

**CONTENIDO DE CORTISOL Y CORTICOSTERONA EN PLASMA, SALIVA Y HECE DE TLACUACHES (*Didelphis virginiana*) MACHOS HABITANTES DE UNA LOCALIDAD SUBURBANA DE LOS VALLES CENTRALES DE OAXACA.<sup>1</sup>**

**[LEVELS OF CORTISOL AND CORTICOSTERONE IN PLASMA, SALIVA, AND FECES OF MALE OPOSSUMS (*Didelphis virginiana*) INHABITANTS OF A SUBURBAN AREA IN THE CENTRAL VALLEYS OF OAXACA]**

Rosa María Gómez Ugalde<sup>1§</sup>, José Alfredo Martínez Lucero<sup>1</sup>, Eufonio Reyes López<sup>1</sup>, Arturo Salame-Méndez<sup>2</sup>, María Isabel Pérez León<sup>1</sup> y Rodolfo Benigno de los Santos Romero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>TecNM/Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. C. P. 71230. Tel. 01 951 51 70 788. <sup>2</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco # 186. Vicentina. Iztapalapa, CP 09340. Apdo. Postal 55-535. México, D. F. rmgomez80@hotmail.com; alfreedom85@gmail.com, asam@xanum.uam.mx, leonisa70@hotmail.com; rdelossr@hotmail.com. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: (rmgomez80@hotmail.com).

**RESUMEN**

Los ambientes humanizados presentan diferentes desafíos para la vida silvestre sin embargo especies sinantrópicas como *Didelphis virginiana* parecen prosperar adecuadamente, desconociéndose como enfrenta fisiológicamente las condiciones creadas por el hombre. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar las concentraciones de cortisol y corticosterona en plasma, saliva y heces de machos de una población silvestre de *D. virginiana* que habita áreas suburbanas en relación con la estación del año (primavera-verano-otoño-invierno). Las muestras de plasma, saliva y heces de 17 individuos machos fueron analizadas con la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) y los valores obtenidos fueron comparados mediante estadística no paramétrica. Los resultados sugieren que *D. virginiana* es una especie cortisol dominante, que presenta variaciones estacionales no significativas en los tres sustratos analizados. La correlación positiva significativa entre las concentraciones de cortisol y corticosterona del plasma sugiere que las dos hormonas pueden estar mediando la respuesta al estrés. La existencia de una correlación negativa entre el cortisol plasmático y el cortisol en heces y el registro de individuos con una proporción cortisolcorticosterona menor a uno puede ser producto de procesos metabólicos propios de la especie que reflejan que el cortisol está siendo utilizado en mayor proporción que la corticosterona.

**Palabras clave:** Estrés, glucocorticoides, hormonas, marsupiales.

**ABSTRACT**

Humanized environments present different challenges for wildlife, however synanthropic species such as *Didelphis virginiana* seem to face them adequately, not knowing how physiologically the conditions created by man are faced. The physiological response of organisms that implies an increase in circulating glucocorticoid concentrations to

<sup>1</sup> Recibido: 20 de febrero de 2018.

Aceptado: 10 de diciembre de 2018

environmental changes can adversely affect population dynamics. Therefore, the objective of this research was to evaluate the cortisol and corticosterone concentrations in plasma, saliva, and feces of males from a wild population of *D. virginiana* that inhabits suburban areas in relation to the season of the year (spring-summer-autumn-winter). The samples of plasma, saliva, and feces of 17 male individuals were analyzed with the enzyme immunoassay (EIA) technique. The results obtained suggest that *D. virginiana* is a dominant cortisol species, which presents non-significant seasonal variations with a higher concentration of cortisol in the winter period. The cortisol and corticosterone concentrations detected in plasma suggest that the two hormones may be mediating the stress response. The use of feces as a non-invasive method in *D. virginiana*, requires information to identify the way in which these organisms are metabolizing the two hormones.

**Index words:** Stress, glucocorticoids, hormones, marsupials.

## INTRODUCCIÓN

La complejidad e importancia de la fisiología del estrés han sido reconocidas en diferentes taxones de mamíferos (Hing *et al.*, 2014), utilizando en su mayoría a especies en alguna categoría de riesgo como modelo de estudio. En general las especies que prosperan en los ecosistemas creados por el hombre han recibido menos atención, desconociéndose como se enfrentan fisiológicamente a estímulos estresantes, como la fragmentación de su hábitat, un clima alterado (Bateman y Fleming, 2012), presencia permanente de humanos, densidades más altas de depredadores no nativos (por ejemplo, gatos y perros), ruido, contaminación lumínica, tráfico (Partecke *et al.*, 2006). La evidencia sugiere que la vida silvestre que reside en áreas urbanas puede no exhibir los mismos rasgos de historia de vida que sus contrapartes rurales debido a la adaptación a las tensiones inducidas por el hombre (Ditchkoff *et al.*, 2006). Las respuestas fisiológicas de los organismos a los cambios ambientales pueden afectar adversamente la dinámica de la población y reducir la resistencia a las enfermedades (Davies *et al.*, 2013). En comparación con otros taxones, se sabe relativamente poco sobre la respuesta fisiológica al estrés en marsupiales en general y mucho menos de los marsupiales del continente americano (Hing *et al.*, 2014). *Didelphis virginiana*, una de las nueve especies de marsupiales con distribución en México (Ramírez-Pulido, 2014), es capaz de soportar cambios en su hábitat (Sunquist *et al.*, 1987; Markovchick-Nicholls *et al.*, 2007,) y prefiere áreas desarrolladas (Kanda *et al.*, 2006; Markovchick-Nicholls *et al.*, 2008), debido a su capacidad de explotar recursos antropogénicos (Clark, 1994; Beatty *et al.*, 2014).

En estudios recientes se sugiere que los ambientes humanizados han favorecido la expansión de *D. virginiana* hacia el norte de su rango geográfico (Beatty *et al.*, 2014; 2016), sin embargo, su necesidad de fuentes agua, la densidad de viviendas en entornos altamente urbanos (Fidino *et al.*, 2016) y el porcentaje del área urbanizada (Ordeñana *et al.*, 2010) pueden influenciar negativamente su distribución. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue evaluar las concentraciones de cortisol y corticoesterona en plasma, saliva y heces de machos de una población silvestre de *D. virginiana* que habita áreas suburbanas en relación con la estación del año (primavera-verano-otoño-invierno) y condición reproductiva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El estudio se realizó en el Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO; coordenadas extremas 17° 03' y, 16° 58' latitud norte y 96° 43' y 96° 48' de longitud oeste, a 1519 msnm). Las casi 40 ha del ITVO, se ubican en la agencia de policía de San Jesús de Nazareno, Municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Región de los Valles Centrales de Oaxaca a una distancia de 10 kilómetros de la capital del estado. San Jesús de Nazareno, colinda al norte y este con el área urbana de la cabecera municipal, al sur con el municipio de Cuilapam de Guerrero y al noroeste con la agencia de policía de San Francisco Javier. Fisiográficamente el área de estudio pertenece a la provincia de la Sierra Madre del Sur (INEGI, 2010). La superficie de San Jesús de Nazareno está irrigada en su mayor parte por el Río Nazareno, afluente de la Subcuenca Río Atoyac-Oaxaca de Juárez, Cuenca del Río Atoyac, Región Costa Chica-Río Verde (Martínez-Ramírez *et al.*, 2004). En la zona de estudio prevalece un clima cálido seco con una temperatura media anual de 21°C, la precipitación anual varía de 561.4 a 733.7 mm; registrándose el periodo de lluvias de mayo a octubre; con frecuencia, en agosto se registra una sequía intraestival denominada localmente como 'canícula' (García, 1989). El tipo de suelo dominante es vertisol. La mayor parte de la vegetación nativa ha sido eliminada para el establecimiento de actividades agrícolas y pecuarias con presencia de pastizal inducido y pequeños remanentes de selva baja caducifolia. La densidad estimada de viviendas por hectárea en San Jesús de Nazareno es de 20 y el número de habitantes es de 1584 (INEGI, 2010) la cual se incrementa por población estudiantil ITVO que para el 2016 fue de 1340 alumnos, con actividades entre las 7:00 y las 19:00 h con una mayor presencia en el turno matutino (7:00 a 13:00 h).

### Captura de ejemplares

Durante la realización de este estudio no se sacrificaron organismos y se tomaron en cuenta las características de la especie, criterios éticos y la normatividad vigente en materia de vida silvestre (DOF, 2010), para lo cual se contó con el permiso de colecta correspondiente (SGPA/DGVS/03773/16).

Como método de colecta se utilizó captura en vivo con 20 trampas Tomahawk (30''X10''X12''), para mamíferos medianos, distribuidas al azar con una separación entre ellas de al menos 100 metros. Las trampas se cebaron con sardina y permanecieron activas de 7 pm a 6 am. Con el fin de reducir el estrés por captura las trampas se revisaron cada hora. Los organismos machos capturados fueron trasladados al sitio de obtención de muestras de heces, sangre y saliva. Cada ejemplar se categorizó en (a) no reproductivos y (b) reproductivos por la presencia o no de los testículos escrotados (Kunz *et al.*, 1996). Se procesaron un total de 17 organismos adultos de los cuales 10 fueron machos reproductivos (R) distribuidos en las cuatro estaciones del año en tanto que los individuos no reproductivos (NR) solo se capturaron en el otoño e invierno. Una vez realizado el procedimiento los organismos se liberaron en el sitio de captura. Solo se incluyeron en este estudio organismos a los cuales se les extrajo muestras de sangre, saliva y heces.

## Toma de muestras

**Sangre.** De cada individuo capturado se extrajo de la vena caudal 1.5 mL de sangre con jeringas de 3 mL y aguja de 25 mm x 21 o 23G según Morton *et al.* (1993). La muestra obtenida se transfirió a un tubo con anticoagulante BD Vacutainer K3 EDTA de 5mL. La sangre se centrifugó (C600 Solbat®) a 1000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente para separar el paquete celular del plasma. El plasma se transfirió con ayuda de una pipeta Pasteur a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se etiquetaron con un código alfanumérico y se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

**Saliva.** La toma de la muestra de saliva se llevó a cabo de forma manual al momento de la extracción de sangre mediante aspiración con una pipeta de transferencia de la cavidad oral. La recolección de cada muestra no tomó más de dos minutos. La saliva obtenida se depositó en un tubo Eppendorf manteniéndose a -20°C hasta su análisis.

**Heces.** La colecta de muestras fecales se realizó inmediatamente después de su deposición y durante el proceso de contención para la extracción de sangre y saliva. Las heces que no se contaminaron con orina se colectaron en un frasco de polietileno o directamente del suelo inmediatamente después de ser evacuadas por los tlacuaches. Las muestras se rotularon con la identificación del individuo y fecha de colecta, y a cada tubo se les agregaron de 100 a 500 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de etanol al 96 % y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

**Extracción de hormonas fecales.** Cada muestra de heces una vez descongelada se llevó a peso seco a temperatura ambiente. Para reducir sesgos en las mediciones de glucocorticoides (GC) en muestras fecales pequeñas (Goymann, 2005; Millspaugh, y Washburn, 2004), solo se incluyeron en el estudio muestras con pesos secos superiores a 0.1 g. Las muestras de heces secas de peso conocido se colocaron en un tubo de ensayo con 1 mL de etanol al 90 % y se homogenizaron con vórtex por 10 segundos y se dejaron reposar por 24 horas. El sobrenadante se separó y se mantuvo a -20°C hasta la determinación de los GC.

**Determinación de GC.** La valoración de cortisol y corticosterona en plasma, saliva y heces se hizo por el método de enzimo-inmuno análisis (EIA por sus siglas en inglés) utilizando estuches (Diagnostic Systems Laboratories. Instruments GmbH, Division of DRG, Inc®. Frauenbergstr, Germany); la metodología se hizo siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. La concentración de cada hormona se hizo utilizando un lector de placas para ELISA (Microplate Reader, MR600 Stat Fax® 4200. Dynatech, Alexandria, VA, EE. UU.). Para cada ensayo hormonal se hizo una curva utilizando los estándares de cada estuche. La especificidad del antisuero para cortisol y corticosterona y la linealidad descrita por el fabricante en cada estuche se validaron mediante pruebas de concentraciones conocidas de cortisol y corticosterona (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EE. UU.). El porcentaje de recuperación de cortisol (linealidad) fue de  $96 \pm 1.2$  y  $97 \pm 1.3$  para corticosterona. La reactividad cruzada del kit de cortisol fue del 100 % con cortisol y del  $45 \pm 0.7$  % para corticosterona. Por su parte, el kit de corticosterona fue del 100 % para corticosterona y  $0.3 \pm 0.2$  % para cortisol. La sensibilidad del ensayo (concentración mínima) para cortisol fue de  $2.5 \text{ ng mL}^{-1}$  y  $0.57 \text{ ng mL}^{-1}$  para corticosterona.

## Análisis estadístico

Los datos se agruparon por estaciones del año (primavera, verano, otoño e invierno) y estadio reproductivo (activos e inactivos). Las concentraciones de GC en el plasma, saliva y heces se presentan como media  $\pm$  error estándar (ES). Como los valores de GC no se distribuyeron normalmente, se utilizó un análisis no paramétrico. Las diferencias entre las concentraciones estacionales de cortisol y corticosterona se calcularon mediante la prueba de Kruskal-Wallis y para el análisis de correlaciones se utilizó la prueba Rho de Spearman. El análisis estadístico se realizó con el programa libre R (R Development Core Team, 2017)

## RESULTADOS

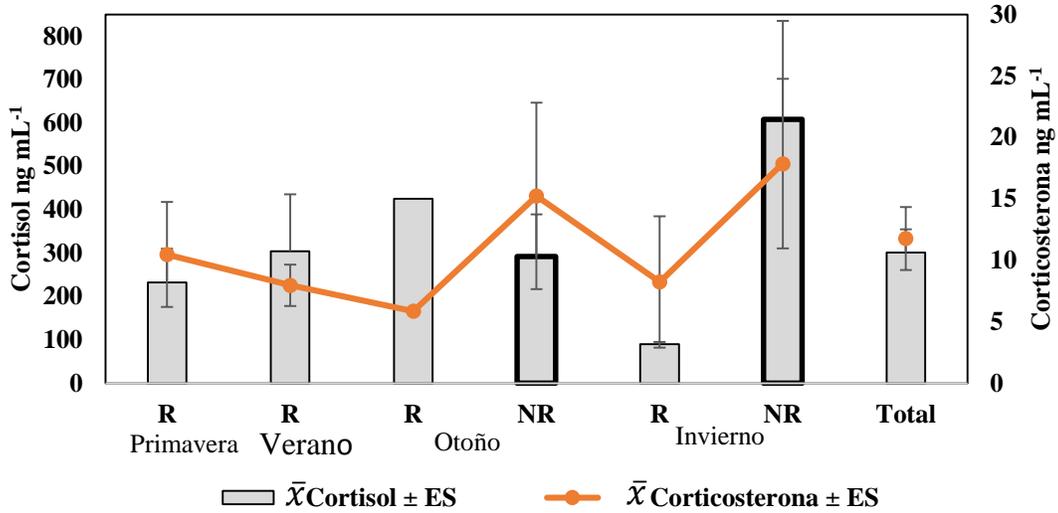
**Plasma.** La concentración promedio total de corticosterona (Co) y cortisol (Cort) en plasma (Pl) de machos de *Didelphis virginiana* ( $n = 17$ ) fue de  $11.761 \pm 2.560$  y  $301.3294 \pm 53.594$  ng mL<sup>-1</sup> respectivamente (Fig. 1). La mayor concentración plasmática promedio registrada de corticosterona ( $\bar{X}_{n=6} = 13.666 \pm 6.384$  ng mL<sup>-1</sup>) ocurrió en el otoño, observándose un valor cercano al registrado en el invierno ( $\bar{X}_{n=4} = 13.045 \pm 4.520$  ng mL<sup>-1</sup>). La mayor concentración promedio de cortisol ( $\bar{X}_{n=4} = 348.9 \pm 175.997$  ng mL<sup>-1</sup>) se registró en el periodo invernal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones promedio obtenidas por temporada ( $H_{PICo(3,17)} = 0.542$   $p = 0.909$ ;  $H_{PICort(3,18)} = 0.229$   $p = 0.973$ ).

Al considerar el estado reproductivo de los individuos se registraron concentraciones promedio totales de corticosterona y cortisol más elevadas en los no reproductivos ( $\bar{X}_{PICoNR} = 15.978 \pm 5.465$  ng mL<sup>-1</sup>;  $\bar{X}_{PICortNR} = 382.414 \pm 101.762$  ng mL<sup>-1</sup>) debido a los valores obtenidos especialmente en el periodo invernal ( $\bar{X}_{PICoNR} = 17.855 \pm 6.899$  ng mL<sup>-1</sup>;  $\bar{X}_{PICortNR} = 608.05 \pm 226.950$  ng mL<sup>-1</sup>). Se observa que en los individuos reproductivos el cortisol se incrementa de primavera a otoño y disminuye en invierno ocurriendo lo contrario para la corticosterona (Figura 1). La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre las concentraciones de corticosterona de individuos no reproductivos y reproductivos registrados en las cuatro estaciones del año ( $H_{PICo,5 N=17} = 1.525$ ,  $p = 0.910$ ;  $H_{PICort} = 4.727$ ,  $p = 0.4501$ ).

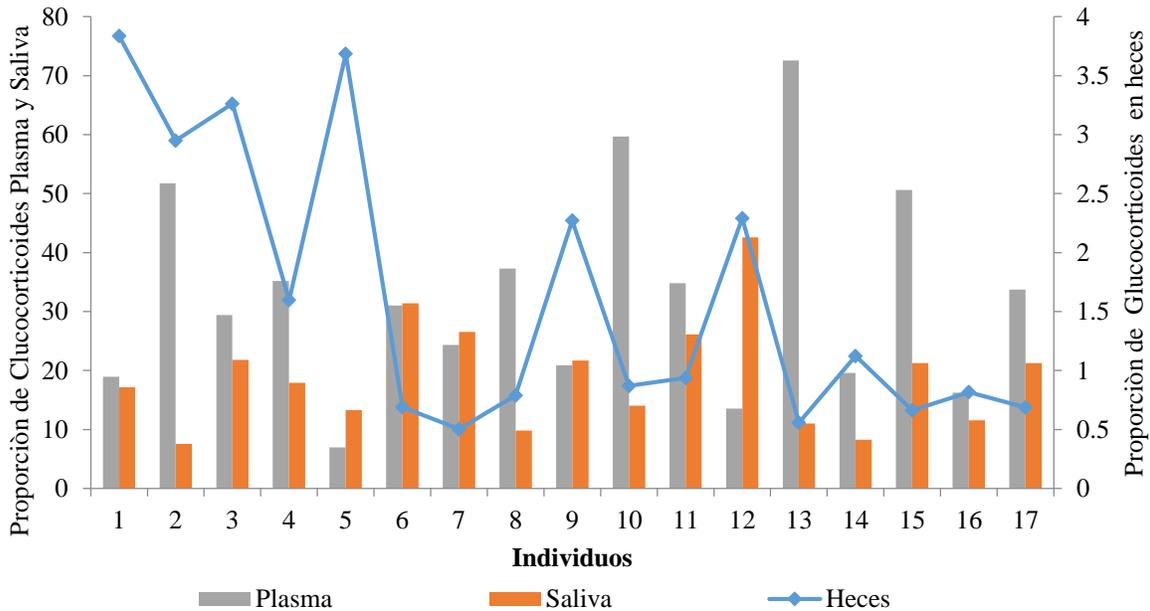
Los resultados obtenidos en plasma indican que esta especie secreta principalmente cortisol (proporción de glucocorticoides cortisol/corticosterona  $> 1$ ) con una relación media de glucocorticoides de  $32.735 \pm 4.252$  ng mL<sup>-1</sup>. Lo anterior se apoya en que todos los individuos analizados en este estudio secretaron principalmente cortisol expresando valores que oscila entre 6.983 y 72.586 (Figura 2). La correlación entre las concentraciones de cortisol y corticosterona existente en el plasma sanguíneo fue estadísticamente significativa ( $r = 0.797$   $p < 0.01$ ).

**Saliva.** La concentración promedio total de corticosterona y cortisol en muestras de saliva (Sa) de machos ( $n = 17$ ) de *D. virginiana* fue de  $2.107 \pm 0.224$  ng mL<sup>-1</sup> y  $33.812 \pm 2.133$  ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Registrándose la mayor concentración promedio de corticosterona en los individuos capturados durante el otoño ( $\bar{X} = 2.329 \pm 0.456$  ng mL<sup>-1</sup>). Las concentraciones promedio de cortisol de las cuatro estaciones del año fueron similares, disminuyendo en los organismos activos sexualmente en otoño (Figura 3), con una concentración promedio más elevada en la primavera ( $\bar{X} = 35.8 \pm 7.913$  ng mL<sup>-1</sup>).

Los resultados obtenidos en saliva como proporción de glucocorticoides mostro el mismo comportamiento que en plasma con una relación cortisol/corticosterona > 1 con un promedio de glucocorticoides de  $19.005 \pm 2.232$ , sin embargo, los valores fueron más bajos oscilando entre 7.542 y 42.573 (Figura 2).

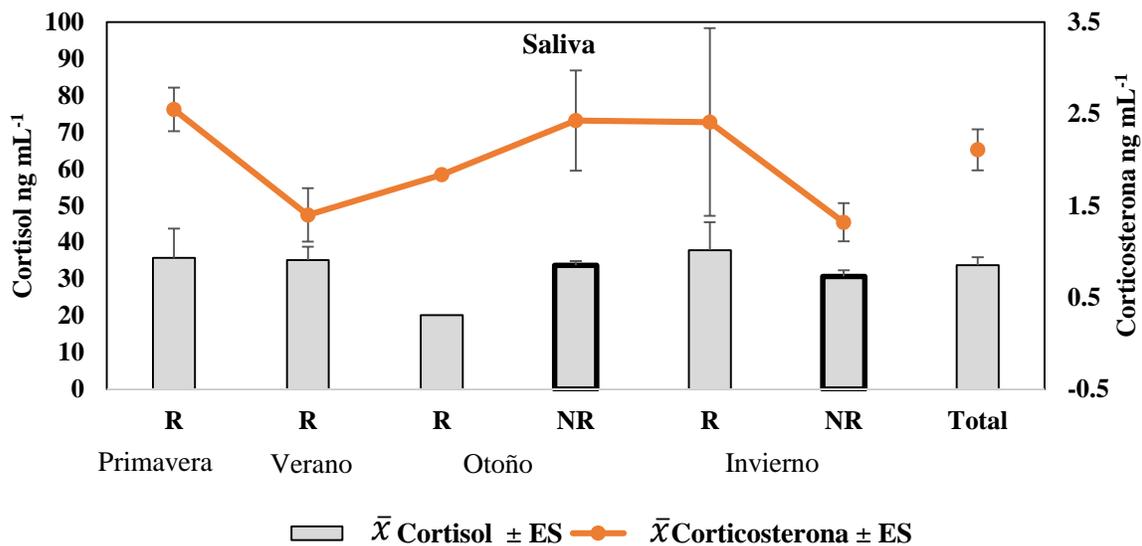


**Figura 1.** Concentración estacional de corticosterona y cortisol en plasma de machos de *Didelphis virginiana* en cada condición reproductiva (R = machos reproductores, NR Machos no reproductivos); las líneas verticales sobre las barras y en las líneas representan el error estándar.



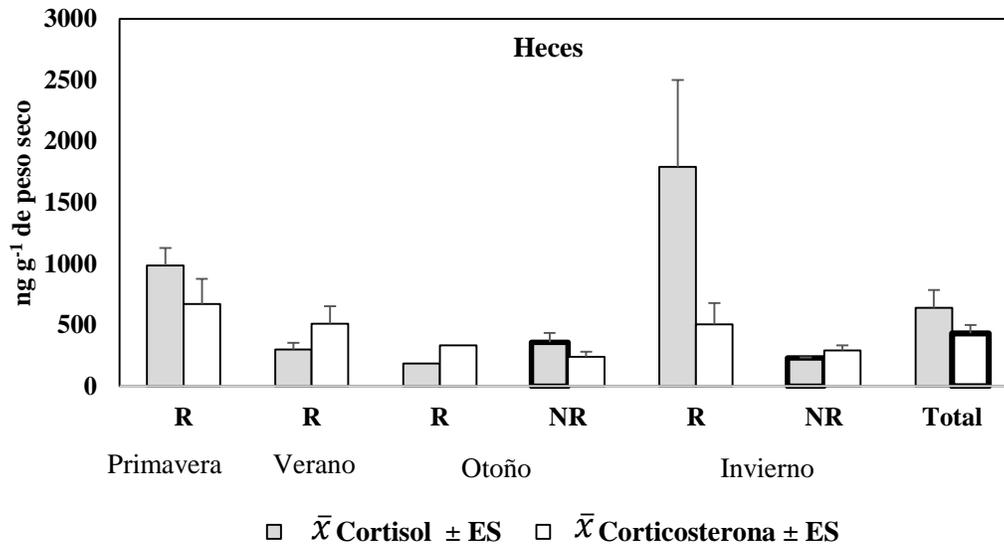
**Figura 2.** Proporción de glucocorticoides en plasma, saliva y heces por individuo de *Didelphis virginiana* machos adultos.

Al analizar el efecto de la condición reproductiva las concentraciones de cortisol y corticosterona promedio total en saliva de machos reproductores son similares a las que exhiben los individuos no reproductivos ( $\bar{X}_{\text{SaCoR}} = 2.1044 \pm 0.254 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $\bar{X}_{\text{SaCoNR}} = 2.110 \pm 0.431 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $\bar{X}_{\text{SaCortR}} = 34.47 \pm 3.624 \text{ ng mL}^{-1}$ ;  $\bar{X}_{\text{SaCortNR}} = 32.871 \pm 1.032 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Resaltando que en los machos reproductivos la concentración de cortisol disminuyó en otoño. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones promedio de cortisol y corticosterona obtenidas tanto entre estaciones ( $H_{\text{SaCo}(3,17)} = 4.452 p = 0.217$ ;  $H_{\text{SaCort}(3,17)} = 0.176 p = 0.981$ ), como entre lo observado en organismos reproductores y no reproductivos entre estaciones ( $H_{\text{SaCo}(5,17)} = 6.153 p = 0.291$ ;  $H_{\text{SaCort}(5, N=17)} = 2.792 p = 0.732$ ).



**Figura 3.** Concentración estacional de corticosterona y cortisol en saliva de machos de *Didelphis virginiana* en cada condición reproductiva (R = machos reproductores, NR = machos no reproductivos); las líneas verticales sobre las barras y en las líneas representan el error estándar.

**Heces.** La concentración de corticosterona y cortisol en heces (F) varió de 118.152 ng g<sup>-1</sup> y 831.00 ng g<sup>-1</sup> y entre 145.113 ng g<sup>-1</sup> y 2500.816 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, con un valor promedio para corticosterona de  $400.126 \pm 46.8055 \text{ ng g}^{-1}$  y de cortisol de  $553.198 \pm 135.037 \text{ ng g}^{-1}$ . La mayor concentración promedio de corticosterona ( $\bar{X}_{\text{FCo}} = 511.785 \pm 119.325 \text{ ng g}^{-1}$ ) y de cortisol ( $\bar{X}_{\text{FCort}} = 1111.728 \pm 535.529 \text{ ng g}^{-1}$ ) ocurrió en la primavera y en el invierno respectivamente (Figura 4). Las diferencias observadas entre las concentraciones de las cuatro estaciones del año no resultaron estadísticamente diferentes ( $H_{\text{FCo}(3,17)} = 0.542 p = 0.909$ ;  $H_{\text{FCort}(3,17)} = 5.375 p = 0.1463$ ). La mayor concentración de corticosterona y cortisol en heces se registró en individuos activos reproductivamente de la primavera y del periodo invernal respectivamente sin llegar a ser estadísticamente significativa ( $H_{\text{FCo}(5,17)} = 13.384 p = 0.020$ ; Figura 3).



**Figura 4.** Concentración estacional de corticosterona y cortisol en heces de machos de *Didelphis virginiana* en cada condición reproductiva (R = machos reproductivos, NR = machos no reproductivos); las líneas verticales sobres las barras y en las líneas representan el error estándar.

La proporción promedio de glucocorticoides cortisol/corticosterona registrada en heces fue mayor a uno, con una relación media de glucocorticoides de  $1.619 \pm 0.285$ , sin embargo, individualmente se registraron organismos con valores menores a uno por lo que la relación cortisol/corticosterona osciló entre 0.502 y 3.837 (Figura 2).

La correlación múltiple entre las concentraciones de corticosterona y cortisol existente en plasma, saliva y heces refleja una relación negativa estadísticamente significativa entre las concentraciones de PICort y FCort ( $r = -0.519$ ;  $p = 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

La determinación de concentraciones de GC en plasma y saliva son adecuadas para estudiar respuestas de estrés agudas o de corto plazo (Nemeth *et al.*, 2106); sin embargo, el estrés durante los procedimientos de captura y toma de muestra en *D. virginiana* incrementa los niveles basales (Cook, 2000). A pesar de lo anterior, su medición nos permite saber la carga fisiológica de estrés presente (Goymann, 2005), también denominada carga alostática (Wingfield *et al.*, 1998; Goymann y Wingfield, 2004). Las concentraciones de GC detectadas no reflejaron diferencias estadísticas relacionadas con la estación del año y el estado reproductivo en los tres sustratos analizados, sugiriendo que a lo largo del año los estímulos estresantes aparentemente no provocan una respuesta diferencial. Si consideramos que en el invierno los organismos tienen que hacer frente a la reproducción, bajas temperaturas y una menor cantidad de recursos, se esperaría que se produjeran niveles más elevados de GC a los registrados en la primavera o verano, lo cual ocurre sin llegar a ser estadísticamente diferentes. Es probable que la intensidad de la respuesta a los factores estresantes no sea tan elevada debido a las condiciones de un hábitat suburbano en comparación a lo que ocurriría en ambientes prístinos, donde los recursos alimenticios presentan una marcada variación

estacional, así como estar más alertas a la presencia de predadores y en la búsqueda y defensa de territorios.

Especies sinantrópicas como *D. virginiana*, pueden sobrevivir en ambientes suburbanos (Bateman y Fleming, 2012), como el existente en el área de estudio debido a su capacidad de explotar la basura, cultivos de melón, sandía, maíz y otros granos (Clark, 1994; Beatty *et al.*, 2014), que tienen a su disposición. Los recursos antropogénicos existentes le permiten soportar el frío invernal y la falta de alimentos naturales (Kanda, 2005), que, si bien se reducen en el invierno, debido a los ciclos de cultivo, el periodo vacacional decembrino y el receso intersemestral de la población estudiantil del ITVO, aparentemente no se ve reflejado en una variación significativa en la secreción de GC.

La variación en la magnitud de la secreción de glucocorticoides entre individuos analizados puede indicar una respuesta diferencial ante un factor estresante; donde algunos animales exhiben poca o ninguna respuesta mientras que, en otros, la respuesta es mayor (Cockrem, 2013). Lo anterior pueden atribuirse a las variaciones individuales en la actividad suprarrenal, influenciada por cómo perciben los individuos su medio ambiente, por ejemplo, experiencias previas, variaciones en la temperatura ambiental, disponibilidad de alimentos y depredación, que en conjunto pueden desencadenar fluctuaciones en la tasa metabólica de los animales en vida libre (Goymann, 2012). El beneficio obtenido por los tlacuaches en ambientes urbanizados (disponibilidad de alimento) puede compensar el riesgo de depredación (perros y gatos) y la constante presencia humana a largo plazo (respuesta al estrés crónico), reflejando una plasticidad en la respuesta individual dependiente del beneficio obtenido en su adecuación biológica (Bonstra, 2013). En este sentido los factores que conducen a la variación individual observada y la medida en que esta variación es adaptativa o no adaptativa son poco conocidos en la mayoría de los animales (Cockrem, 2013).

La correlación positiva entre PLCort y PICo indica que ambas hormonas pueden estar mediando la respuesta a las condiciones de estrés y/o requerimientos durante la reproducción (Koren *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en *D. virginiana* sustentan al cortisol como el GC “dominante”, con una amplia variación en la relación promedio de cortisol-corticosterona similar a la reportada por Koren *et al.* (2012) en diferentes especies de mamíferos.

Las hormonas fecales representan una medida promedio integrada (según el tiempo de tránsito intestinal: Palme *et al.*, 2005; Touma y Palme, 2005), en tanto que las concentraciones plasmáticas reflejan un instante en la vida del organismo (Goymann, 2005) por lo que las correlaciones entre las concentraciones de glucocorticoides de plasma y heces observables pueden ser bajas o inexistentes (Goymann, 2005). Las concentraciones de FCort menores o muy cercanas a las concentraciones de FCo (proporción de FGC menores a uno) y la correlación negativa observada entre PICort y FCort sugiere que a mayor PICort circulante existe una menor excreción de cortisol. Lo anterior puede ser producto de procesos metabólicos propios de la especie que reflejan que el cortisol está siendo utilizado en mayor proporción que la corticosterona.

A pesar de que existieron organismos (no incluidos) que no presentaron secreción salival, la obtención de saliva en *D. virginiana* es menos traumática y se llega a obtener en menor

tiempo en comparación con las muestras de plasma, lo que puede facilitar la recolección en investigaciones que requieren muestreos frecuentes y por tanto ser menos invasivo. Sin embargo, para decidir si en esta especie el cortisol salival es una mejor medida de la función cortical suprarrenal que el cortisol plasmático es necesario explorar la importancia de la variabilidad registrada (Fenske, 1997), considerando un mayor tamaño de muestra y la respuesta del organismo al manejo.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio, la metodología utilizada permitió detectar el cortisol y corticosterona en plasma, saliva y heces de machos de *Didelphis virginiana* tanto activos como inactivos reproductivamente, representa el primer acercamiento con metodologías invasivas y no invasivas en el estudio del estrés fisiológico en esta especie. La secreción de cortisol y corticosterona de los tlacuaches machos en la zona de estudio *D. virginiana* parece no verse influenciada de forma significativa por las estaciones del año y la condición reproductiva. *D. virginiana* se puede considerar una especie cortisol dominante; sin embargo, la proporción de glucocorticoides menor a uno registrada en las heces de algunos individuos refleja procesos metabólicos propios de la especie que plantean la necesidad de abordar su estudio a mayor profundidad antes de ser utilizadas como método no invasivo en esta especie.

## LITERATURA CITADA

- Bateman, P. W. and P. A. Fleming. 2012. Big city life: carnivores in urban environments. *Journal of Zoology* 287:1-23.
- Beatty, W. S., J. C. Beasley and O. E. Rhodes. 2014. Habitat selection by a generalist mesopredator near its historical range boundary. *Canadian Journal of Zoology* 92(1): 41-48.
- Beatty, W. S., J. C. Beasley, Z. H. Olson and O. E. Rhodes. 2016. Influence of habitat attributes on density of Virginia opossums (*Didelphis virginiana*) in agricultural ecosystems *Canadian Journal of Zoology*, 94(6):411-419.
- Bonstra, R. 2013. The ecology of stress: Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology*, 27:11-23.
- Clark, K. D. 1994. Managing raccoons, skunks, and opossums in urban settings. *Proceedings of the Sixteenth Vertebrate Pest Conference* 10:317-319.
- Cockrem, J. F. 2013. Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology* 181:45-58.
- Cook, C.J., D. J. Mellor, P. J. Harris, J. R. Ingram and L. R. Matthews, 2000. Hands-on and hands-off measurement of stress. *In: Moberg, G.P., and J. A. Mench (eds.). The Biology of Animal Stress. Basic Principles and Implications for Animal Welfare* CABI Publishing, New York, pp. 123-146.
- Davies, N., A. Gillett, C. McAlpine, L. Seabrook, G. Baxter, D. Lunney and A. Bradley. 2013. The effect of ACTH upon faecal glucocorticoid excretion in the koala. *Journal of Endocrinology* 219:1-12.
- Ditchkoff, S. S., S. T. Saalfeld and C. J. Gibson. 2006. Animal behavior in urban ecosystems: Modifications due to human-induced stress. *Urban Ecosystems* 9: 5-12.
- DOF (Diario oficial de la Federación). 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna

- silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-  
Lista de especies en riesgo.
- Fenske, M. 1997. The use of salivary cortisol measurements for the non-invasive assessment of adrenal cortical function in guinea pigs. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 105(1997): 163-168.
- Fidino, M. A., E. W. Lehrer and S. B. Magle. 2016. Habitat Dynamics of the Virginia Opossum in a Highly Urban Landscape. *The American Midland Naturalist* 175(2):155-167.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana), 4ª. ed. Ed. Instituto de Geografía-UNAM, México.
- Goymann, W. 2005. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings-physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels in Bird hormones and bird migrations: analyzing hormones in droppings and egg yolks and assessing adaptations in long-distance migration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 35-53.
- Goyman, W. 2012. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods in Ecology and Evolution* 3:757-765.
- Goymann, W. and J. C. Wingfield. 2004. Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter. *Animal and Behavior* 67: 591-602.
- Goymann, W. 2012. On the use of non-invasive hormone research in uncontrolled, natural environments: the problem with sex, diet, metabolic rate and the individual. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 757-765.
- Hing, S., E. Narayan, R. C. A. Thompson and S. Godfrey. 2014. A review of factors influencing the stress response in Australian marsupials. *Conservation Physiology* 2:1-17.
- INEGI (Instituto Nacional de Geografía y Estadística). 2010. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos.
- Kanda, L. L. 2005. Winter energetics of Virginia opossums *Didelphis virginiana* and implications for the species' northern distributional limit. *Ecography* 28: 731-744.
- Kanda, L.L, T. K. Fuller and P. R. Sievert. 2006. Landscape Associations of Road-killed Virginia Opossums (*Didelphis virginiana*) in Central Massachusetts. *The American Midland Naturalist* 156(1):128-134.
- Koren, L., D. Whiteside, Å. Fahlman, K. Ruckstuhl, S. Kutz, S. Checkley, M. Dumond and K. Wynne-Edwards. 2012. Cortisol and corticosterone independence in cortisol-dominant wildlife. *General and Comparative Endocrinology* 177: 113-119.
- Kunz, T. H., C. Wemmer and V. Hayssen. 1996. Sex, age, and reproduction. *In*: E. Wilson, F. C. Russell, D. J. Nichols, R. Rasanayagam and M. S. Foster (eds). *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Mammals*. Smithsonian Institution Press. Washington and London. USA. 279 -290 pp.
- Markovchick-Nicholls, L., H. M. Regan, D. H. Deutschman, A. Widyanata, B. Martin, L. Noreke, and T. A. Hunt. 2007. Relationships between human Disturbance and Wildlife Land Use in Urban Habitat Fragments. *Conservation Biology* 22: 99-109.
- Martínez-Ramírez, E., I. Doadrio-Villarejo, y A. De Sostoa-Fernández. 2004. Peces continentales. Biodiversidad de Oaxaca. (A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez, and M. Briones-Salas, eds.). Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza-Worlf Wildlife Foundation. México.

- Millspaugh, J. and B. E. Washburn. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology* 138: 189-199.
- Morton, D. B., D. Abbot, R. Barclay, B. S. Close, R. Ewbank, D. Gask, M. Heath, S. Mattic, T. Poole, J. Seamer, J. Southee, A. Thompson, B. Trussel, C. West and M. Jennings. 1993. Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio. *Laboratory Animals* 27: 1-22.
- Nemeth, M., E. Pschernig, B. Wallner and E. Millesi. 2016. Non-invasive cortisol measurements as indicators of physiological stress responses in guinea pigs. *PeerJ* 4: 1-21.
- Ordeñana, M. A., K. R. Crooks, E. E. Boydston, R. N. Fisher, L. M. Lyren, S. Siudyla, C. D. Haas, S. Harris, S. A. Hathaway, G. M. Turschak, A. K. Miles and D. H. Van Vuren. 2010. Effects of urbanization on carnivore species distribution and richness. *Journal of Mammalogy* 91(6):1322-1331.
- Palme, R. 2005. Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 75-80.
- Partecke, J, I. Schwabl and F. Gwinner. 2006. Stress and the city: Urbanization and its effects on the stress physiology in European blackbirds. *Ecology* 87: 1945-1952.
- R Development Core Team. 2017. Contributed Packages. <https://www.r-project.org/> (Consultado: 15/12/2017).
- Ramírez-Pulido, J., N. González-Ruiz, A. L. Gardner, and J. Arroyo-Cabrales. 2014. List of Recent Land Mammals of Mexico 2014. Special Publications Museum of Texas Tech University 63: 1-76.
- Sunquist, M. E., S. N. Austad and F. Sunquist. 1987. Movement patterns and home range in the common opossum (*Didelphis marsupialis*). *Journal of Mammalogy* 68: 173-176.
- Touma, C. and R. Palme. 2005. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 54-74.
- Wingfield, J. C., D. L. Maney, C. W. Breuner, J. D. Jacobs, S. Lynn, M. Ramenofsky and R. D. Richardson. 1998. Ecological bases of hormone-behavior interactions: the “emergency life history stage”. *American Zoology* 38: 191-206.