

III

Endocrinología ambiental y el estudio de primates mexicanos silvestres

*Ariadna Rangel Negrín
Alejandro Coyohua Fuentes
Domingo Canales Espinosa
Pedro Américo D. Dias*

Introducción

La endocrinología ambiental es un área de investigación que busca entender cómo las hormonas modulan y controlan procesos fisiológicos en animales expuestos a las exigencias de su ambiente natural. Entre otros tópicos de investigación, desde este enfoque se ha tratado de entender las respuestas reproductivas a las señales ambientales de las aves migratorias, las dinámicas de interacción entre las hormonas y el estatus social en primates, o cómo responden endocrinológicamente algunos animales, como peces y anfibios, a contaminantes en su ambiente.

En nuestro grupo de trabajo hemos realizado investigaciones acerca de la endocrinología ambiental en primates mexicanos, y en particular, nos hemos interesado por la medición de glucocorticoides fecales como una aproximación a las respuestas de estrés fisiológico de los individuos a desafíos por perturbación de su ambiente, provocados por las actividades humanas. En este capítulo, empezamos por revisar conceptos clave asociados al estudio del estrés; resumimos algunos aspectos metodológicos fundamentales para la realización de este tipo de estudios en primates en vida libre; e ilustramos cómo puede el monitoreo hormonal no-invasivo aportar información sobre las respuestas fisiológicas de estrés de los animales silvestres.

Definición de estrés

El estrés puede entenderse como un cambio fisiológico en la homeostasis (i.e., equilibrio interno) resultante de fluctuaciones medioambientales. Los estímulos estresantes (o estresores) son los retos a la homeostasis, y las respuestas al estrés forman parte de un conjunto de procesos alostáticos (que buscan mantener estabilidad a través del cambio) y que intentan contrarrestar los efectos de esos estímulos y restablecer la homeostasis (Moberg, 2000).

Los estresores pueden ser de tipo ecológico (como la falta de alimento), social (como las agresiones y la subordinación), fisiológico (enfermedades y lesiones), o físico (como las inclemencias del clima) (Nelson, 2000). Los estresores provocan respuestas que interfieren con el bienestar, confort y/o reproducción y que pueden ser capaces de inducir cambios patológicos. Cuando estas respuestas son prolongadas pueden conducir a una sobrecarga alostática, y desencadenar alteraciones en la conducta alimenticia, úlceras gástricas, urticaria, y deficiencias inmunes, entre otras. En este contexto, el estrés se refiere a situaciones en que el organismo no logra restablecer la homeostasis.

También se ha definido al estrés como una respuesta fisiológica no específica del organismo a cualquier demanda que se hace sobre él. Esta demanda puede ser un trauma severo, como una quemadura, una enfermedad, cirugía, hipoglucemia, fiebre, hipertensión, ejercicio extremo, parasitismo, entre otras. Lo anterior involucra un síndrome de adaptación fisiológica general de los organismos que se puede dividir en tres fases. De manera breve, este incluye: (a) fase de alarma, caracterizada por una respuesta fisiológica rápida en la cual se estimula el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA; que es el responsable por la activación de la respuesta fisiológica de estrés); (b) fase de compensación o adaptación, donde después de una exposición más o menos prolongada al agente estresante, el organismo se ajusta o compensa las condiciones alteradas que causan el estrés; (c) si los agentes estresantes se presentan con frecuencia o son de larga duración, la compensación puede no ser posible (e.g., debido a enfermedad) y el organismo entra a la tercera y última fase, la etapa de agotamiento del eje HHA, que es también conocido como estrés crónico (Nelson, 2000). Se ha propuesto que la duración, más que la intensidad, es el factor que determina el impacto de los estímulos estresantes sobre los individuos, ya que si estos son prolongados, generalmente se consideran negativos, mientras que cuando son breves y no se repiten, se pueden considerar positivos. En todo caso, la respuesta fisiológica al estrés es un proceso dinámico que permite a los individuos afrontar retos ambientales (Figura 1).

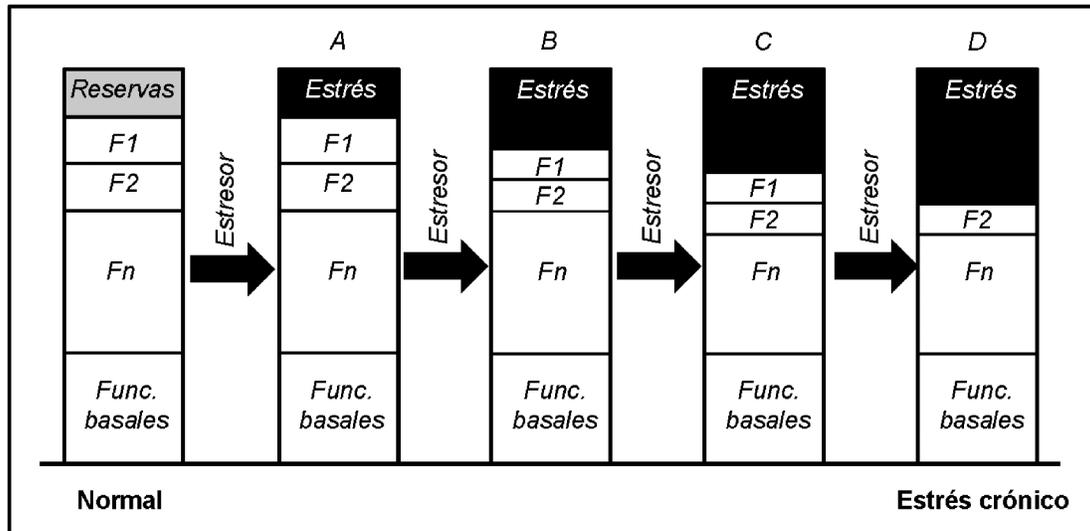


Fig. 1. Esquema que representa los costos biológicos de la exposición prolongada de un organismo a uno o varios estresores. Mientras que la primera exposición a un estresor (A) podrá no obligar al organismo a desviar recursos que afecten las funciones biológicas (i.e. F1, F2, Fn), el efecto acumulativo del estrés prolongado (B, C) conduce a la reducción de los recursos invertidos en algunas funciones (i.e., F1 y F2), o incluso a la supresión (D) de algunas de esas funciones (i.e., F1), a lo que se conoce como estrés crónico. (Modificado de Moberg, 2000)

Hormonas asociadas a la respuesta de estrés

Una gran variedad de estresores pueden alterar la secreción de hormonas hipofisarias, mismas que regulan directamente los factores asociados a un buen estado de salud. Entre estas hormonas, la adenocorticotrópica (ACTH) es la que más atención ha recibido en la investigación porque estimula la síntesis y liberación de los glucocorticoides adrenales, por ejemplo el cortisol y la corticosterona, que son liberados durante periodos de estrés (Moberg, 2000). El incremento en la producción de la hormona adenocorticotrópica por la adenohipófisis, resulta en el incremento de las hormonas glucocorticoides adrenales circulantes. Un individuo que mantenga una respuesta de estrés por tiempo prolongado, presentará igualmente un incremento en las hormonas glucocorticoides, que actúan produciendo la lisis de los leucocitos sanguíneos, particularmente los linfocitos T, monocitos y eosinófilos, así como una supresión en la generación clonal de los linfocitos. Por lo tanto, un animal expuesto de manera prolongada a estímulos estresantes estará más propenso a enfermarse y/o a ser colonizado por parásitos o patógenos, que otro individuo que no lo esté.

Los métodos no-invasivos de monitoreo hormonal en animales silvestres

El auge actual de la endocrinología ambiental no es ajeno al desarrollo técnico que ha habido recientemente de los métodos no-invasivos para el monitoreo hormonal en animales silvestres. Los glucocorticoides pueden ser monitoreados de manera no-invasiva midiendo sus metabolitos que son excretados en la orina y/o en las heces (Palme, 2005). Hoy en día, la medición de glucocorticoides en heces se utiliza para la evaluación del grado de bienestar en diferentes especies, ya que la recolección de muestras fecales es relativamente fácil y no hay necesidad de someter al animal a contención.

Sin embargo, una sola medición de los niveles de glucocorticoides en plasma, saliva, heces u orina proporciona muy poca información acerca del nivel de bienestar de un individuo. Aunque se busque minimizar el impacto del muestreo sobre la activación de la respuesta de estrés en el animal, los niveles medidos de los glucocorticoides pueden verse afectados por otros factores, como por ejemplo, los ritmos circadianos. Debido a esto, es necesario evaluar muestras obtenidas de manera regular, en un periodo de horas o días, y comparar las mediciones entre animales mantenidos en diferentes condiciones o sometidos a diversos estímulos.

Como comentamos anteriormente, las hormonas pueden ser medidas en diferentes tipos de muestra, como en suero, heces, orina o saliva. Debido a que no todas las hormonas son excretadas por la misma vía, la selección de tipo de muestra a tomar depende de la hormona que se quiera evaluar y de la factibilidad de coleccionar las muestras. Las muestras de suero sanguíneo, por ejemplo, aportan información a corto plazo (segundos, minutos) en cuanto a las respuestas hormonales de los individuos. Sin embargo, su colecta en campo no es práctica ya que, entre otras consecuencias, la captura provoca estrés en los individuos. Además los niveles hormonales de individuos capturados e inmovilizados mediante contención química pueden alterarse por efecto de la anestesia, como se ha detectado en concentraciones de cortisol en chimpancés (Whitten et al., 1998). Debido a esto, se recomienda el uso de métodos de colecta no-invasivos que involucran la utilización de orina, saliva y heces. La colecta de muestras fecales puede ser el método no-invasivo más eficiente para la realización de mediciones hormonales en varias especies de fauna silvestre. En las excretas se encuentran hormonas esteroides como andrógenos, estrógenos y progestinas, así como hormonas relacionadas con el estrés como corticosterona y cortisol (e.g., Wasser et al., 2000). La colecta de estas muestras en condiciones de campo es además relativamente fácil, y cuándo es acompañada del monitoreo longitudinal de los individuos, permite establecer la relación entre los niveles hormonales y los atributos in-

dividuales, como el sexo o la edad. En primates silvestres, este método se ha empleado para la determinación de niveles hormonales relacionados con la actividad reproductiva o el estatus social (e.g., testosterona) y para la evaluación del estrés en animales que viven bajo diferentes condiciones ambientales (e.g., Aguilar-Cucurachi et al., 2010; Rangel-Negrín et al., 2009). En primates, el tiempo transcurrido entre la producción y secreción de cortisol y su expresión en heces es normalmente de alrededor de 24 a 48 horas (Monfort, 2002). Por lo tanto, aunque estas mediciones en excretas no son tan sensibles como las que se hacen en suero (que dan una medición de lo que está pasando en el organismo en los segundos o minutos que preceden a la colecta de la muestra), son de gran utilidad para detectar estrés en estudios de campo donde los animales están expuestos a eventos estresantes naturales; además de ser apropiadas cuando no se pueden capturar a los sujetos. Antes de establecer un protocolo para la cuantificación de esteroides en heces es importante determinar la vía principal de excreción para decidir qué tipo de muestra y anticuerpo usar. Por ejemplo, en un estudio realizado con monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*) por nuestro grupo de trabajo, encontramos durante una validación biológica de nuestros ensayos hormonales que el pico más alto en las concentraciones de metabolitos de corticosterona en heces se observó entre las 24 y 28 horas después del estímulo estresante (captura) (Aguilar-Cucurachi et al., 2010).

Los estudios de determinación de la ruta de secreción-excreción de los esteroides han contribuido a entender la circulación entero-hepática de estas hormonas, y se ha determinado que la excreción de los esteroides al intestino se produce principalmente por la bilis. Cuando los ácidos biliares llegan al intestino los esteroides sufren una reabsorción, y durante su circulación por el intestino están expuestos a procesos metabólicos por parte de los microorganismos presentes en la flora intestinal. Se ha descubierto que estos microorganismos de la flora normal en humanos son los responsables de que se encuentren metabolitos de estrógenos en su forma no conjugada, principalmente en heces, a causa de la hidrólisis que ejercen sobre ellos. Esto da como resultado que los factores más importantes, determinantes del tipo de metabolito que se puede obtener a partir de heces, dependen del tiempo de tránsito intestinal, del tipo de flora intestinal y de otros factores que puedan llegar a modificarlos (e.g., enfermedad). En general, los metabolitos finales que aparecen en la orina son conjugados, en tanto que los de las heces no lo son (Palme, 2005).

El tiempo entre la circulación y la excreción de las hormonas en heces equivale al tiempo necesario del paso de la bilis al recto, que es de 24 a 48

horas en animales herbívoros y de 12 a 24 horas en carnívoros. Debido a que los metabolitos de los esteroides que se encuentran en el intestino son transportados con la ingesta, la velocidad del paso del duodeno al recto puede dar una estimación del tiempo en que aparecen en las heces; sin embargo, el tiempo puede modificarse por factores como constipación, diarrea, restricción de alimento, cantidad de fibra en la dieta, tratamientos con antibióticos que modifiquen la flora intestinal, o incluso por variación entre individuos (Palme, 2005).

Finalmente, un punto que debe ser cuidado son las posibles causas de la variación en la concentración de esteroides en heces, ya que puede verse influenciada por cambios en la dieta, contenido de agua, o por la acción bacteriana intestinal. En la medición de hormonas en heces no se cuenta con un índice de corrección por variaciones en el volumen de la muestra, como es la creatinina para el caso de la orina. Por ello se ha recomendado la deshidratación, pulverización y homogeneización de las muestras antes de someterlas al procedimiento de extracción, para reportar los resultados en base seca (e.g., Rangel-Negrín et al., 2014). Eliminar el líquido en las muestras fecales resulta en diferencias no significativas entre las concentraciones de esteroides en diferentes porciones de una misma muestra fecal, y una de las ventajas de la liofilización es que después del secado se pueden retirar fácilmente otros materiales presentes (ej. materia vegetal) que podrían modificar los resultados.

Un estudio sobre el estrés de los monos aulladores negros

En la actualidad, la pérdida y transformación de los hábitats naturales causadas por actividades humanas representan un notable desafío para la plasticidad conductual y fisiológica de los animales silvestres (Figura 2). Los hábitats perturbados tienen una configuración espacial distinta a la original, la cual muchas veces se asocia con alteraciones en las interacciones ecológicas. Asimismo, la impredecibilidad ambiental aumenta en estos hábitats limitando, por ejemplo, la sincronización de las respuestas conductuales y fisiológicas de los individuos a claves ambientales, como las fluctuaciones estacionales en la disponibilidad de alimento. La literatura acerca del impacto de la perturbación ambiental antropogénica sobre poblaciones animales es muy abundante, y apoya la idea de que el comportamiento y la fisiología de los animales que viven en hábitats perturbados son diferentes de los de animales que viven en hábitats prístinos.



Fig. 2. Los monos aulladores negros (*Alouatta pigra*), son primates arborícolas, pero la transformación de su hábitat los puede obligar a cambiar su comportamiento. Como ejemplo de esos cambios, en la imagen se observa a una hembra desplazándose por el suelo a corta distancia de una persona (fotografía de Ariadna Rangel).

En México, existen aproximadamente 174 ÁREAS naturales protegidas (ANP) que incluyen más de 25 millones de hectáreas; esto representa casi el 13% de la superficie del territorio nacional. De estas 174 ANP, podemos encontrar a primates en 38. Tradicionalmente, se asume que los primates que viven en ANP experimentan menos los efectos de la perturbación ambiental que los que viven fuera de ellas. Sin embargo, este supuesto no se había evaluado formalmente en ningún estudio con un primate, por lo que nosotros realizamos una comparación de los niveles de cortisol fecal de monos aulladores negros (*Alouatta pigra*) entre poblaciones que vivían en ANP y poblaciones que vivían en pequeños fragmentos de selva (Rangel-Negrín et al., 2014).

A través del monitoreo hormonal no-invasivo en heces de individuos pertenecientes a cinco poblaciones de monos aulladores negros durante dos años, encontramos que la variación en el cortisol fue muy consistente en cada tipo de hábitat, ya que los niveles de esta hormona no fueron significativamente diferentes en un mismo individuo entre estaciones (temporada de lluvias vs. sequía), tanto en las ANP como en los fragmentos de selva. Sin embargo, los niveles de cortisol fecal fueron aproximadamente un 20% más altos en muestras de individuos que vivían en fragmentos de selva que en aquellas provenientes de las ANP. Asimismo, mientras que en las ANP los ni-

veles promedio de cortisol de los individuos fueron más altos en la época del año en que los recursos fueron más escasos, en los fragmentos de selva no se observó una variación significativa en los niveles hormonales asociada a la estacionalidad climática.

En nuestro estudio, los monos aulladores negros que vivían en fragmentos de selva se enfrentaron a diversos estresores antropogénicos que no fueron observados en las ANP, como la presencia y ataques de perros, caza, incendios, tala de árboles o proximidad con humanos (Figura 2). Estos estresores tienen el potencial de aumentar los niveles de glucocorticoides de los individuos, por lo que esta investigación aportó por primera vez evidencia directa de un costo fisiológico asociado a la perturbación antropogénica en una especie de primate mexicano en vida libre. Ya que el mantenimiento de niveles de glucocorticoides elevados por periodos largos puede impactar negativamente a la reproducción y a la supervivencia de los individuos, es posible que las poblaciones de monos aulladores negros que viven en fragmentos no sean viables.

Perspectivas

En el contexto de la investigación de los efectos de la perturbación antropogénica sobre las poblaciones silvestres, el monitoreo de glucocorticoides realizado en diversos estudios ha permitido caracterizar las respuestas fisiológicas de estrés de los individuos a variaciones en diferentes factores, como la depredación, la contaminación o cambios en los patrones espaciales del hábitat. Menos conocidas, son las respuestas de estrés de la fauna silvestre a las actividades humanas en el momento en que estas ocurren. La mayoría de los estudios realizados, incluyendo el que describimos sobre monos aulladores negros, han correlacionado los niveles de glucocorticoides con algún indicador indirecto de la ocurrencia de actividades humanas, como la variación en el número de turistas registrados en las taquillas de parques naturales, o la comparación entre áreas con y sin turismo. Por lo tanto, nuestra capacidad de cuantificar los costos de la perturbación antropogénica y de predecir cómo reaccionarán los individuos a cambios en su entorno provocados por actividades antropogénicas es limitada. En la actualidad, nuestro grupo de investigación trabaja en el diseño e implementación de estudios que solucionen estas limitaciones. En particular, nos estamos concentrando en la medición de las respuestas hormonales de los primates silvestres a estímulos que simulan perturbaciones antropogénicas, como el ruido o la presencia humana.

Agradecimientos

Agradecemos a todos los que estuvieron involucrados en las actividades de campo que condujeron a los resultados presentados en este capítulo. Agradecemos igualmente a personas e instituciones que autorizaron y facilitaron nuestro trabajo, entre las que destacamos: Comisarios Ejidales de Abelardo Domínguez, Calax, Chekubul, Conhuas, Plan de Ayala; Carmen Gómez Ayuntamiento de Calakmul; Lic. C. Vidal y Lic. L. Álvarez, INAH Campeche; Biól. F. Durand Siller, Reserva de la Biósfera Calakmul, CONANP; Ing. V. Olvera, El Álamo. Gracias al Dr. Francisco García Orduña por invitarnos a preparar este capítulo y a los dos revisores que aportaron comentarios y correcciones que mejoraron notablemente el manuscrito. Ariadna Rangel y Pedro Dias agradecen a Mariana y Fernando la motivación a seguir aprendiendo sobre el comportamiento de los primates, humanos y no-humanos.

Referencias

1. Aguilar-Cucurachi M.S., Dias P.A.D., Rangel-Negrín A, Chavira R., Boeck L., Canales-Espinosa D. 2010. Accumulation of stress during translocation in mantled howlers. *American Journal of Primatology* 72:805–810
2. Moberg G.P. 2000. Biological responses to stress: implications for animal welfare. En: Moberg GP, Mench JA (eds.). *The Biology of Animal Stress*. CAB International, Wallingford (Estados Unidos de Norte América). Pp. 1–21.
3. Nelson R.J. 2000. *An Introduction to Behavioural Endocrinology*. Sinauer Associated, Inc, Sunderland, Massachusetts (Estados Unidos de Norte América).
4. Monfort S.L. 2002. Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations. En: Wildt DE, Holt W, Pickard A. (eds.) *Reproduction and Integrated Conservation Science*. Cambridge University Press, Cambridge (Reino Unido). Pp. 147–165
5. Palme P. 2005. Measuring fecal steroids. Guidelines for practical application. *Annals New York Academy of Sciences* 1046:75–80.
6. Rangel-Negrín A., Alfaro J.L., Valdez R.A., Romano M.C., Serio-Silva J.C. 2009. Stress in Yucatan spider monkeys: Effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations. *Animal Conservation* 12:496–502.
7. Rangel-Negrín A., Coyohua-Fuentes A., Chavira R., Canales-Espinosa D., Dias PAD. 2014. Primates living outside protected habitats are more stressed: the case of black howler monkeys in the Yucatán Peninsula. *PLOS ONE* 9(11): e112329.
8. Rangel-Negrín A, Flores-Escobar E., Chavira R., Canales-Espinosa D., Dias P.A.D. 2014. Physiological and analytical validations of fecal steroid hormone measures in black howler monkeys. *Primates* 55:459–465.
9. Romero L.M. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in Ecology and Evolution* 19:249–255.
10. Sapolsky R.M. 1990. Stress in the wild. *Scientific American* 262:106–113.
11. Whitten P.L., Stavisky R., Aureli F., Russell E. 1998. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology* 44:57–69.
12. Wasser S., Hunt E., Brown L., Cooper K., Crockett C., Bechert U., Millspaugh J., Larson S., Monfort L.S. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 120:260–275.