5,15	0,02	20	250,00	1286,90
48	T1.9	4,66	0,01	10	500,00	2329,96
49	T1.16	3,67	0,01	10	500,00	1834,04
50	PY7	4,49	0,008	8	625,00	2803,31
51	PY6	5,62	0,008	8	625,00	3509,88
52	T1.15	6,26	0,008	8	625,00	3913,04
53	T2.6	0	0,008	8	625,00	0
54	T1.17	5,89	0,005	5	1000,00	5889,05
55	T2.3	1,24	0,004	4	1250,00	1555,61
56	T2.5	0,41	0,001	1	5000,00	2026,99
57	T2.4	1,72	0,001	1	5000,00	8601,52

Anexo 4. Valores de concentración de ng cortisol /g muestra, del pool de muestras analizado.

El pool de muestras comprende el conjunto de 15 muestras que fueron excluidas del set original de muestras debido a que su peso fue inferior a 0,01g. Al unir estas 15 muestras se obtuvo una sola muestra con un peso total de 0.158g.

<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>mg muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>
<b>0,008</b>	2,86	0,008	8	625	1785,92
<b>0,01</b>	3,19	0,01	10	500	1595,07
<b>0,05</b>	5,95	0,05	50	100	594,77
<b>0,09</b>	6,04	0,09	90	55,56	335,72

Anexo 5. Valores de concentración ng cortisol/g muestra, del segundo y tercer grupo de muestras analizadas en este estudio.

(Nomenclatura de las muestras: SP para San Pablo; PY para Puyo; T1, T2, T3, T5 para Tiputini, en las 3 poblaciones el # usado al lado de cada nombre corresponde al número de la muestra)

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>mg muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
1	T5.20	4,90	0,07	70	71,43	350,10
2	T5.13	4,97	0,07	70	71,43	355,00
3	PY30	5,81	0,07	70	71,43	415,02
4	T5.14	6,19	0,07	70	71,43	442,06
5	T5.8	6,99	0,07	70	71,43	499,10

	<b>Nomenclatura Muestras</b>	<b>Concentración ng cortisol / ml muestra</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>mg muestra seca</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
6	T5.1	4,72	0,07	70	71,43	337,45
7	T5.7	5,49	0,07	70	71,43	391,97
8	T5.4	5,91	0,07	70	71,43	422,11
9	PY26	6,11	0,07	70	71,43	436,14
10	PY29	6,93	0,07	70	71,43	494,81
11	PY27	7,78	0,07	70	71,43	556,00
12	T5.6	4,67	0,07	70	71,43	333,54
13	T3.12	4,22	0,07	70	71,43	301,10
14	PY14	5,49	0,07	70	71,43	392,45
15	PY11	5,78	0,07	70	71,43	413,06
16	PY13	6,09	0,07	70	71,43	434,87
17	PY18	6,78	0,07	70	71,43	484,57
18	PY17	6,87	0,07	70	71,43	490,63
19	PY16	9,02	0,07	70	71,43	644,57
20	PY20	9,35	0,07	70	71,43	667,60
21	T5.5	4,69	0,06	60	83,33	390,47
22	T3.13	4,48	0,05	50	100,00	447,63
23	PY9	6,34	0,05	50	100,00	634,28

*Anexo 6.* Valores de concentración de ng cortisol/g muestra, de todas las muestras analizadas de los tres grupos de leoncillos. En esta tabla se muestran todas las muestras de las cuales se calculó la concentración de cortisol, sin excluir las muestras que se encontraban fuera del rango 0.05 – 0.1g.

(Nomenclatura de las muestras: SP para San Pablo; PY para Puyo; T1, T2, T3, T5 para Tiputini, en las 3 poblaciones el # usado al lado de cada nombre corresponde al número de la muestra)

	<b>Muestras</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
1	T2.4	0,001	8601,52
2	T1.17	0,005	5889,05
3	T1.15	0,008	3913,04
4	PY6	0,008	3509,88
5	PY7	0,008	2803,31
6	T1.9	0,01	2329,96
7	T2.5	0,001	2026,99
8	T1.16	0,01	1834,04
9	T2.3	0,004	1555,61
10	TB2	0,02	1286,90
11	T1.8	0,03	1169,08
12	SP12	0,02	1093,68
13	T1.7	0,03	981,57
14	T1.6	0,04	949,39
15	T3.5	0,02	945,73
16	T3.7	0,03	930,02
17	T1.2	0,03	911,88
18	T3.8	0,05	867,69
19	T1.1	0,04	863,49
20	PY1.3	0,05	799,44
21	TB4	0,04	785,09
22	T1.14	0,03	773,26
23	TB1	0,03	746,22
24	PY1.2	0,05	738,61

	<b>Muestras</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
25	TB3	0,04	736,77
26	T3.4	0,04	679,98
27	PY20	0,07	667,60
28	T3.3	0,04	651,06
29	PY16	0,07	644,57
30	PY9	0,05	634,28
31	PY8	0,07	621,95
32	T3.6	0,05	594,37
33	T1.10	0,04	571,37
34	PY4	0,07	564,55
35	PY27	0,07	556,00
36	PY5	0,07	527,20
37	T2.2	0,07	526,35
38	T5.8	0,07	499,10
39	PY29	0,07	494,81
40	PY17	0,07	490,63
41	T1.11	0,07	486,78
42	PY18	0,07	484,57
43	T3.10	0,06	453,53
44	T3.2	0,09	450,14
45	T3.13	0,05	447,63
46	T5.14	0,07	442,06
47	SP4	0,08	436,73
48	PY26	0,07	436,14
49	PY13	0,07	434,87
50	T5.4	0,07	422,11
51	SP6	0,08	416,60
52	SP1	0,06	416,20
53	SP5	0,08	415,06
54	PY30	0,07	415,02
55	PY11	0,07	413,06
56	SP8	0,08	412,72
57	SP7	0,06	411,45
58	T1.13	0,08	410,64
59	SP2	0,09	408,18
60	T2.1	0,04	392,52
61	PY14	0,07	392,45
62	T5.7	0,07	391,97
63	T5.5	0,06	390,47
64	T1.12	0,07	371,85

	<b>Muestras</b>	<b>g muestra seca</b>	<b>Concentración ng cortisol / g muestra</b>
65	T1.5	0,07	367,23
66	PY1.1	0,10	365,64
67	SP11	0,07	363,09
68	T1.4	0,04	358,84
69	T5.13	0,07	355,00
70	T5.20	0,07	350,10
71	T5.1	0,07	337,45
72	T5.6	0,07	333,54
73	T3.9	0,07	319,47
74	SP9	0,13	315,20
75	T3.1	0,08	302,04
76	T3.12	0,07	301,10
77	T1.3	0,12	261,70
78	SP3	0,10	245,03
79	SP10	0,12	239,14
80	T2.6	0,008	0,00