



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DETERMINACIÓN DE GLUCOCORTICOIDES EN *Urocyon cinereoargenteus* EN EL SANTUARIO DE BOSQUE DE NIEBLA, XALAPA, VERACRUZ.

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:  
ARANTXA PAMELA HUERTA ARVIZU

DIRECTORA:  
DRA. CAROLINA VALDESPINO QUEVEDO

CoDIRECTOR:  
M. en C. SERGIO ALBINO MIRANDA



MARZO, 2024

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mis directores de tesis la Dra. Valdespino Quevedo y al M. en C. Sergio Albino Miranda quienes compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia, pero, sobre todo el apoyo, dedicación y la paciencia para poder llevar a cabo este proyecto de tesis.

También quiero agradecer al Instituto de Ecología A. C., por permitirme trabajar en sus instalaciones y por el material otorgado para la realización de este proyecto y a la Red de Biología de Vertebrados, por su tiempo y apoyo.

A Zoila, Suguey, Luis y a todas las personas que me acompañaron a mis muestreos, que mientras caminábamos me mostraban un poquito de cada uno de sus intereses y que hicieron que mi estancia fuera más divertida.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a cada uno de los docentes por brindarme los conocimientos que me ayudaron a hacer posible este proyecto.

A mis revisores de tesis el Dr. Jesús Martínez Vázquez y a la Dra. Adriana Berenice Silva Gómez, por tomarse el tiempo de analizar y darme sus comentarios para la buena finalización de este trabajo

El mayor de los agradecimientos es para las personas más importantes y valiosas en mi vida, mis papás, que siempre han creído en mí y en lo que puedo lograr, que sin importar lo cerca o lejos que estemos están ahí, apoyándome y guiándome en el camino de la vida, sin ellos no estaría aquí culminando esta etapa de mi vida, los quiero mucho.

A mis hermanas, que hacen que mi vida sea más alegre. Layla, que además de ser mi compañera de vida es mi amiga y confidente, que me ha enseñado que rendirse nunca es opción, te quiero hermana. Michelle, mi otra compañera de vida, quien me ha demostrado que si uno quiere lo hace, sin importar cuanto nos cueste, te quiero

Mich. Creer en mi es un trabajo duro y ellas lo hacen más fácil. Y no me podía olvidar de Cherry y Coco, mis bebés perrunas.

A Tristan por su apoyo y complicidad, por que juntos y separados siempre estuvo impulsándome, gracias por hacer mi vida más feliz y divertida por creer en mí y por tu amor incondicional.

Por último, quiero agradecer a la zorra gris que, aunque no lo sabe, es quien protagoniza este proyecto el cual espero que de alguna forma sea de importancia para la conservación de este pequeño mamífero.

Lo que uno aprende es lo que uno averigua solo.

-Isabel Allende.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	2
INTRODUCCIÓN .....	4
Respuesta fisiológica al estrés .....	7
Tiempo de retención .....	8
ANTECEDENTES .....	9
JUSTIFICACIÓN .....	12
OBJETIVOS .....	13
Objetivo general .....	13
Objetivos específicos.....	13
HIPÓTESIS .....	14
METODOLOGÍA.....	15
Descripción de la especie .....	15
Área de estudio .....	15
Colecta de excretas .....	17
Extracción de metabolitos de cortisol .....	18
Análisis estadísticos.....	19
RESULTADOS .....	21
DISCUSIÓN .....	29
CONCLUSIÓN .....	34
REFERENCIAS .....	35
ANEXOS.....	43
Anexo 1.....	43
Anexo 2.....	44

## RESUMEN

El zorro gris, *Urocyon cinereoargenteus*, perteneciente al orden Carnivora, familia Canidae se distribuye por todo México, incluido el Bosque de Niebla en Veracruz. De esta especie se han estudiado diversos aspectos biológicos, incluida la dieta, la actividad, la distribución, la abundancia, el movimiento, el uso del hábitat, la dispersión de semillas y la genética. Estas investigaciones han empleado métodos no invasivos para su realización a través de la colecta de excretas. Cuando los organismos experimentan estrés, secretan hormonas, incluidas catecolaminas y glucocorticoides secretados por glándulas suprarrenales metabolizadas por el hígado que son excretadas por el individuo en las heces y la orina, por lo que pueden ser usadas como herramienta para el seguimiento de cambios en las concentraciones a largo plazo. En este trabajo se tuvo como objetivo determinar y comparar las concentraciones de cortisol fecal en muestras de *Urocyon cinereoargenteus* en el suelo, como marca y por épocas de su ciclo reproductor. El santuario de Bosque de Niebla (SBN) se encuentra en el centro del estado de Veracruz, en el municipio de Xalapa, originalmente fue un Bosque Mesófilo de Montaña, ahora cuenta con caminos y senderos para fines recreativos, su clima es templado húmedo con lluvias durante todo el año, además de plantas resguarda diversos animales como reptiles, anfibios, aves y mamíferos entre los que se encuentra *Urocyon cinereoargenteus*. El análisis de excretas se ha utilizado para estudiar diversos aspectos biológicos, incluida la dieta, la actividad, la distribución, la abundancia, el movimiento, el uso del hábitat, la dispersión de semillas y la ecología. También ha permitido cuantificar cambios hormonales, lo que las convierte en una herramienta útil para el seguimiento a largo plazo. Para su medición se pueden utilizar diferentes métodos, siendo el inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (CLIA) el más sensible y versátil. A través de recorridos por el camino principal, se recolectaron 54 muestras de excrementos de *Urocyon cinereoargenteus* entre octubre 2022 y junio 2023, 34 como marca (sobre rocas, troncos y raíces) y 20 en el suelo. Se efectuaron extracciones de los metabolitos de cortisol y cuantificaciones por inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (CLIA). Se encontraron concentraciones de cortisol mayores en las excretas colectadas en el suelo (18306.6653 ng/g) que en las de marca

(7270.20937 ng/g), no obstante, las concentraciones dependen de la época del año, ya que las muestras de marca tienen concentraciones de cortisol más altas en época reproductiva (3843.60138 ng/g; cortejo y apareamiento) y de crianza (2888.42106 ng/g; cuando los cachorros están en madrigueras). El SBN ofrece condiciones de hábitat para la existencia de un grupo de zorros grises dentro de él. En este trabajo describimos el uso que hacen de este a través del año y el efecto de la urbanización (perros y visitantes). Es necesario mantener los esfuerzos para recopilar datos de referencia sobre la vida silvestre de interés, para que los cambios puedan detectarse.

## INTRODUCCIÓN

En México, aproximadamente el 38% de los mamíferos silvestres pertenecen al orden Carnivora (Jiménez, 2008). Los carnívoros, además de estar en la cima de la red trófica y desempeñar un papel fundamental en el control de las poblaciones de sus presas a través de su dieta (Terborgh *et al.*, 2001), también desempeñan un rol importante como dispersores de semillas, ayudando a la regeneración de hábitats fragmentados. En regiones tropicales, la dispersión de semillas se ha visto afectada negativamente por las actividades humanas (Hernández-Flores y Vargas-Licona, 2022), dando como resultado la desaparición gradual de las especies encargadas de la dispersión. Este proceso se debe en gran medida a la creciente influencia de los paisajes antropizados en la dinámica de la vida silvestre. En consecuencia, algunas especies que previamente realizaban la función de dispersores de semillas han logrado adaptarse a estos paisajes transformados por la actividad humana y, de hecho, han prosperado gracias a la disposición de alimentos de alto rendimiento (Harmsen *et al.*, 2019).

*Urocyon cinereoargenteus* comúnmente conocido como zorra gris, pertenece a la familia Canidae dentro del orden Carnivora, se distribuye desde el suroeste de Canadá hasta el Norte de Venezuela y Colombia, mientras que en México se distribuye por todo el país (Servín *et al.*, 2014). Por lo general, los canidos son monógamos, por lo que van a presentar cuidado paterno, además de presentar un solo evento ovulatorio y su ciclo estral es por época reproductiva, lo que los clasifica como monoestros, haciendo que se diferencien con la mayoría de los mamíferos que son poliéstricos, es decir, tiene múltiples ovulaciones y ciclos estrales a lo largo de la época reproductiva (Valdespino, 2007).

Una causa del monoestro puede estar relacionada con su vida social (evitar agresiones entre los miembros de un grupo al presentarse un solo acontecimiento de celo). Otra alternativa, podría ser el predominio de la monogamia, con casos polígamos en ciertas excepciones. El que un macho esté presente en especies sociales, asegura el apareamiento sin necesidad de más ovulaciones por parte de la

hembra. Ya que los miembros primitivos de este grupo eran omnívoros, pudo haberse facilitado la monogamia y eliminado la ovulación posterior (Moehlman, 1986).

Las especies de cánidos en latitudes altas tienen temporadas reproductivas cortas y hay una sincronía estrecha en el inicio de los ciclos monoestros de las hembras en comparación con las latitudes bajas, las cuales tienen temporadas reproductivas más extensas e incluso indefinidas (Valdespino, 2007). En zonas templadas el periodo reproductivo de *Urocyon cinereoargenteus* va de fines de enero a mayo (Eugenia, 1990), llegan a tener de 1 a 7 cachorros con una camada al año (Orellana-Pereira, 2011). El periodo de gestación varía entre 53 y 63 días, siendo un factor para disminuir el ámbito hogareño o territorio. Durante épocas de apareamiento el tamaño del ámbito hogareño aumenta, mientras que cuando hay cuidado parental descende, permaneciendo más tiempo en su madriguera (Eugenia, 1990). Lo mismo ocurre con las estaciones del año, pues entre otoño e invierno, al haber menor cantidad de alimento en su hábitat, las zorras aumentan su rango territorial de 0.4 a 3.2 km (Gallina *et al.*, 2016).

Ocampo-Saure (2020) y Harmsern *et al.* (2019) han observado que los cachorros con un grado mayor de madurez ayudan a los padres con la crianza de nuevos cachorros, sin embargo, cuando se trata de buscar comida lo hacen de manera solitaria. Cuando los cachorros comienzan a salir de su madriguera lo hacen entre las 6 y 8 semanas de edad y no se alejan mucho. Mientras más grandes son los cachorros, más se alejarán, abandonando la madriguera poco antes de llegar a la madurez y estableciéndose en un nuevo sitio, haciendo de éste su territorio, el cual será defendido activamente de otros individuos (Eugenia, 1990).

Los cánidos presentan una glándula odorífera, que despide un olor peculiar que servirá como señales de identificación entre especies (Orellana-Pereira, 2011). Estas señales odoríferas son una fuente de transmisión de información importante entre carnívoros, en especial con los de hábitos nocturnos. El marcaje además de servir para delimitar su territorio también es ocupado para reconocer el sexo, la condición sexual, la madurez (entre individuos) y como orientador entre miembros de un grupo (Casabal, 2014). Por esta razón, la orina y las excretas son de gran importancia,

siendo normal que se encuentren en zonas perceptibles como troncos, rocas y sitios elevados (Fritzell y Haroldson, 1982). Las excretas que sirven como marcaje llegan a ser más pequeñas y se dejan en lugares perceptibles para los animales que viajan constantemente (Barja *et al.*, 2008). *Urocyon cinereoargenteus*, es capaz de formar letrinas.

En México *Urocyon cinereoargenteus* es considerada una especie cosmopolita, se puede encontrar en una gran variedad de ambientes como bosques tropicales, deciduos y templados, y matorrales con alta densidad arbustiva, así como áreas urbanas y rurales (Gallina *et al.*, 2016). Varios factores influyen en el tamaño del área de distribución como el hábitat, la dieta y los requisitos energéticos (Roemer *et al.*, 2001). Estudios anteriores (Eugenia, 1990; Vargas-Contreras y Hernández-Huerta, 2001; Aranda *et al.*, 2012; Aguilar-López *et al.*, 2013; Rodríguez-Carmona, 2014; Silverio-Polo y Ramírez-Bravo, 2014; Atonal-Sandoval, 2015; Gallina *et al.*, 2016 y Téllez, 2018) han registrado su presencia en Bosque Mesófilo de Montaña, también conocido como Bosque de Niebla.

El Bosque Mesófilo de Montaña o Bosque de Niebla, es uno de los tipos de vegetación con mayor biodiversidad en México. En el estado de Veracruz, podemos encontrar una franja vegetativa en la Sierra Madre Oriental, que va de norte a sur, atravesando todo el Estado, conteniendo más de 2500 especies de plantas vasculares, así como diversas especies de hongos y animales. Teniendo climas templados, semicálidos y húmedos, con suelos andosoles en regiones con relieves accidentados y laderas con pendientes pronunciadas son más frecuentes (Castillo-Campos, 2020).

A pesar de la gran diversidad que representa el Bosque de Niebla, se encuentra en peligro de desaparecer por la alta tasa de deforestación para usos antropogénicos como, la agricultura, ganadería, la producción cafetalera y los asentamientos humanos (Castillo-Campos, 2020), ya que, en lugar de disminuir en número, aumentan (Williams-Linera, 2012). Esto ha hecho que, a lo largo del tiempo, los organismos hallan desarrollado una serie de estrategias para poder sobrevivir en entornos cambiantes (Cabezas *et al.*, 2007).

## Respuesta fisiológica al estrés

En los vertebrados, cuando se presenta algún tipo de estrés, se desencadena una respuesta fisiológica que involucra la liberación de hormonas, que incluyen a las catecolaminas y los glucocorticoides. Este efecto se presenta en dos etapas, en la primera etapa actúa el eje simpaticoadrenal, del que se liberarán catecolaminas, las cuales activarán los sistemas cardiovasculares, respiratorio, muscular y esquelético, colocando al organismo en estado de alerta. En la segunda etapa se da el aumento de glucocorticoides, cuyos niveles varían dependiendo del grupo taxonómico.

En los carnívoros el cortisol es liberado por la corteza adrenal al torrente sanguíneo, en respuesta al eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Vegas-Carrillo, 2008). Cuando el estrés persiste y los niveles de glucocorticoides permanecen elevados, pueden surgir consecuencias negativas a largo plazo, mostrándose como patologías como la depresión del sistema inmune, aumentando la susceptibilidad a enfermedades, reduciendo la capacidad reproductiva, la masa muscular y la capacidad de aprendizaje (Valdespino *et al.*, 2007).

Las hormonas son secretadas por glándulas que actúan como mensajeros químicos, provocando cambios fisiológicos en el comportamiento de los organismos. Dependiendo de su origen pueden clasificarse en proteínicas, peptídicas y lipídicas. Las hormonas esteroides, son lípidos no saponificables y poco solubles en agua, que engloban a los esteroides sexuales (testosterona, progesterona y estrógenos como el estradiol) y los corticosteroides (mineralocorticoides y glucocorticoides, producidos por las glándulas adrenales). Tanto la reproducción como las respuestas al estrés están asociados a cambios hormonales y el análisis con muestras de sangre para conocer sus concentraciones es efectivo. Sin embargo, esta práctica puede resultar invasiva, lo que ha motivado la búsqueda de métodos no invasivos, que permitan llevar a cabo los mismos estudios, sin generar estrés en el organismo (Valdespino *et al.*, 2007).

## Tiempo de retención

En otras especies de mamíferos, como la nutria (*Lontra longicaudis annectens*), se han medido el tiempo de retención intestinal medio (MIRT) y total (TIRT) para verificar que el comportamiento registrado correspondiera con las concentraciones de esteroides que se midieron. Para ello, al alimento se le agregó colorante alimentario y se registró el tiempo transcurrido entre la primera y la última deposición. Al realizar estas mediciones en un ambiente controlado, se observó que la retención intestinal difiere según el tipo de alimento consumido, en el caso del alimento comercial Mazuri el valor MIRT fue de más menos de 13.5 h., mientras que el valor de TIRT fue de más menos 27.1 h. A diferencia de cuando fueron alimentadas con pollo, el valor de MIRT fue de más menos 11.7 h. y el de TIRT fue de 23.3 h. aproximadamente (Prado-Ortiz *et al.*, 2020). También se han realizado mediciones de retención intestinal en murciélagos fruteros (*Sturnira lilium*). Estos fueron alimentados con fruta seca dentro de jaulas y posteriormente liberados en recintos individuales que estaban forrados internamente con lona blanca en el fondo, lo que permitía la detección de excretas e identificación del momento de la defecación a través del ruido generado al caer en el lienzo. El registro se llevó a cabo durante seis horas y se anotaron los lugares de la defecación para poder recolectarlas. El tiempo de defecación varió dependiendo de la especie de planta que consumió *Sturnira lilium*, con *Solanum paniculatum* el lapso de excreción osciló entre 21.5 y 78.8 minutos mientras que con *Ficus organensis* varió entre 23 y 48.5 minutos (Maccarini *et al.*, 2018).

Para *Urocyon cinereoargenteus* no se encontró información acerca del tiempo de retención, en cuanto a la dieta con las nutrias, suponemos que tiene un tiempo similar.

## ANTECEDENTES

Históricamente las excretas son consideradas como una fuente de información de gran importancia biológica, a partir de ellas se han realizado estudios de dieta, actividad, distribución, diversidad, abundancia, movimiento, uso de hábitat, dispersión de semillas y ecología (Eugenia, 1990; Vargas-Contreras y Hernández-Huerta, 2001; Martínez-Gutiérrez, 2002; Farias *et al.*, 2012; Aranda *et al.*, 2012; Rodríguez-Carmona, 2014; Servín *et al.*, 2014; Villalobos-Escalante *et al.*, 2014; Gallina *et al.*, 2016; Harmsen *et al.*, 2019; Pasch y Kattán, 2019; Ocampo-Saura, 2020 y Wong-Smer *et al.*, 2022). Por otro lado, las excretas han hecho posible la cuantificación de cambios hormonales. Las primeras evaluaciones se enfocaron en detectar si el organismo estaba gestante, evaluar su potencial reproductivo y en sexar aves monomórficas (Valdespino *et al.*, 2007).

Al considerarse un método no invasivo puede extenderse por largos periodos sin tener que someter a estrés a los animales. Las hormonas al ser secretadas por glándulas tienen como naturaleza ser pulsátiles, por lo que las muestras de sangre tienden a variar en su concentración, mientras que las excretas contienen la producción acumulada durante un periodo de tiempo (el tiempo de retención), eliminando la variación que tiene la sangre (Valdespino *et al.*, 2007). Además, se han sugerido los ensayos con excretas ya que además de ser un método no invasivo, es posible evaluar las funciones suprarrenales y gonadales (Barja *et al.*, 2008).

Martínez-Mota *et al.* (2007) estudiaron los niveles de cortisol en monos aulladores negros (*Allouata pigra*) comparando el área en donde habitan. El primer grupo se encontraba en un remanente de bosque en Tabasco, México y el segundo en un bosque continuo en Campeche, México. Se recolectaron un total de 72 muestras, teniendo como resultado que los monos que habitaban en remanente de bosque tenían niveles más altos de cortisol que los que habitaban el bosque continuo, debido a efectos de perturbaciones locales como el pastoreo, la tala y la presencia humana. También reportaron que los niveles de cortisol variaron naturalmente a lo largo del tiempo con las estaciones.

Por otro lado, un estudio con el conejo *Romerolagus diazi* llevado a cabo por Rizo-Aguilar *et al.* (2014) en el Corredor Biológico Chichinautzin, México, reportó que existen sitios donde la calidad ambiental es heterogénea, por lo que hicieron una comparación entre los individuos que habitan en paisaje altamente degradados y poco degradados dentro del área. Al medir los niveles de metabolitos de cortisol, los conejos que habitaban el paisaje altamente degradado tuvieron niveles dos veces más altos que los conejos que estaban en el paisaje poco degradado debido a los efectos que tienen las actividades humanas en el área.

En el zoológico de la Universidade Federal de Mato Grosso en Brasil, se llevó a cabo un estudio con el zorro cangrejero *Cerdocyon thous*, Paz *et al.* (2015), hicieron un análisis fecal de cinco individuos cuatro hembras y un macho, para medir los niveles de cortisol después de una traslocación y la actividad reproductiva que presentan en cautiverio. Como resultado obtuvieron que cuando un macho es movido al recinto de las hembras los niveles de cortisol aumentan en las hembras, pero individualmente sus niveles variaron. Durante la época reproductiva aumentaron los niveles de cortisol tanto en las hembras como en el macho.

En el estudio realizado por Jones *et al.* (2018) se estudió al lobo de crin o zorro grande *Chrysocyon brachyurus* debido a estudios que muestran una ovulación inducida en cautiverio. Sin embargo, el éxito reproductivo ha sido bajo y las tasas de mortalidad neonatal es alta. Los objetivos de este trabajo fueron: corroborar la presencia de la ovulación inducida, determinar si el cortisol elevado es un factor en la mortalidad neonatal en los cachorros y evaluar la sincronía endocrinológica de hembras alojadas en grupo. Las hembras se clasificaron por su capacidad reproductiva, crianza con éxito, hembras preñadas con crías neonatales muertas, hembras alojadas con machos sin signos de reproducción, hembras alojadas individualmente y alojadas con hembras emparentadas. Las hembras con crías mostraron niveles de cortisol similares durante todo el año a diferencia de las hembras con crías neonatales muertas, en las cuales sus niveles variaron durante el año. Las hembras que estaban con un macho tuvieron los niveles de cortisol más altos en época reproductiva en comparación con

los demás grupos. Y las hembras emparentadas tuvieron altos niveles de cortisol durante todo el año. Demostrando los distintos usos que tiene la medición de cortisol.

Existen diferentes inmunoensayos para determinar los niveles de cortisol fecal, entre los más comunes están el Radioinmunoanálisis (RIA), el Enzimo-inmunoensayo (ELISA) y el Enzimo-inmunoensayo con quimioluminiscencia (CLIA). El RIA permite la cuantificación de los compuestos biológicos de un organismo mediante la utilización de isótopos radioactivos (Zhao *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2005).

ELISA tiene reacciones específicas de antígeno–anticuerpo con el fin de analizar un compuesto diana en distintas muestras. Cuando existe una reacción química hay un cambio de color visible y cuantificable (Marquette *et al.*, 2006). Sin embargo, la sensibilidad de éste es baja en comparación con el CLIA, el cual es ultrasensible, versátil y automatizado. Este método es utilizado comúnmente en inmunoensayos para detectar reacciones quimioluminiscentes en enzimas o nanopartículas (Westgard y Westgard 2008).

## JUSTIFICACIÓN

Aun cuando en México se han realizado diversas investigaciones sobre la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) la mayor cantidad de estos trabajos han sido enfocados al estudio de dieta, actividad, distribución, diversidad, abundancia, movimiento, uso de hábitat, dispersión de semillas y ecología (Eugenia, 1990; Vargas-Contreras y Hernández-Huerta, 2001; Martínez-Gutiérrez, 2002; Farias *et al.*, 2012; Aranda *et al.*, 2012; Rodríguez-Carmona, 2014; Servín *et al.*, 2014; Villalobos-Escalante *et al.*, 2014; Gallina *et al.*, 2016; Harmsen *et al.*, 2019; Pasch y Kattán, 2019; Ocampo-Saura, 2020 y Wong-Smer *et al.*, 2022), dejando fuera el estudio de hormonas.

El empleo de excretas es de gran ayuda cuando se estudia el estado reproductivo, sexo y el estrés fisiológico (Valdespino *et al.*, 2007). Este tipo de trabajo se ha llevado a cabo con otros mamíferos, como es el caso de los monos aulladores negros *Allouata pigra* (Martínez-Mota *et al.*, 2007), del conejo *Romerolagus diazi* (Rizo-Aguilar *et al.*, 2014), en el zorro cangrejero *Cerdocyon thous* (Paz *et al.*, 2015) y en lobo de crin o zorro grande *Chrysocyon brachyurus* (Jones *et al.*, 2018) por mencionar algunos. Estos trabajos reportan que los niveles de cortisol fecal son mayores o variables cuando los animales se encuentran en época reproductiva o en ambientes degradados o fragmentados, lo cual podría deberse a la heterogeneidad ambiental, además de los encuentros con humanos, automóviles y/o animales domésticos.

Teniendo en cuenta todo lo anterior es importante realizar estudios para poder evaluar las variables en diferentes sitios, en donde la presión de la urbanización supone una amenaza para los diferentes organismos. En el Santuario de Bosque de Niebla (SBN) al ser una zona periurbana, es común observar que las personas realicen actividades físicas, además de los animales domésticos que entran en busca de comida, afectando la cantidad de estrés que sufren los animales silvestres.

En este trabajo se determinaron las concentraciones de glucocorticoides en *Urocyon cinereoargenteus* a través del tiempo como diagnóstico de la población en el sitio de estudio. Asumiendo que estos organismos están bajo constante estrés, se espera que

la cantidad de metabolitos de cortisol fecal encontrados sean altos, o que presenten variación a lo largo del tiempo.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar las concentraciones de cortisol fecal en excretas de *Urocyon cinereoargenteus* a lo largo del tiempo en el Santuario de Bosque de Niebla.

### Objetivos específicos

- Comparar las concentraciones de cortisol fecal de las muestras encontradas en el suelo y las que marcan territorio de *Urocyon cinereoargenteus*.
- Determinar y comparar las concentraciones de cortisol fecal entre las épocas, reproductivas, crías en la madriguera, adultos con crías y estación no reproductiva en *Urocyon cinereoargenteus*.

## HIPÓTESIS

Dado que el SBN, es una zona concurrida, se prevé que, durante el año *Urocyon cinereoargenteus* tenga concentraciones de glucocorticoides variables, no solo por la afluencia de visitantes que puedan perturbar el ambiente, sino también por las estaciones del año. Se espera que durante la temporada relativamente seca-fría los niveles aumenten al haber menor cantidad de alimento, mientras que en la época relativamente seca-cálida sean menores por la disponibilidad de comida. Del mismo modo, se espera que los niveles de cortisol sean más elevados durante la época reproductiva y de crianza.

## METODOLOGÍA

### Descripción de la especie

*Urocyon cinereoargenteus* comúnmente conocido como zorra gris, pertenece a la familia Canidae dentro del orden Carnivora, se distribuye desde el suroeste de Canadá hasta el norte de Venezuela y Colombia, mientras que en México se distribuye por todo el país, generalmente son de color gris con una mancha negra en el dorso de la cola; el pecho y el cuello son blancos y a los costados tienen una mancha café canela, la longitud total varía entre 800 a 1125 cm y su peso corporal es de entre 2 a 4 kg. Suelen desplazarse en sitios rocosos y con diferente tipo de vegetación, sin embargo, prefiere los lugares con cubierta arbustiva densa (Servín *et al.*, 2014).

Es considerada una especie omnívora, por lo que su alimentación va desde plantas, semillas, frutos silvestres, hasta conejos, ratones, tuzas, aves, lagartijas e insectos y ocasionalmente llega a ser carroñero. Cuando habita cerca de poblaciones urbanas consume desperdicios orgánicos y en algunas ocasiones llega a causar daños a granjas de pollos, patos y guajolotes, por lo que es considerado perjudicial para el hombre (Servín *et al.*, 2014), catalogándose como un depredador generalista y oportunista, que hace uso de los recursos alimenticios proporcionado por los humanos (Martínez-Gutiérrez, 2002). Son de hábitos nocturnos, aunque existen regiones en las se han reportado actividad diurna (Servín *et al.*, 2014).

### Área de estudio

El trabajo se realizó en el SBN con un área de alrededor de 2.9 ha, en el centro del Estado de Veracruz, México, en el municipio de Xalapa, localizado a 2.5 km de la ciudad de Xalapa-Enríquez, antes de ser decretado como Santuario, fue un potrero asentado y originalmente fue un Bosque Mesófilo de Montaña (Williams-Linera *et al.*, 2015). Tiene un gradiente altitudinal que van de 1000 a 2000 m (Castillo-Campos, 2020). El clima, según la clasificación de Köppen modificada por García (2004), tiene un tipo de clima ((A) Cb (fm)), templado húmedo y con lluvias todo el año. Se reconocen tres estaciones: 1) relativamente seca-fría de noviembre a marzo

(temperatura máxima 28°C, temperatura mínima 11.4°C), 2) relativamente seca-cálida, abril y mayo (temperatura máxima 25°C, temperatura mínima 14.5°C) y 3) húmeda-cálida de junio a octubre (temperatura máxima 24.8°C, temperatura mínima 14°C), por lo que la precipitación tiende a variar de entre 1500 y 2000 mm durante el año (Williams-Linera, 2012).

El SBN junto con el Jardín Botánico Javier Clavijero, abarcan un área de 8 hectáreas, en 2010 el Instituto de Ecología, A. C. abrió caminos y senderos para que se pudiera hacer uso del lugar con fines recreativos (Ramírez-Castelán, 2018), en 2015 fue incluido en El Archipiélago de Bosques y Selvas de Xalapa, el cual obtiene este nombramiento debido a la disposición del Bosque que no fue un proyecto de conservación, sino, el efecto de las imposiciones básicas del propio bosque, sin ningún tipo de perturbación humana, los espacios con este tipo de bosque forman un archipiélago de manchones, el cual contiene diversas comunidades y poblaciones vegetales, combinando especies arbóreas, arbustivas, herbáceas, lianas y bejucos, en una superficie de 30 hectáreas, las familias más diversas son Asteraceae, Fabaceae, Piperaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Verbenaceae. Teniendo en cuenta los diversos grupos biológicos (helechos, orquídeas, musgos, hongos, líquenes, bromelias o tenchos, etc.), en la diversidad de epifitas, estas podrían ser similares y hasta superar la cantidad de especies enraizadas en el suelo. Las plantas vasculares, corresponden al 12% de la riqueza floral del país, y el casi 32% de las especies son epifitas, en los árboles tenemos el 18%, en arbustos y hierbas el 24% y bejucos un 2% (Castillo-Campos, 2020).

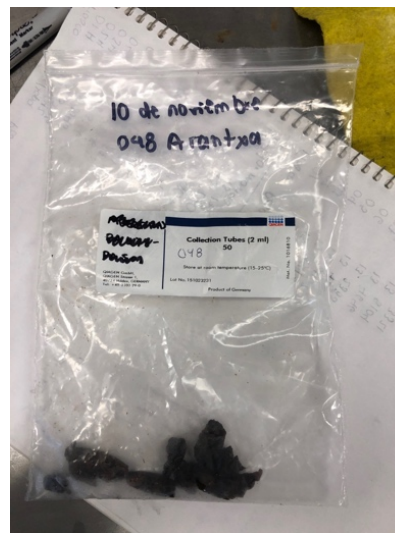
El SBN no solo alberga plantas, también resguarda una gran diversidad de animales entre ellos 102 especies de reptiles, 100 especies de anfibios, 201 especies de aves y 46 especies de mamíferos (Williams-Linera, 2012). Los carnívoros registrados en el SBN son de la familia Canidae a *Urocyon cinereoargenteus*; de la familia Mustelidae, a *Mustela frenata* y de la familia Procyonidae, a *Bassariscus astutus* y a *Procyon lotor* (Castillo-Campos, 2020).

## Colecta de excretas

El trabajo en campo se llevó a cabo de octubre de 2022 a junio de 2023, tomando en cuenta las estaciones (Williams-Linera, 2012). Cada mes se realizaron tres visitas al área en días consecutivos, con un total de 27 días de muestreo, en donde se recorría el camino trazado del Santuario en busca que excretas frescas, ya que su composición va cambiando por los procesos que efectúan hongos y bacterias para su descomposición (Gallina-Tessaro y López-González, 2011). Las excretas fueron identificadas por su tamaño (largo y ancho), su forma y el lugar en que fueron encontradas (en el camino, sobre rocas, musgo o raíces) (Figura 1) siguiendo las descripciones de Aranda, 2012. Las excretas que se iban colectando se guardaron en bolsas de plástico con cierre zip que se fueron rotulando con la fecha y una clave para identificarlas para después georreferenciar el lugar en el que se encontraron (Figura 2). Una vez rotulada la bolsa se guardaba en una hilera a 4°C para poder continuar con la búsqueda (Gallina-Tessaro y López- González, 2011). En el laboratorio de la Red de Biología y Conservación de Vertebrados del Instituto de Ecología, A. C. en Xalapa, Veracruz, fueron almacenadas todas las muestras en un congelador a una temperatura de -20°C hasta su análisis.



**Figura 1.** Excreta de zorra gris encontrada en el SBN



**Figura 2.** Bolsa rotulada con los datos de colecta de la excreta

## Extracción de metabolitos de cortisol

Los metabolitos de cortisol se obtuvieron a partir de las excretas siguiendo el procedimiento de Valdespino *et al.* (2002). Se añadieron 5 ml de buffer de fosfato/metanol a frascos que contenían 0.5 g de peso húmedo de cada muestra y se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm durante 24 h. Posteriormente, se dejaron reposar durante una hora y se decantaron en los tubos de propileno, después se centrifugaron a 4500 rpm por gramo durante 1 hora y los sobrenadantes se decantaron en tubos criogénicos, que fueron almacenados en congelación (-20°C), hasta que se efectuara el análisis por quimioluminiscencia. Los sedimentos fecales junto con los residuos de los frascos se secaron en el horno durante una noche a 100°C, se dejaron equilibrar a temperatura ambiente para poder pesar y registrar el peso seco de la muestra.

El análisis de quimioluminiscencia (CLIA) se realizó en el equipo ChemWell Fusion, marca Awareness, ubicado en el laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados, de la Red de Biología y Conservación de Vertebrados del Instituto de Ecología, A. C. en Xalapa, Veracruz, el cual es un lector automatizado que permite realizar inmunoensayos de ELISA y CLIA. Su sistema de carga permite utilizar prácticamente cualquier marca de kit comercial. Aunque requiere de una previa programación antes de montar un análisis nuevo, una vez ajustado, las corridas son relativamente fáciles. Tiene capacidad para almacenar la programación de distintas pruebas (cortisol, estradiol, testosterona etc.). Desde un archivo de texto fácilmente se pueden leer el ID de las muestras y estos se almacenarán automáticamente (Zhao *et al.*, 2009).

Se utilizó el kit de Grupo Mexlab, Código: 9001404, Lote: 422051701, Exp: 09-2023, registro sanitario No. 2041R2018SSA, que contenía 96 pocillos de microtitulación de cortisol (placa de microtitulación recubierta de anticuerpo monoclonal anti-cortisol), reactivo conjugado de cortisol, reactivo de quimioluminiscencia a y b, un juego estándar de cortisol (6 dosis) que contenía 0, 20, 50, 100, 200 y 500 ng/ml de cortisol en líquido listo para usar, dos niveles de controles de cortisol, un tampón de lavado

concentrado (50x) y el instructivo de uso, que se siguió para poder llevar a cabo el análisis. Con una lectura mínima de 0.073 ng/g.

Los reactivos deben manejarse según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. “Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos” 1984. Los anticuerpos utilizados en este kit tuvieron reacción cruzada con insulina bovina (20-25%) y con insulina porcina, pero no con proinsulina de ninguna especialidad ni con otros complejos insulinos.

Para la calibración se calculan las unidades de luz relativa (RLU) de la lectura promedio para cada conjunto de estándares de referencia de cortisol, con el que se forma una curva estándar trazando la RLU media obtenida de cada estándar de referencia frente a la concentración de cortisol en ng/ml, el RLU se alinea en el eje vertical o Y, y las concentraciones en el eje horizontal o X. Se utilizan los valores de RLU media para determinar la concentración correspondiente de cortisol a partir de la curva estándar (Anexo 1). Cualquier muestra diluida debe corregirse con el factor de dilución apropiado.

Con el análisis de quimioluminiscencia se obtuvieron las concentraciones de cortisol de cada muestra, que fueron analizadas por duplicado, se calculó la media (la suma de las repeticiones entre la cantidad de repeticiones). El coeficiente de variación ( $CV=SD/M*100$ ) de cada muestra y se tomaron en consideración aquellas muestras con un CV máximo de 22%, en caso de obtener un coeficiente mayor, se hacía una repetición adicional.

Para saber la concentración de cortisol que había en cada excreta utilizamos la media (antes obtenida) multiplicada por la cantidad de buffer utilizado, en este caso 5ml, entre el peso seco de la muestra ( $[media\ de\ cada\ muestra]*5ml/peso\ seco$ ).

### Análisis estadísticos

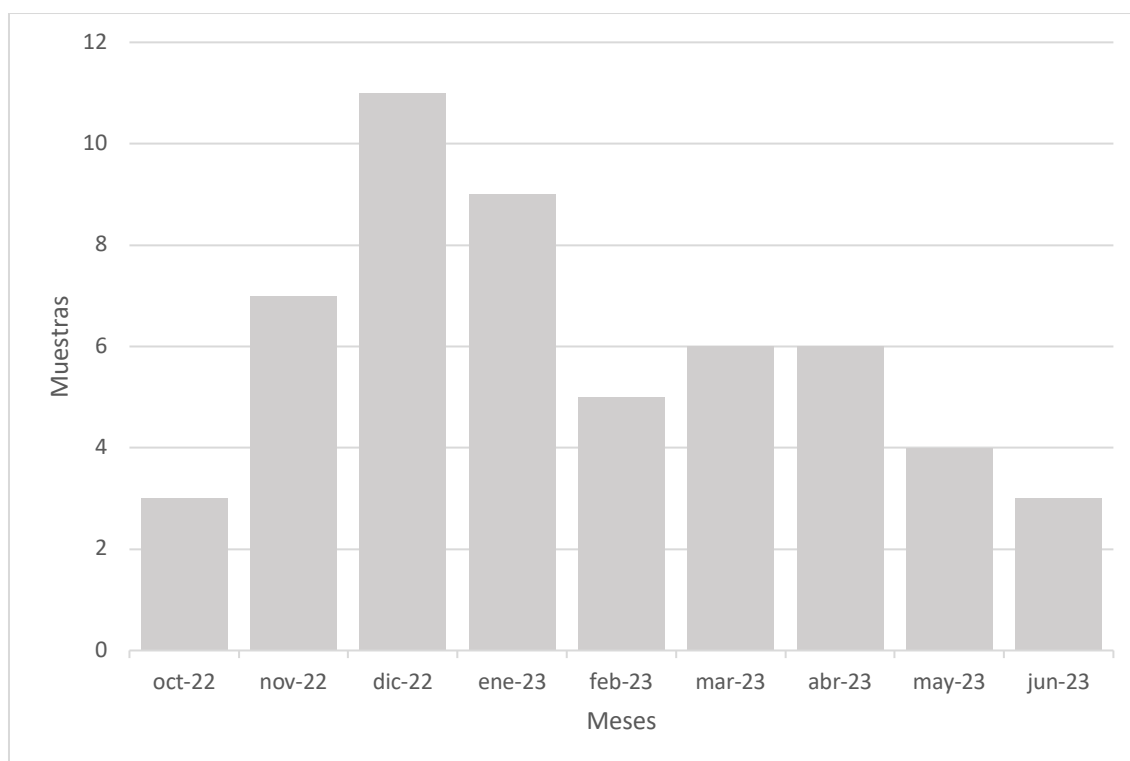
Para hacer la comparación de las muestras y la concentración de cortisol que hubo en cada mes se utilizó el programa estadístico Excel.

Se realizaron cajas de bigotes para promediar las concentraciones por mes, con el paquete "boxplot", para saber si había o no diferencia significativa por época de muestreo se hizo un análisis de varianza (ANOVA) y por último se realizaron dos gráficas espaciales para saber el área espacial que utilizó la *Urocyon cinereoargenteus* durante el tiempo de muestreo, se hicieron dos ya que una fue para las excretas que se encontraron como marca y otra para las excretas encontradas en el suelo, ambas se hicieron con el paquete "ggplot" y todo esto se llevó a cabo con el programa Rstudio.

## RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 54 muestras. En los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2022 se colectaron 3, 7 y 11 muestras respectivamente y durante 2023 se recolectaron 33 muestras, 9 en enero, 5 en febrero, 6 en marzo y abril, 4 en mayo y 3 en junio.

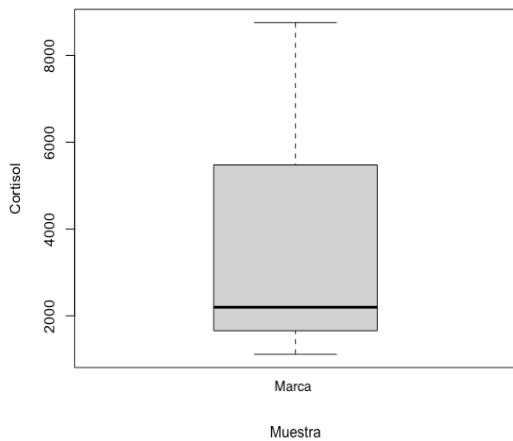
Se encontraron mayor cantidad de muestras en la estación relativamente seca-fría, mientras que, en las temporada relativamente seca-cálida, el número de muestras fueron menores (Figura 3), además, con el paso del tiempo las muestras fueron encontrándose cada vez más cerca a la entrada al SBN.



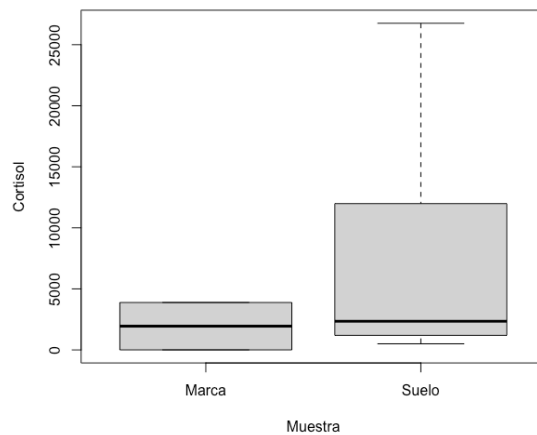
**Figura 3.** Número de muestras obtenidas a lo largo del muestreo

De las 54 muestras obtenidas, 34 se clasificaron como excretas de marcaje (sobre rocas, troncos o raíces), mientras que las 20 muestras restantes estaban en el suelo. Para el análisis se tomó en cuenta esta clasificación tal como se muestra en las gráficas mensuales (Figuras 4.1 – 4.9).

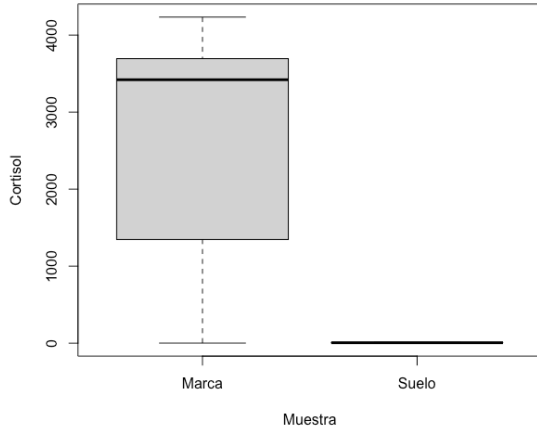
En octubre las muestras estaban como marca, tuvieron un promedio en el nivel de cortisol de 4023.111589 ng/g (Figura 4.1). En noviembre dos muestras fueron de marca con promedio en la concentración de 1943.67701 ng/g y cinco en el suelo, su promedio en la concentración de cortisol fue de 8556.13221 ng/g (Figura 4.2). En diciembre se encontraron nueve muestras como marca con una concentración promedio de 2440.71858 ng/g y dos en el suelo, su promedio fue de 5.90590789 ng/g (Figura 4.3). Enero tuvo siete muestras de marca, con un promedio en el nivel de concentración de cortisol de 369.4499685 ng/g y dos de suelo con concentración promedio de 14957.2161 ng/g (Figura 4.4). En febrero todas las muestras fueron de marca con una concentración promedio de 1587.46295 ng/g (Figura 4.5). En marzo al igual que en febrero las muestras solo se encontraron como marca con un promedio en el nivel de cortisol de 2829.529072 ng/g (Figura 4.6). En el mes de abril solo se encontró una muestra de marca con una concentración de 3.54025218 ng/g, las cinco restantes estaban en el suelo, su concentración fue de 430.8948123 ng/g (Figura 4.7). Mayo tuvo una muestra de marca, la concentración de cortisol fue de 4.5511222 ng/g, y las tres que estaban en el suelo mostraron un promedio de 3.431574459 ng/g (Figura 4.8). En junio las tres muestras estaban en el suelo con un nivel promedio de 29962.7711 ng/g (Figura 4.9).



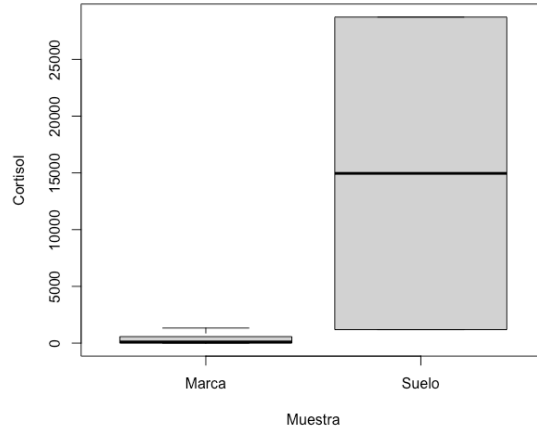
**Figura 4.1.** Octubre



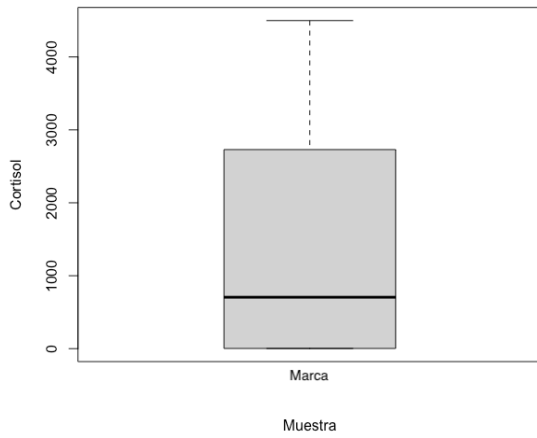
**Figura 4.2.** Noviembre



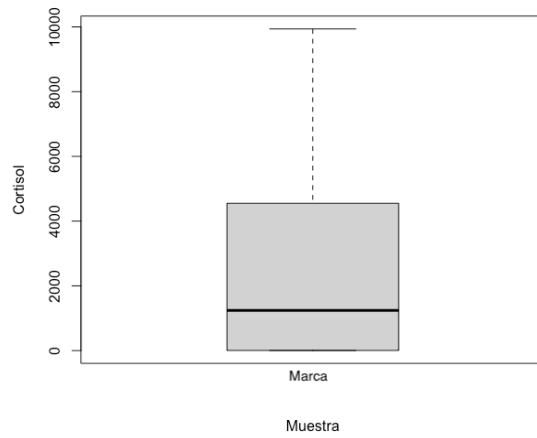
**Figura 4.3. Diciembre**



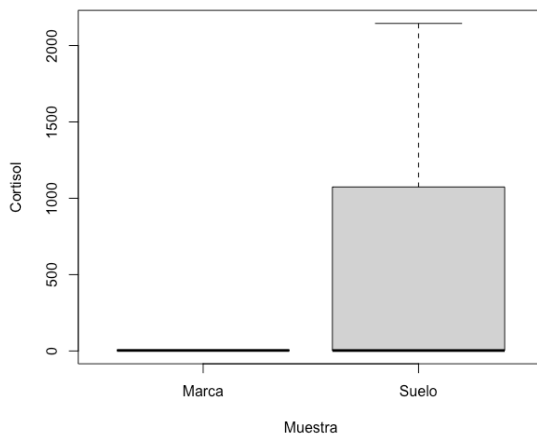
**Figura 4.4. Enero**



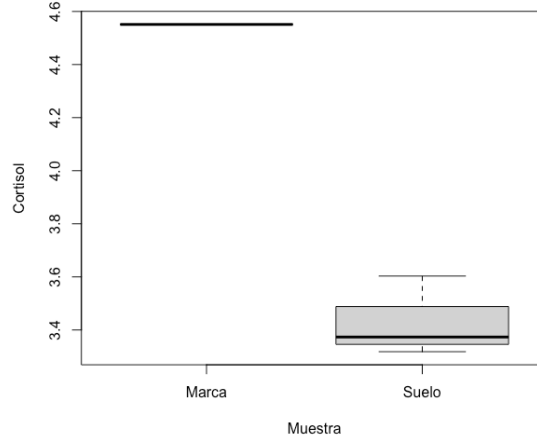
**Figura 4.5. Febrero**



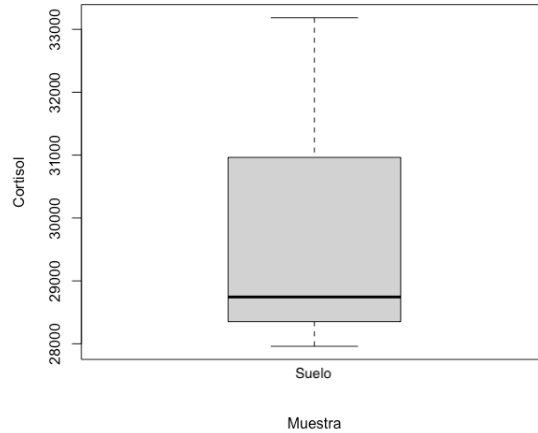
**Figura 4.6. Marzo**



**Figura 4.7. Abril**



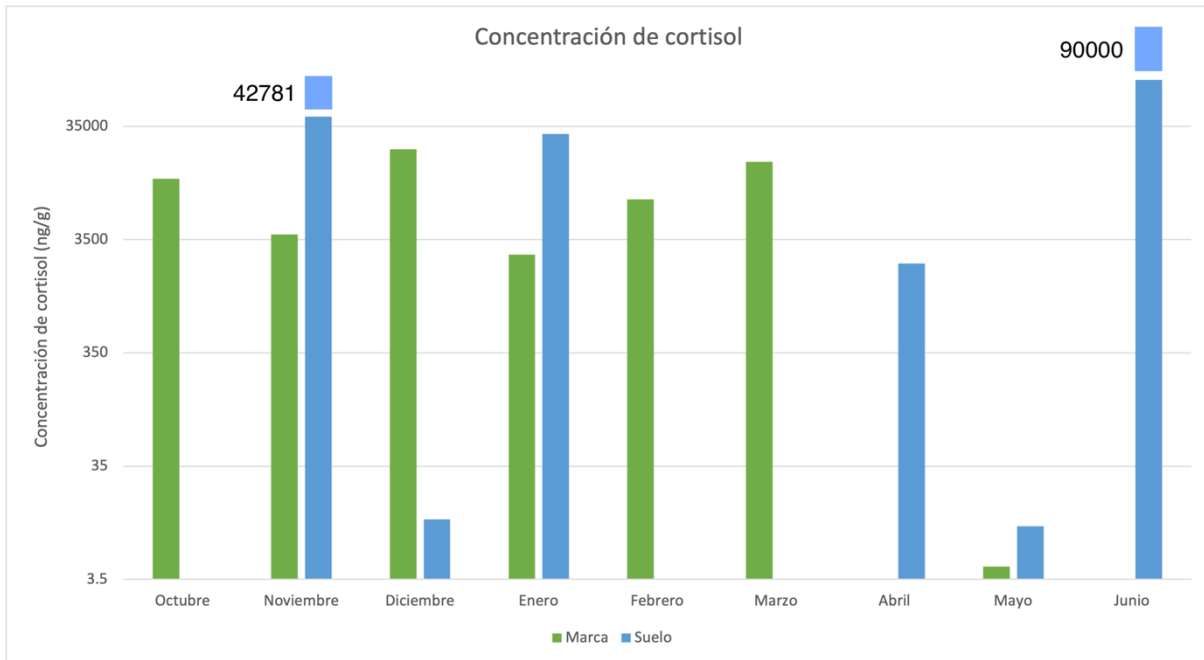
**Figura 4.8. Mayo**



**Figura 4.9. Junio**

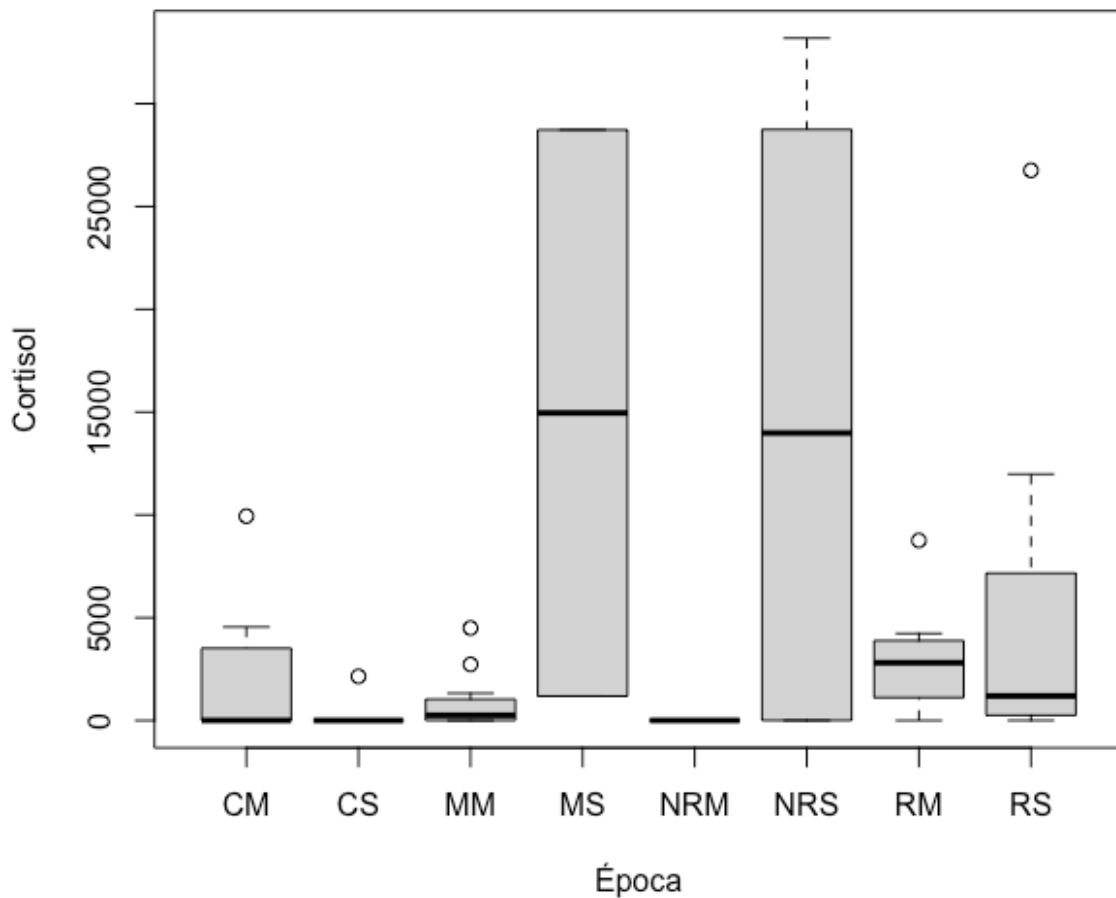
**Figura 4.** Concentraciones de cortisol en cada mes

Se hizo la comparación entre todos los meses, se observó que, junio tuvo la concentración de cortisol mayor en las excretas encontradas en el suelo, mientras que en diciembre las concentraciones de cortisol en las muestras que estaban como marcas, son más altas que en otros meses. Se puede observar que en diciembre la concentración de cortisol en las excretas es baja y mayo tiene las concentraciones más bajas de todos los meses (Figura 5).



**Figura 5.** Comparación de la concentración de cortisol a lo largo del tiempo

Con el fin de tomar en cuenta las etapas del ciclo anual de los zorros, las muestras fueron agrupadas por épocas, no reproductiva (NR) de octubre a diciembre, época reproductiva (R) enero y febrero, con crías en la madriguera (M) marzo y abril y adultos con crías (C) mayo y junio. Se observa que las excretas encontradas en el suelo (S), en la mayoría de las épocas presentan las concentraciones de cortisol más altas, con excepción de la época de crías, en donde las excretas que estaban como marca (M) tienen niveles de cortisol más altos (Figura 6).



**Figura 6.** Comparación de concentración de cortisol (ng/g) entre épocas (CM=Crías, excreta como Marca, CS=Crías, excreta en Suelo, MM=Madriguera, excreta como Marca, MS=Madriguera, excreta en Suelo, NRM=No Reproductiva, excreta como Marca, NRS=No Reproductiva, excreta en Suelo)

En la tabla 1 se observan los promedios de cada época de las excretas que estaban como marca con el error estándar (RM=Reproductiva, excreta como Marca, MM=Madriguera, excreta como Marca, CM=Crías, excreta como Marca y NRM=No Reproductiva, excreta como Marca), mientras que la tabla 2 contiene los promedios

con el error estándar de las épocas de las excretas que se encontraron en el suelo (RS=Reproductiva, excreta en Suelo, MS=Madriguera, excreta en Suelo, CS=Crías, excreta en Suelo y NRS=No Reproductiva, excreta en Suelo).

Época	Promedio $\pm$ Error estándar
RM	2708.79686 $\pm$ 625.121351
MM	876.955212 $\pm$ 403.05422
CM	2425.81638 $\pm$ 1417.73135
NRM	4.5511222 $\pm$ 0

**Tabla 1.** Promedio de concentración de cortisol por época de muestras como marca

Época	Promedio $\pm$ Error estándar
RS	6113.21041 $\pm$ 3607.67868
MS	14957.2161 $\pm$ 13771.2506
CS	430.894815 $\pm$ 428.507262
NRS	14983.1014 $\pm$ 6738.49317

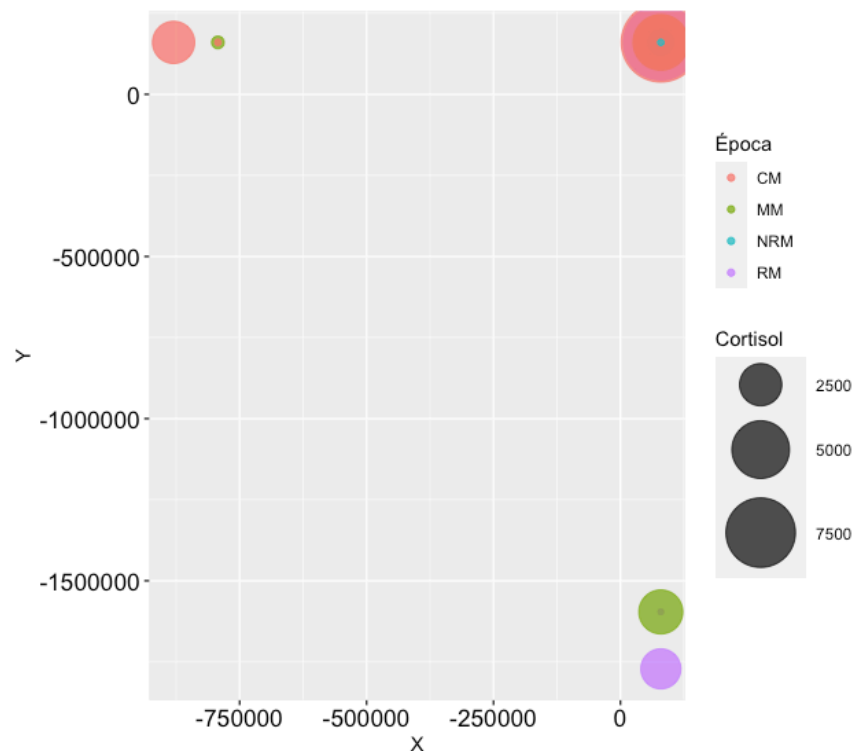
**Tabla 2.** Promedio de concentración de cortisol por época de muestras en el suelo

La comparación del cortisol entre las épocas en los que se hizo el muestreo (reproductivo, en madriguera, con crías y no reproductiva) y el sustrato en donde se encontraron las excretas (en el suelo o como marca), a través de un análisis de varianza (ANOVA), indica que las concentraciones de cortisol difieren marginalmente por época ( $P=0.059$ ) y las diferencias por sustrato son significativas ( $P=0.004086$ ) (Tabla 3).

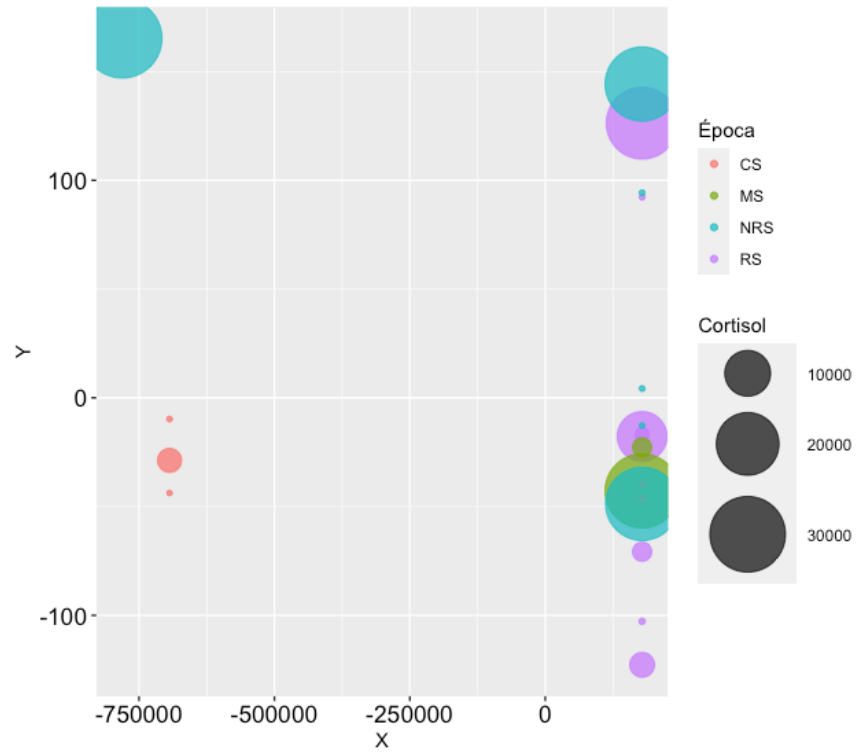
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Sustrato	1	501949412	50194912	9.1364	0.004086
Época	6	726856991	121142832	2.2050	0.059426
Residuals	46	2527221290	54939593		
Signif. Codes:	0'****'	0.001'***'	0.01'**'	0.05'.'	0.1''

**Tabla 3.** Análisis de varianza (ANOVA)

Para conocer como usan el área del santuario los zorros en las distintas épocas de su ciclo en relación con los cambios en las concentraciones de cortisol, se graficó la posición espacial de las muestras, dividiéndolas en excretas como marca (Figura 7) y excretas encontradas en el suelo (Figura 8).



**Figura 7.** Posición espacial de excretas como marca con concentración de cortisol



**Figura 8.** Posición espacial de excretas en el suelo con concentración de cortisol

## DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que existe una diferencia en las concentraciones de cortisol medidas en excretas usadas para marca con relación a las que se depositan en el suelo. Además, los zorros que habitan en el Santuario hacen un uso diferencial del mismo conforme desarrollan su ciclo anual y cambian las concentraciones de esta hormona en las excretas.

Los métodos menos invasivos en la cuantificación de hormonas, como es el uso de excretas, el cual se ha realizado en distintos grupos (Creel *et al.*, 2002; Sands y Creel 2004; Chapman *et al.*, 2006 y Escobar-Ibarra *et al.*, 2017), puede emplearse no solo cuando los individuos están en cautiverio, sino también en vida libre sin necesidad de someter a más estrés a los organismos y en este trabajo aprovechamos esta metodología.

En la mayoría de los meses, los niveles de cortisol son más altos cuando las excretas se encuentran en el suelo, lo cual se podría deberse a que el sustrato tiene afecto sobre la permanencia del cortisol en las excretas. En los meses de diciembre y mayo nos encontramos con perros en los recorridos de muestreos. Es común que este tipo de organismos lleguen a crear problemas con la fauna nativa debido al rápido desarrollo poblacional, afectando el comportamiento de la fauna, sus funciones y el uso que hacen del espacio y los recursos. Actividades como la alimentación, la reproducción e interacciones sociales se ven afectadas por el riesgo de un ataque o de depredación (Mella-Méndez *et al.*, 2019). Aunque el SBN cuenta con vigilancia para evitar introducir animales domésticos es común ver los perímetros deteriorados, haciendo posible que los perros puedan ingresar en cualquier momento.

En un estudio con colobos rojos, Chapman *et al.* (2006) hablan de una asociación entre la variación en el nivel de cortisol de una población y el cambio de poblaciones, en donde las poblaciones que tienen niveles de cortisol variables son las que disminuyen, los cuales podrían deberse a los estresores ecológicos y sociales, por ejemplo, los individuos dominantes obtienen mayor acceso a los recursos que mejoran su condición física y su inmunocompetencia, o tener un mayor rango social los

conduzca a la necesidad de afirmar el dominio en momentos más estresantes causando más peleas que aumentan los niveles de estrés.

Pifarré *et al.* (2012) trabajaron con *Canis lupus baileyi* en un zoológico, muestran que aumentaron los niveles de cortisol, además de que hubo cambios en el tiempo que pasaban echados, comiendo y moviéndose cuando estuvieron expuestos a un mayor número de visitantes. Que los niveles aumentaran junto con el tiempo que estuvieron echados podría deberse a que intentaban pasar menos tiempo a la vista del público.

En el zorro isleño, Kozlowski *et al.* (2020) llevaron a cabo un estudio de medición de cortisol, en el que reportan que los zorros con una mejor condición corporal tuvieron niveles más altos que los de peor condición, además de que al medirlas estacionalmente obtuvieron que durante el invierno las concentraciones de cortisol eran más altas, pero mencionan que esto se podría deber no solo a que estén bajo cierta cantidad de estrés, sino el tipo de alimentación que llevan en esa época hace que se produzca una elevación de cortisol, mientras que en verano las concentraciones variaron significativamente con la edad de las zorras, las hembras más jóvenes tenían niveles más altos y menos probabilidades de reproducción que las hembras mayores.

Young *et al.* (2004) con varios mamíferos carnívoros que iban desde un oso negro del Himalaya hasta un gato doméstico, hicieron un monitoreo no invasivo de la actividad adrenocortical mediante análisis de glucocorticoides fecales, en el que reportan que la captura y la restricción física elevan las concentraciones de cortisol en especies de vida silvestre, mientras que el manejo y la sujeción suave en entornos desconocidos también aumentan los niveles aun cuando los animales están habituados a este tipo de actividad. En los animales domésticos también se han observado elevaciones de después de la inmovilización en jaulas de compresión. Que hubiera organismos que después de la reubicación, la tensión social, la introducción o reproducción de parejas y algunos otros procedimientos, sus concentraciones no variaran, es debido a que no estuvieron bajo efectos estresantes, aunque también es posible que otros tipos de estímulos fueran estresantes pero el aumento fuera indetectable ya que se podrían

enmascarar con la acumulación de metabolitos en la bilis, sangre y heces no recolectadas.

Los niveles de cortisol en cualquier especie están mediados por el contexto en que se realizan las pruebas. Estos comportamientos pueden ser medidas confiables de emoción o estrés solo en contextos específicos, sin embargo, cuando se hace con animales silvestres la diferenciación es difícil (Carrier *et al.*, 2013).

Según Valdespino *et al.* (2007) para pasar de estado no reproductivo a reproductivo, es necesaria la influencia de factores ambientales epigenéticos (químicos, visuales, táctiles, sociales, térmicos), los cuales son transducidos en la síntesis y secreción de hormonas, lo que hará que los individuos estén más alerta aumentando los niveles de cortisol. Una característica en la reproducción de los mamíferos es que se desarrollan en ciclos asociados a cambios hormonales que resultan en la maduración y liberación de los óvulos y, una vez que se han fecundado, mantienen al embrión. Algunas estrategias reproductivas difieren al momento de la secreción hormonal con relación al celo conductual o al tiempo en que los niveles hormonales permanecen elevados, considerando esta diversidad una adaptación a condiciones ecológicas y sociales particulares (Valdespino, 2007).

Algunos estudios que hablan de que la época reproductiva de *Urocyon cinereoargenteus* es de fines de enero a mayo (Eugenia, 1990), lo cual coincide con lo que ocurre en el SBN, que es un poco antes. Tanto los vigilantes como personas dentro del Instituto de Ecología reportaron avistamientos de cachorros de marzo a mayo, abarcando las épocas de permanencia de las crías en la madriguera y primeras exploraciones de las crías. Iniciando la época de reproducción hacia finales de diciembre o inicios de enero. Las concentraciones de cortisol son más altas de diciembre a marzo coincidiendo con la preñez, el nacimiento de las crías y el tiempo en que las crías permanecen en la madriguera en marzo. Esto concuerda con lo reportado para *Canis lupus* (Sands y Creel, 2004; Escobar-Ibarra *et al.*, 2017), quienes reportan que en épocas reproductivas y de crianza los niveles de cortisol eran mayores.

La mayor cantidad de excretas se encontró en la estación relativamente seca-fría, lo que concuerda con el estudio de Villalobos- Escalante *et al.* (2014) y con Wong-Smer *et al.* (2022), al investigar dieta por medio de excretas. Durante la época de lluvias el escurrimiento de agua lava las excretas que se encuentran en el suelo, lo que nos dice la razón del porque encontramos una mayor cantidad de muestras marca que en el suelo y no como marca que se encuentran en zonas altas con mayor facilidad de deslizamiento.

Con el avance del muestreo, también nos encontramos con que la recolección de excretas se hacía cada vez más cercano a la entrada al Santuario y la cantidad de excretas y los niveles de cortisol eran más bajos, ya que tanto la época reproductiva como de crianza habían acabado. En junio los niveles de concentración de cortisol se elevaron, y todas las excretas que se encontraron estaban en el suelo y en la entrada del santuario, lo cual podría deberse a que durante la época relativamente seca-fría *Urocyon cinereoargenteus* pudo haber ocupado como refugio el Santuario al ser una zona protegida y como sitio de alimentación por la cantidad de alimento que encontraban a los alrededores (Gallina *et al.*, 2016) y cuando la temperatura aumentaba y las crías son capaces de acompañar a los adultos se movían a nuevos lugares.

En términos del uso del espacio de *Urocyon cinereoargenteus*, observamos que en la época no reproductiva y reproductiva marcado de color azul y morado respectivamente en las gráficas 5 y 6, la zorra gris se mueve ocupando una mayor cantidad de zonas en el santuario, mientras que en la época de adultos con crías de color rosa, su movimiento disminuye ocupando zonas aledañas a la madriguera, marcado de color verde, dentro de la misma, como se menciona en la introducción por Eugenia (1990), resultado del cuidado parental por parte de los adultos.

Es probable que los niveles de cortisol en excretas sobre el suelo (comparadas con las de marca) fueran tan bajos de febrero a mayo ya que durante esos meses, hubo varios ingresos de camionetas al Santuario y mayor afluencia de visitantes por el clima más benigno y aunque las excretas que se colectaban eran las visiblemente más frescas, el calor desencadena de forma más rápida procesos de descomposición por

bacterias y hongos, degradando las hormonas que se encontraban en este, por lo que, mientras más se descompone una excreta física y biológicamente, la concentración de metabolitos se reduce (Valdespino *et al.*, 2007), otra razón podría ser que el clima durante esta época seca-cálida, ayude a las actividades diarias de *Urocyon cinereoargenteus*, haciendo que la búsqueda de alimento sea más rápida y eficaz que en otras temporadas, teniendo como consecuencia una menor cantidad de estrés.

Diversas investigaciones sobre mamíferos en cautiverio han demostrado que las grandes y pronunciadas por periodos largos de cortisol, reducen la supervivencia y la reproducción. En esos estudios en ambientes controlados se enfatizan los efectos sobre su capacidad física aumentarán a medida que el factor estresante se vuelva más riguroso o prolongado (Creel *et al.*, 2002).

Armenta-Méndez *et al.* (2018) describen que el nicho ecológico de *Urocyon cinereoargenteus* en el Cañón de Las Barajitas, según los modelos de ocupación correlacionados con variables de hábitat categóricas y cuantitativas, muestra que la zorra gris no muestra superposición de nicho en hábitats no perturbados, por lo que la presencia de omnívoros generalistas es clave para la autorregulación de los sistemas naturales, además de que la plasticidad ecológica de la especie sumado a la heterogeneidad y diversidad florística de su hábitat, permiten la diversificación de nichos entre especies, lo que favorece a una menor competencia de recursos beneficiando la diversidad a nivel local.

*Urocyon cinereoargenteus* es una especie poco estudiada a pesar de la amplia distribución que tiene en América Central y Norte, se sabe poco sobre su ecología en comparación con otras especies, haciendo que la detección de su nivel de población a gran escala sea difícil de detectar. Es una especie considerada como “Preocupación Menor” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, ya que no contribuye a daños a los cultivos ni a otras fuentes de conflictos con humanos y ni con la vida silvestres, lo cual hace que la prioridad para investigar y monitorear a esta especie sea menor a comparación con su congénere el zorro isleño *Urocyon littoralis*, el cual al estar en peligro y en una sola zona hace que sea un foco de investigación (Allen *et al.*, 2021).

## CONCLUSIÓN

Como se sabe los altos niveles de glucocorticoides, cortisol en el caso del presente estudio, suprime varios sistemas fisiológicos importantes y hace que otros entren en estado de alerta, sin embargo, si esto persiste por largos periodos de tiempo se presentan patologías que afectaran a largo plazo al organismo, el estudio de los glucocorticoides es de gran importancia para la protección de los organismos.

Las mediciones de glucocorticoides con métodos no invasivos son simples y eficaces que pueden utilizarse para no solo detectar, también monitorear los efectos antropogénicos en las poblaciones animales y los datos obtenidos utilizarse para tomar decisiones sobre las interacciones entre humanos y vida silvestre.

Aun cuando existen áreas naturales que ofrecen ciertas condiciones para la para el desarrollo de los organismos que las habitan, es probable que el objetivo no se esté logrando, que vivan en ambientes degradados, hace que cada individuo presente distintos niveles de estrés, lo cual puedes ser consecuencia de la heterogeneidad ambiental o de los encuentros estocásticos con humanos, perros, coches, entre otros (Rizo-Aguilar *et al.*, 2014).

La urbanización no suele considerar las necesidades de la vida silvestre, somos conscientes de que en los últimos años, la reducción del hábitat natural está obligando a la fauna a colonizar espacios en zonas urbanas, aun cuando muchas especies pueden prosperar y utilizar los hábitats proporcionados por las urbes, sin embargo, el manejo de la vida silvestre es para muchas ciudades de baja prioridad, por lo que es necesario mantener los esfuerzos para recopilar datos de referencia para la vida silvestre urbana de interés para que los cambios puedan detectarse y usarse como base para cualquier gestión.

## REFERENCIAS

Aguilar-López, M., Rojas-Martínez, A. E., Cornejo-Latorre, C., Vite-Silva, V. D., & Ruano-Escalante, Y. R. (2013). Lista taxonómica y estructura del ensamblaje de los mamíferos terrestres del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. *Mastozoología neotropical*, 20(2), 229-242.

Allen, M. L., Avrin, A. C., Farmer, M. J., Whipple, L. S., Alexander, E. P., Cervantes, A. M., & Bauder, J. M. (2021). Limitations of current knowledge about the ecology of Grey Foxes hamper conservation efforts. *Journal of Threatened Taxa*, 13(8), 19079-19092.

Aranda, M. (2012). Manual para el rastreo de mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Aranda, M., Botello, F., & López-de Buen, L. (2012). Diversidad y datos reproductivos de mamíferos medianos y grandes en el bosque mesófilo de montaña de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco-Colima, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 83(3), 778-784.

Armenta-Méndez, L., Gallo-Reynoso, J. P., Macías-Duarte, A., Montiel-Herrera, M., & Villarruel-Sahagún, L. (2018). Ecological niche and occupation by gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*) at Las Barajitas Canyon, Sonora. *Therya*, 9(1), 53-60.

Atonal-Sandoval, D. (2015). Mamíferos terrestres de la cuenca hidrográfica del río Necaxa, Puebla. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Barja, I., Silván, G., & Illera, J. C. (2008). Relationships between sex and stress hormone levels in feces and marking behavior in a wild population of Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *Journal of Chemical Ecology*, 34, 697-701

Cabezas, S., Blas, J., Marchant, T. A., & Moreno, S. (2007). Physiological stress levels predict survival probabilities in wild rabbits. *Horm. Behav.* 51, 313–320.

Carrier, L. O., Cyr, A., Anderson, R. E., & Walsh, C. J. (2013). Exploring the dog park: Relationships between social behaviours, personality and cortisol in companion dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 146(1-4), 96-106.

Casabal, M. Á. T. (2014). Indicadores de Comportamiento en un Gremio de Mesodepredadores Obtenidos por Métodos Indirectos en Santo Tomás Otlaltepec, Puebla.

Castillo-Campos G. (2020). Bosque Mesófilo de Montaña o Bosque de Niebla. En Samain M. S., y G. Castillo-Campos (Eds.), Biodiversidad del Santuario del Bosque de Niebla, Xalapa, Veracruz (35-44). Instituto de Ecología, A. C.

Chapman, C. A., Wasserman, M. D., Gillespie, T. R., Speirs, M. L., Lawes, M. J., Saj, T. L., & Ziegler, T. E. (2006). Do food availability, parasitism, and stress have synergistic effects on red colobus populations living in forest fragments?. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 131(4), 525-534.

Creel, S., Fox, J. E., Hardy, A., Sands, J., Garrott, B. O. B., & Peterson, R. O. (2002). Snowmobile activity and glucocorticoid stress responses in wolves and elk. *Conservation biology*, 16(3), 809-814.

Escobar-Ibarra, I., Mayagoitia-Novales, L., Alcántara-Barrera, A., Cerda-Molina, A. L., Mondragón-Ceballos, R., Ramírez-Necoechea, R., & Alonso-Spilsbury, M. (2017). Long-term quantification of faecal glucocorticoid metabolite concentrations reveals that Mexican grey wolves may habituate to captivity. *The European Zoological Journal*, 84(1), 311-320.

Eugenia, G. P. G. (1990). Estudio de los patrones de movimiento de la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y del coyote (*Canis latrans*) aplicando la técnica de radiotelemetría en la estación científica las joyas y zonas aledañas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara.

Farías, V., Fuller, T. K., & Sauvajot, R. M. (2012). Activity and distribution of gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in southern California. *The Southwestern Naturalist*, 57(2), 176-181.

Fritzell, E. K., & Haroldson, K. J. (1982). *Urocyon cinereoargenteus*. *Mammalian species*, (189), 1-8.

Gallina, S., Colunga, P. L., Valdespino, C., & Farías, V. (2016). Abundancia relativa de la zorra gris *Urocyon cinereoargenteus* (Carnívora: Canidae) en la zona centro de Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 64(1), 221-233.

Gallina-Tessaro, S., & López González, C. (2011). Manual de técnicas para el estudio de la fauna. *Universidad Autónoma de Querétaro e Instituto de Ecología, AC México*. 390 pp.

García, E. (2004). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). *México D.F.: Instituto Nacional de Geografía-UNAM*, 90 pp.

Harmsen, B. J., Sanchez, E., Figueroa, O. A., Gutierrez, S. M., Doncaster, C. P., & Foster, R. J. (2019). Ecology of a versatile canid in the Neotropics: gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in Belize, Central America. *Mammal Research*, 64, 319-332.

Hernández-Flores, S. D., & Vargas-Licona, G. (2022). Importancia de los mesocarnívoros. *Uno Sapiens Boletín Científico de la Escuela Preparatoria No. 1*, 5(9), 18-23.

Jiménez, G. L. (2008). Dieta de carnívoros en Molcaxac del Progreso, Puebla, México. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Jones, M. K., Reiter, L. E., Gilmore, M. P., Freeman, E. W., & Songsasen, N. (2018). Physiological impacts of housing maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) with female relatives or unrelated males. *General and Comparative Endocrinology*, 267, 109-115.

Kozłowski, C. P., Clawitter, H., Guglielmino, A., Schamel, J., Baker, S., Franklin, A. D., ... & Asa, C. S. (2020). Factors affecting glucocorticoid and thyroid hormone production of island foxes. *The Journal of Wildlife Management*, 84(3), 505-514.

Li, Z. P., Wang, Y. C., Liu, C. H., & Li, Y. K. 2005. Development of chemiluminescence detection of gold nanoparticles in biological conjugates for immunoassay. *Analytica chimica acta*, 551(1-2), 85-91.

Maccarini, V. P., Pastorini, L. H., Bianconi, G. V., & Ortêncio-Filho, H. (2018). Digestion time and intactness of seeds ingested by *Sturnira lillium* (E. Geoffroy, 1810) (Mammalia, Chiroptera). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 53(1), 1-9.

Marquette, C.A., P. Hezard, A. Degiuli & L.J. Blum. (2006). Macro-molecular chemiluminescent complex for enhanced immuno-detection onto microtiter plate and protein biochip. *Sensors and Actuators B* 113(2): 664-670.

Martínez-Gutiérrez, P. G. (2002). Hábitos alimentarios de la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) en un bosque tropical caducifolio de la costa de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 78 pp.

Martínez-Mota, R., Valdespino, C., Sánchez-Ramos, M. A., & Serio-Silva, J. C. (2007). Effects of forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. *Animal Conservation*, 10(3), 374-379.

Mella-Méndez, I., Flores-Peredo, R., Pérez-Torres, J., Hernández-González, S., González-Uribe, D. U., & del Socorro Bolívar-Cimé, B. (2019). Activity patterns and temporal niche partitioning of dogs and medium-sized wild mammals in urban parks of Xalapa, Mexico. *Urban Ecosystems*, 22, 1061-1070.

Moehlman, P. D. (1986). Ecology of cooperation in canids. Pp. 64–86 in D.I. Rubenstein and R.W. Wrangham eds. *Ecological Aspects of Social Evolution: Birds and Mammals*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Ocampo-Saura, F. (2020). Dispersión y escarificación de semillas por *Urocyon cinereoargenteus* en un fragmento de bosque mesófilo de montaña del centro de Veracruz. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Veracruz, México.

Orellana-Pereira, V. E. (2011). Dieta y abundancia relativa de zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) en época seca en el Área Natural Protegida, Río Sapó, Morazón, El Salvador. Tesis de Licenciatura. UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA ESCUELA DE BIOLOGÍA.

Pasch, M. V., & Kattán, G. A. M. (2019). Dieta de la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y su posible importancia en la dispersión de semillas de ciprés (*Juniperus comitana*) en Huehuetenango, Guatemala. *Revista Mexicana de Mastozoología (Nueva Época)*, 9(1), 66-71.

Paz, R. C., Souza, N. P., & Brown, J. L. (2015). Fecal cortisol metabolites as indicators of stress in crab-eating-fox (*Cerdocyon thous*) in captivity. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35, 859-862.

Pifarré, M., Valdez, R., González-Rebeles, C., Vázquez, C., Romano, M., & Galindo, F. (2012). The effect of zoo visitors on the behaviour and faecal cortisol of the Mexican wolf (*Canis lupus baileyi*). *Applied Animal Behaviour Science*, 136(1), 57-62.

Prado-Ortiz, L. E., Valdespino, C., Romano, M., & González-Romero, A. (2020). Quantification of immunoreactive testosterone and estradiol-17 $\beta$  metabolites to identify the sex of Neotropical otters (*Lontra longicaudis annectens*) in the field. *Animal Reproduction Science*, 222, 106607.

Ramírez-Castelán, E. E. (2018). *Depredación de nidos artificiales de aves en el Santuario de Bosque de Niebla en Xalapa-Enríquez, Veracruz*. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Rizo-Aguilar, A., Guerrero, J. A., Montoya-Lara, A. M., & Valdespino, C. (2014). Physiological stress in volcano rabbit *Romerolagus diazi* populations inhabiting

contrasting zones at the Corredor Biológico Chichinautzin, Mexico. *Mammalian Biology*, 79(6), 357-361.

Rodríguez-Carmona, R. (2014). Dieta de la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) en bosque mesófilo de Olintla, Puebla. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Roemer, G. W., Smith, D. A., Garcelon, D. K., & Wayne, R. K. (2001). The behavioural ecology of the island fox (*Urocyon littoralis*). *Journal of Zoology*, 255(1), 1-14.

Sands, J., & Creel, S. (2004). Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal behaviour*, 67(3), 387-396.

Servín, J., Bejarano, A., Alonso-Pérez, N., & Chacón, E. (2014). El tamaño del ámbito hogareño y el uso de hábitat de la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) en un bosque templado de Durango, México. *Therya*, 5(1), 257-269.

Silverio-Polo, L., & Ramírez-Bravo, O. E. (2014). Registro de la presencia de mamíferos medianos en dos zonas del municipio de Cuetzalan, en la Sierra Norte de Puebla. *Therya*, 5(3), 855-860.

Téllez, E. G. G. (2018). Variación del ensamble de mamíferos medianos y grandes en la estación biológica "Vasco de Quiroga" en Uruapan, Michoacán, México. Tesis Doctoral., Universidad Michoacana De San Nicolas De Hidalgo.

Terborgh, J., Lopez, L., Nuñez, P., Rao, M., Shahabuddin, G., Orihuela, G., Riveros, M., Ascanio, R., Adler, G., Lambert, T., & Balbas, L. (2001). Ecological Meltdown in Predator-Free Forest Fragments. *Science* 294:1923-1926.

Valdespino, C. (2007). Physical constraints and latitudinal breeding season in the Canidae. *Physiological and Biochemical Zoology*, 80(6), 580-591.

Valdespino, C., Asa, C. S., & Bauman, J. E. (2002). Estrous cycles, copulation, and pregnancy in the fennec fox (*Vulpes zerda*). *Journal of Mammalogy*, 83(1), 99-109.

Valdespino, C., Martínez-Mota, R., García-Feria, L. M., & Martínez-Romero, L. E. (2007). Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: evolución de una metodología no invasiva. *Acta zoológica mexicana*, 23(3), 151-180.

Vargas-Contreras, J. A., & Hernández-Huerta, A. (2001). Distribución altitudinal de la mastofauna en la Reserva de la Biosfera " El Cielo", Tamaulipas, México. *Acta Zoológica Mexicana*, (82), 83-109.

Vegas-Carrillo, A. S. (2008). Efectos de la transformación del hábitat en la conducta y niveles de estrés de " *Alouatta palliata mexicana*". *Universitat de Barcelona*.

Villalobos-Escalante, A., Buenrostro-Silva, A., & Sánchez-de la Vega, G. (2014). Dieta de la zorra gris *Urocyon cinereoargenteus* y su contribución a la dispersión de semillas en la costa de Oaxaca, México. *Therya*, 5(1), 355-363.

Westgard, J. O., & Westgard, S. A. 2008. An assessment of  $\sigma$  metrics for analytic quality using performance data from proficiency testing surveys and the CLIA criteria for acceptable performance. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 536-44.

Williams-Linera, G. (2012). El bosque de niebla del centro de Veracruz: Ecología, historia y destino en tiempos de fragmentación y cambio climático. CONABIO – Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Veracruz, México. 208 pp.

Williams-Linera, G., López-Barrera, F., & Bonilla-Moheno, M. (2015). Estableciendo la línea de base para la restauración del bosque de niebla en un paisaje periurbano. *Madera y bosques*, 21(2), 89-101.

Wong-Smer, J. R., Soria-Díaz, L., Horta-Vega, J. V., Astudillo-Sánchez, C. C., Gómez-Ortiz, Y., & Mora-Olivo, A. (2022). Dieta y abundancia relativa de la zorra gris *Urocyon cinereoargenteus* (Carnívora: Canidae) en el Área Natural Protegida Altas Cumbres, Tamaulipas, México. *Acta zoológica mexicana*, 38.

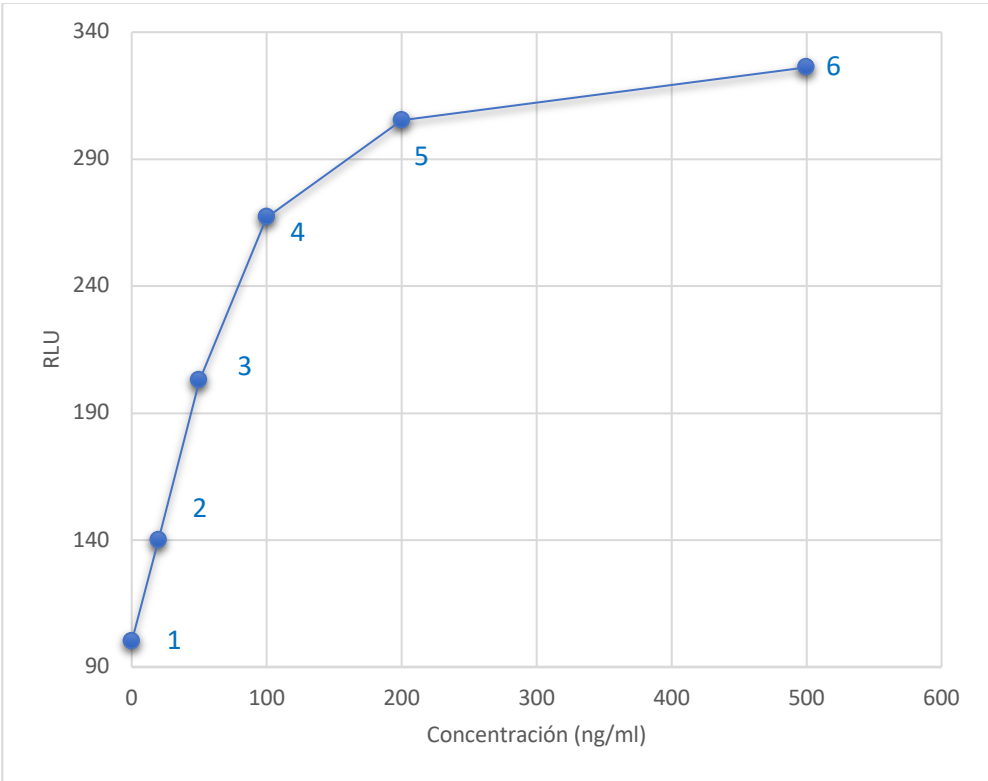
Young, K. M., Walker, S. L., Lanthier, C., Waddell, W. T., Monfort, S. L., & Brown, J. L. (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and comparative endocrinology*, 137(2), 148-165.

Zhao, L., Sun, L. y Chu, X. (2009). Inmunoensayo de quimioluminiscencia. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28 (4), 404-415.

# ANEXOS

## Anexo 1

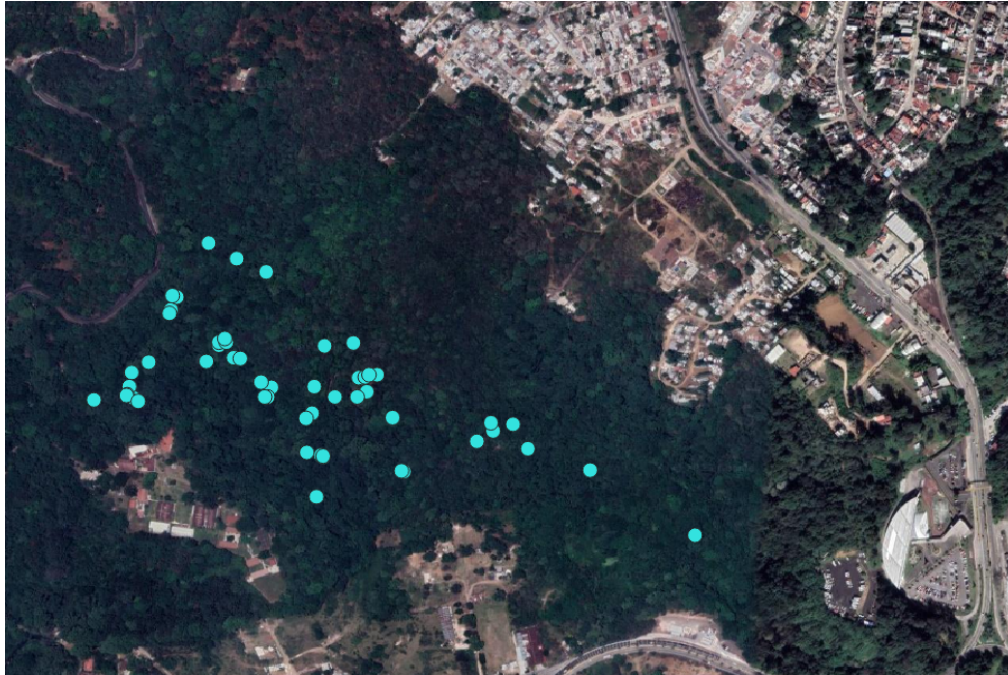
Curva de calibración.



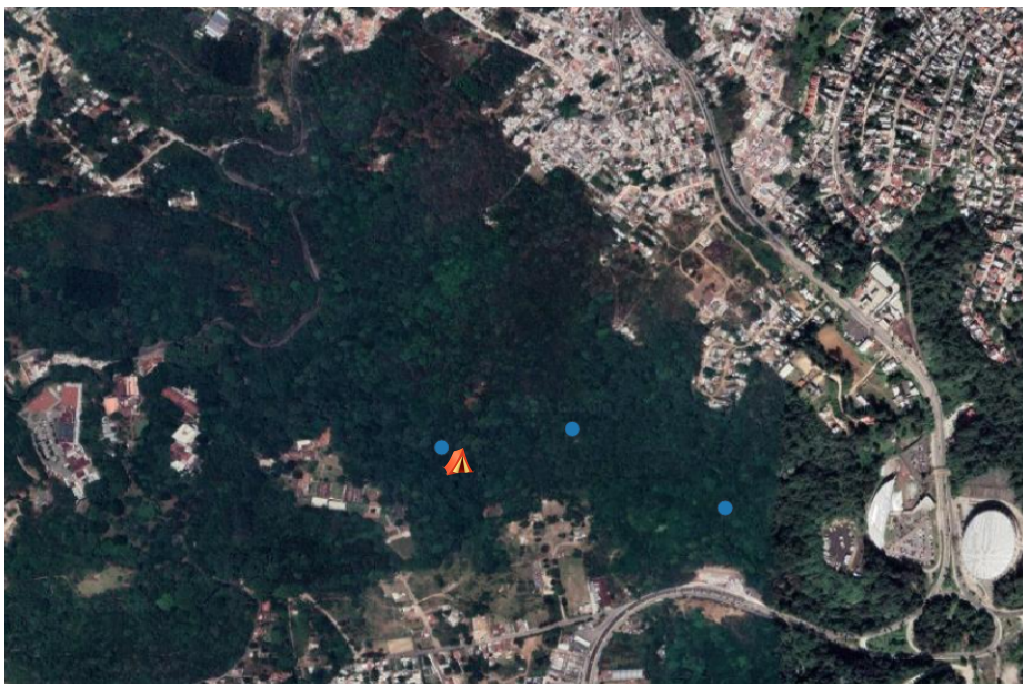
Anexo 2

Mapas con puntos en donde se encontraron las muestras en cada mes.

General (54)



Octubre (3)



Noviembre (7)



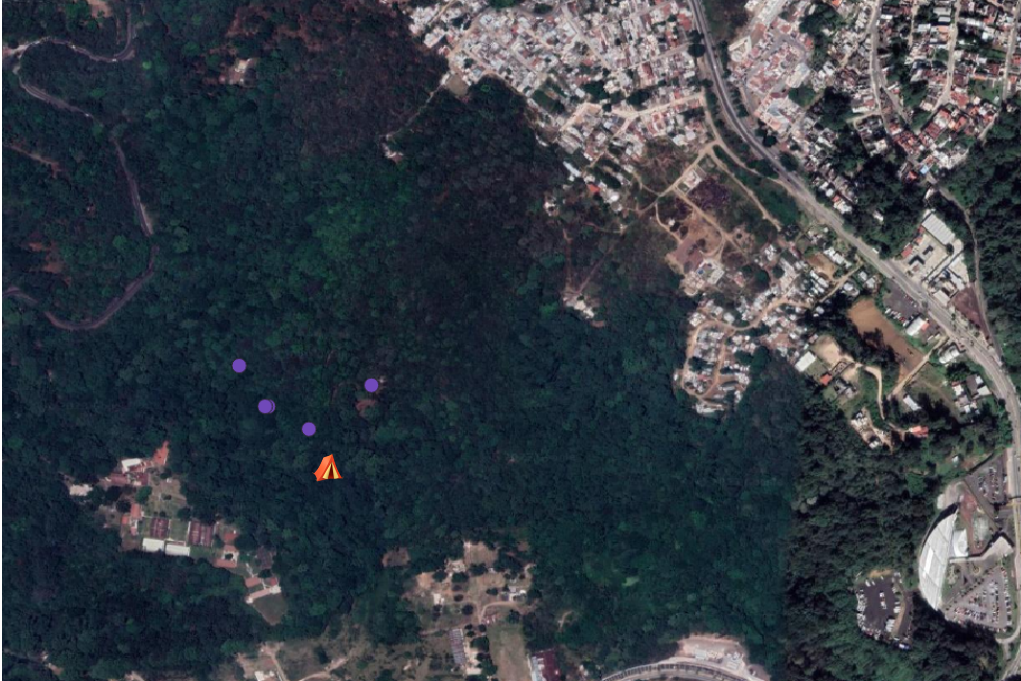
Diciembre (11)



Enero (9)



Febrero (5)



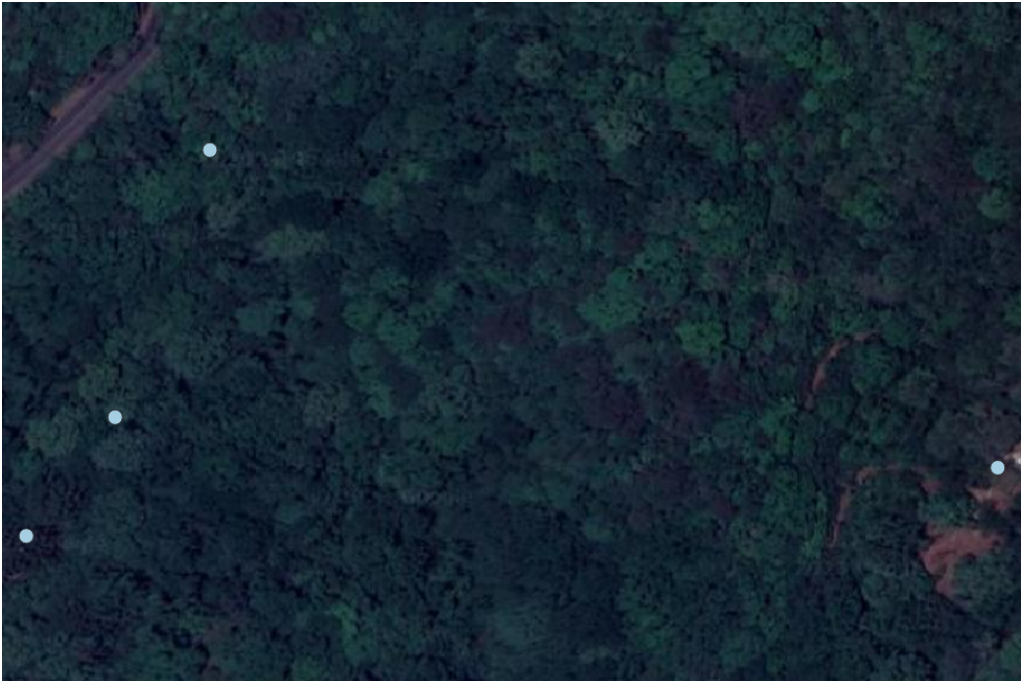
Marzo (6)



Abril (6)



Mayo (4)



Junio (3)

