

"Monitoreo no-invasivo de animales silvestres -análisis genéticos y endocrinológicos a base de muestras fecales en 'pichicos barba blanca' (*Saguinus mystax*, Callitrichidae, Primates) en la Estación Biológica Quebrada Blanco (EBQB), Perú."

Eckhard W. Heymann¹, Michael Heistermann², Petra Löttker³, Maren Huck⁴, y Uta-Regina Böhle⁵.

Resumen

El manejo integral de animales silvestres puede necesitar el monitoreo genético y endocrinológico. Para tales propósitos, anteriormente se utilizaba el muestreo de sangre o de tejido, lo que implicaba la captura y el manipuleo de animales. Como este procedimiento puede causar estrés e incluso hacer daño a los animales, no es deseable en el manejo integral, sobretodo si se trata de animales en peligro de extinción. El desarrollo de métodos para realizar análisis genéticos y hormonales a base de muestras fecales ofrece una nueva perspectiva para el monitoreo de animales silvestres. Aquí presentamos la aplicación de este método no-invasivo para análisis genéticos (parentesco y paternidad) y hormonales (estado reproductor y niveles de estrés) en 'pichicos barba blanca', *Saguinus mystax* (Callitrichidae, Primates), en la Estación Biológica Quebrada Blanco (EBQB), Perú. Los animales fueron observados y se recolectaron muestras fecales de un total de 61 individuos de dos grupos de estudio y seis grupos vecinos. Se determinaron las concentraciones de estrógenos y progesterona mediante ensayo inmunológico para monitorear el estado reproductor de cuatro hembras. Tanto las hembras reproductoras como las hembras no-reproductoras mostraron actividad ovárica. Con la misma técnica se determinaron las concentraciones de testosterona y cortisol en seis machos. Se utilizaron análisis de microsátélites para determinar el parentesco y la paternidad. La mayoría de los grupos consistió de parientes, y el parentesco fue significativamente más grande dentro de grupos que entre los grupos. Nuestro estudio demuestra la utilidad del análisis no-invasivo para monitorear el estado reproductor, el estrés y la diversidad genética en animales silvestres.

Introducción

El manejo integral de animales silvestres puede necesitar el monitoreo genético y endocrinológico para determinar tanto la diversidad genética y el potencial reproductor (en poblaciones en vías de extinción) como el nivel de estrés (en poblaciones perturbadas). Para tales propósitos, anteriormente se utilizaba el muestreo de sangre o de tejido, lo que implicaba la captura y el manipuleo de animales (métodos invasivos). Como este procedimiento puede causar estrés e incluso hacer daño a los animales, no es deseable en el manejo integral, sobretodo si se trata de animales en peligro de extinción. Además, la captura podría causar un aumento de timidez de los animales lo que puede impedir observaciones de comportamiento a corta distancia. Métodos invasivos tampoco son apropiados para obtener muestras diarias (al menos no en el campo), lo que se necesita generalmente en el monitoreo endocrinológico. Finalmente hay especies en que muestras de sangre no pueden ser utilizadas para análisis genéticos. Por ejemplo primates de la familia Callitrichidae son quimeras de sangre, es decir desde muy temprano en la fase embrional los mellizos intercambian células primogénitas de sangre (y de linfa) via conexiones placentales así que en la sangre (y en la linfa) se encuentran células de ambos individuos (Benirschke *et al.* 1962; Hampton 1973).

El desarrollo de métodos para realizar análisis hormonales y genéticos a base de muestras fecales (métodos no-invasivos) ofrece una nueva perspectiva para el monitoreo de animales silvestres. Estos métodos aprovechan el hecho que los productos de excreción (saliva, orina, heces) contienen ADN y productos de desintegración de hormonas. Dado que las concentraciones de las hormonas fecales reflejan las concentraciones de las hormonas en la sangre, el monitoreo de las hormonas fecales permite la determinación de ovulaciones, duración de ciclos ováricos y gestaciones (Wasser *et al.* 1988). El ADN proviene de células intestinales y mediante "PCR" se puede producir grandes cantidades de partes específicas del ADN incluso de muestras pequeñas que contienen solo ADN impuro y degradado (Kohne & Wayne 1997). Con métodos no-invasivos es posible obtener muestras diarias sin causar estrés a los animales y por eso sin causar daño o timidez. Muestras fecales incluso son apropiadas para análisis genéticos de quimeras de sangre. Otra ventaja es que las muestras fecales puestas en alcohol o "buffer" no necesitan refrigeración así que el método es apropiado también en el campo (Curtis *et al.* 2000; Terio *et al.* 2002).

¹ Deutsches Primatenzentrum Göttingen, Abteilung Soziobiologie

² Deutsches Primatenzentrum Göttingen, Abteilung Reproduktionsbiologie

³ Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Abteilung Verhaltensbiologie

⁴ Universität Bielefeld, Lehrstuhl für Verhaltensforschung

⁵ Bayerisches Landesamt für Umweltschutz Augsburg

* correspondencia: Petra Löttker, Abteilung Soziobiologie, Deutsches Primatenzentrum, Kellnerweg 4, 37077 Göttingen, Alemania. Phone: +49-551-3851-282; Fax: +49-551-3851-291; E-mail: ploettker@dpz.gwdg.de

Nuestros objetos de estudio fueron 'pichicos barba blanca', *Saguinus mystax*, cuya distribución geográfica es en la parte Amazónica de Brasil y Perú. Como miembros típicos de la familia Callitrichidae son muy interesantes para investigar cuestiones relacionados al estado hormonal y a la genética por su sistema social y reproductor muy particular: Los 'pichicos' típicamente viven en grupos pequeños que constan de 1-4 machos y 1-4 hembras adultas, con la proporción de sexos desplazada a favor de los machos (los grupos típicamente contienen más machos que hembras: Soini & Soini 1990; Löttker *et al.* en prensa). A pesar de la presencia habitual de más de una hembra adulta, la reproducción está restringida a una sola hembra por grupo (Stevenson & Rylands 1988; Snowdon & Soini 1988). En cautiverio las otras hembras frecuentemente muestran inactividad ovárica, es decir las hembras adultas tienen concentraciones de hormonas bajas como hembras juveniles (Abbott 1991). Sin embargo hay indicaciones de que la situación podría ser diferente en grupos silvestres (Albuquerque *et al.* 2001; French *et al.* 2003). El sistema de emparejamiento desde el punto de vista de la hembra reproductora es poliándrico, es decir ella copula regularmente con algunos o incluso con todos los machos adultos del grupo (Huck *et al.* en prensa). Sus crías son mellizos y todavía no se sabe cual macho resulta ser el padre o si los mellizos de repente tienen dos padres diferentes. Independiente de la paternidad y maternidad, todos los miembros del grupo cuidan a las crías co-operativamente y todavía no se sabe si los ayudantes no-reproductores pueden obtener beneficios indirectos mediante el aumento del "fitness" inclusivo por ayudar en la crianza de parientes cercanos.

Tomando en cuenta lo anterior las metas de nuestro estudio fueron 1) establecer el método no-invasivo para monitoreo endocrinológico y genético a base de muestras fecales, 2) monitorear y comparar el estado hormonal de hembras reproductoras en comparación con hembras no-reproductoras (y monitorear y comparar el estado hormonal entre los machos), 3) determinar paternidad y parentesco y comparar el grado de parentesco dentro de grupos con el promedio de la población.

Métodos

Área de Estudio

El estudio se realizó en la Estación Biológica Quebrada Blanco que se encuentra aproximadamente a los 100 km al sureste de Iquitos en la Amazonía Peruana en bosque primario (Heymann 1995). Aproximadamente 100 ha del área tienen caminos del Norte al Sur y del Este al Oeste con la distancia 100x100 m (Fig. 1).

Grupos de Estudio

Fueron estudiados un total de ocho grupos silvestres de 'pichicos barba blanca' (*Saguinus mystax*) desde el año 2001 hasta 2003. En 2001 fueron estudiados dos grupos principales (grupos E y W) más cinco grupos vecinos (grupos N, NE, S, SW, Wa: Fig. 1). Los grupos principales fueron observados diariamente a lo largo del

día (grupo E: 351 días, grupo W: 330 días) de enero hasta diciembre; los grupos vecinos fueron observados por un mínimo de 3 semanas consecutivas cada uno entre septiembre y diciembre. Desde enero 2002 hasta diciembre 2003 los grupos E, W y N fueron observados por 4-9 días seguidos una vez al mes. Al inicio de 2003 todos los miembros del grupo W fueron reemplazados por individuos nuevos, por lo cual el grupo fue llamado grupo WW a partir de enero 2003 (octavo grupo de estudio; Löttker *et al.* en prensa). Los grupos nunca fueron capturados o marcados y todos los individuos fueron distinguidos por características naturales (Löttker *et al.* en prensa).

Análisis endocrinológicos

Para los análisis endocrinológicos se recolectaron muestras fecales de todos los adultos de los grupos E y W durante el año entero de 2001 (4 hembras, 6 machos). Las muestras fueron conservadas en alcohol de 96°.

Mediante el ensayo inmunológico ("enzyme-immunoassay") se determinaron las concentraciones de "PdG" - "pregnenediol-3-glucuronide", un producto de desintegración de la hormona progesterona - y de estrógenos en extractos de un total de 257 muestras fecales de dos hembras adultas y reproductoras (de los grupos W y E) y dos hembras adultas y no-reproductoras (del grupo E). Los métodos están descritos en detalle en Löttker *et al.* (2004).

Con la misma técnica se determinaron las concentraciones de testosterona y cortisol en extractos de un total de 402 muestras fecales de seis machos adultos (de los grupos W y E). Los métodos están descritos en detalle en Huck *et al.* (2005).

Análisis genéticos

Para los análisis genéticos se recolectaron un mínimo de dos muestras fecales de los individuos de los ocho grupos (incluyendo crías y inmigrantes nuevos de los grupos E, W y N hasta diciembre 2003). En total se obtuvieron muestras de 61 individuos. Las muestras fueron conservadas en "buffer" DMSO.

Los extractos de las muestras fecales se utilizaron en análisis de microsátélites con 12 "primers" diferentes (con 7 "allos" en cada "locus" en promedio). Paternidad y parentesco fueron establecidos utilizando los programas "CERVUS 2,0" (Marshall *et al.* 1998) y "RELATEDNESS 5,0,8" (Queller & Goodnight 1989). Los métodos están descritos en detalle en Huck *et al.* (en prensa).

Resultados

Análisis endocrinológicos

Fig. 2 muestra el perfil hormonal de una hembra reproductora durante el año 2001. Después del parto (P) en enero 2001 las concentraciones de progesterona y estrógenos quedaron bajas por aproximadamente 80 días,

indicando inactividad ovárica. En abril empezó una fase con las concentraciones hormonales alternando entre valores altos y bajos indicando actividad ovárica. Esa fase duró aproximadamente 120 días y terminó con la concepción en agosto. La gestación duró aproximadamente 150 días y el próximo parto (P) se realizó en enero 2002. Los resultados están descritos en más detalle en Löttker *et al.* (2004).

Fig. 3 muestra el perfil hormonal de una hembra no-reproductora de enero hasta septiembre 2001 (cuando la hembra salió del grupo). Las concentraciones de progesterona y estrógenos alternaron entre valores altos y bajos y se parecieron a los valores de la hembra reproductora tanto en el diseño como en las concentraciones generales indicando actividad ovárica. Los resultados están descritos en más detalle en Löttker *et al.* (2004).

Datos endocrinológicos de los machos están presentados en detalle en Huck *et al.* (2005). Ni los niveles de testosterona ni de cortisol fueron diferentes entre los machos. Sin embargo se encontró una elevación de testosterona poco después del nacimiento de los infantes durante la fase de inactividad ovárica de la hembra reproductora.

Análisis genéticos

Seis de los ocho grupos de investigación tuvieron crías. A pesar del emparejamiento poliándrico, en cuatro de los seis grupos un sólo macho por grupo resultó ser el padre de todas las crías del grupo. En cada uno de los grupos entre 66-100% de las crías fueron engendrado por un sólo macho ("el criador principal") en un período hasta 5 años. En total dos de 28 crías de la población (7%) fueron engendrado por otro macho. Un par de mellizos supuestos tuvo dos padres diferentes. Los resultados están descritos en más detalle en Huck *et al.* (en prensa) y Löttker *et al.* (en prensa).

El grado de parentesco en grupos fue significativamente más alto que en la población ($r = 0.3$ vs. -0.03 ; a lo cual un valor de 0 refleja el promedio de la población). La mayoría de individuos no-reproductores de un grupo fueron descendientes de la pareja reproductora o parientes de ellos pero hubo también individuos de ambos sexos que no fueron relacionados. Hembra y macho reproductor de un grupo nunca mostraron parentesco. Los resultados en más detalle están descritos en Huck *et al.* (en prensa).

Resumen y Discusión

Presentamos datos endocrinológicos y genéticos de un total de ocho grupos silvestres de 'pichicos barba blanca' (*Saguinus mystax*). Monitoreamos el estado reproductor de dos hembras reproductoras y dos hembras no-reproductoras. Tanto las hembras reproductoras como

las hembras no-reproductoras mostraron actividad ovárica, pero a pesar de ese supuesto potencial reproductor de más de una hembra por grupo, solo una hembra por grupo tuvo descendencia (Löttker *et al.* 2004). Análisis genéticos de paternidad demostraron que a pesar del emparejamiento poliándrico en la mayoría de los grupos la paternidad también fue monopolizada por un sólo macho (Huck *et al.* en prensa). Esta monopolización no se cumple por inhibición hormonal ya que ni los niveles de testosterona ni de cortisol fueron diferentes entre padres y no-padres (Huck *et al.* 2005). Análisis genéticos de parentesco demostraron que la mayoría de los individuos no-reproductores de un grupo son descendientes o parientes de la pareja reproductora (Huck *et al.* en prensa). El alto grado de parentesco dentro de los grupos puede significar que los individuos no-reproductores obtienen beneficios indirectos mediante el aumento del "fitness" inclusivo que son más grandes que la energía utilizada para el cuidado de las crías. Esto podría explicar la gran disposición para ayudar en la crianza. Sin embargo, la presencia de individuos no-relacionados indica que existen (también) beneficios directos para los ayudantes (Huck *et al.* 2004).

Conclusión

Los métodos no-invasivos muestran grandes ventajas para monitorear el potencial reproductor y la diversidad genética en animales silvestres, en comparación con los métodos antiguos. Las muestras pueden ser recolectadas frecuentemente sin disturbar o causar estrés o timidez a los animales. De esa manera con los métodos no-invasivos se puede obtener resultados nuevos cuales de otra manera no se puede obtener. Recomendamos el uso de estos métodos en el manejo integral de la fauna silvestre Amazónica.

Agradecimientos

El estudio se realizó en el margen de la Carta de Entendimiento entre la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), Iquitos (Perú) y el Centro de Primates de Alemania (Deutsches Primatenzentrum, DPZ), Göttingen (Alemania). Queremos agradecer a todos los ayudantes en el campo sin cuales el estudio no hubiera sido posible: Camilo Flores Amasifuén, Ney, Manuel y Jeisen Shahuano Tello, Marcos Oversluijs Vásquez, Jenni Pérez Yamacita, Emérita R. Tirado Herrera, Janna Kirchhof, Britta Müller y Johannes Bitz. Gracias especiales también a Martha Rengifo y Roberto Pezo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP por el permiso de utilizar dos refrigeradoras en que podíamos conservar nuestras muestras hasta regresar a Alemania. Les agradecemos sinceramente a Rogelio Benites y Claudia Perez Cruz por corregir gramática, ortografía y estilo español.

Literatura Citada

- Abbott, D.H. (1991). The social control of fertility. In Primate Responses to Environmental Change, ed. H.O. Box. Chapman and Hall, London, pp. 75-89.
- Albuquerque, A.C.S.R., Sousa, M.B.C., Santos, H.M. & Ziegler, T.E. (2001). Behavioral and hormonal analysis of social relationships between oldest females in a wild monogamous group of common marmosets (*Callitrix jacchus*). *IntJPrimat*, 22, 631-645.
- Benirschke, K., Anderson, J.M. & Brownhill, L.E. (1962). Marrow chimerism in marmosets. *Science*, 138, 513-515.
- Curtis, D.J., Zaramody, A., Green, D.I. & Pickard, A.R. (2000). Non-invasive monitoring of reproductive status in wild mongoose lemurs (*Eulemur mongoz*). *ReprodFertilDev*, 12, 21-29.
- French, J.A., Bales, K.L., Baker, A.J. & Dietz, J.M. (2003). Endocrine monitoring of wild dominant and subordinate female *Leontopithecus rosalia*. *IntJPrimat*, 24, 1281-1300.
- Hampton, S.H. (1973). Germ cell chimerism in male marmosets. *AmJPhys.*, 38, 265-268.
- Heymann, E.W. (1995). Sleeping habits of tamarins, *Saguinus mystax* and *Saguinus fuscicollis* (Mammalia; Primates; Callitrichidae), in north-eastern Peru. *JZool,Lond*, 237, 211-226.
- Huck, M., Löttker, P., Böhle, U.-R. & Heymann, E.W. (en prensa). Paternity and kinship patterns in polyandrous moustached tamarins (*Saguinus mystax*). *AmJPhysAnthropol*
- Huck, M., Löttker, P. & Heymann, E.W. (2004). The many faces of helping: Possible costs and benefits of infant carrying and food transfer in moustached tamarins (*Saguinus mystax*). *Behaviour*, 141, en prensa.
- Huck, M., Löttker, P., Heymann, E.W. & Heistermann, M. (2005). Characterization and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male moustached tamarins (*Saguinus mystax*). *IntJPrimat*, 26, en prensa.
- Kohne, M.H. & Wayne, R.K. (1997). Facts from feces revisited. *TrendsEcolEvol*, 12, 223-227.
- Löttker, P., Huck, M. & Heymann, E.W. (en prensa). Demographic parameters and events in wild moustached tamarins (*Saguinus mystax*). *AmJPrimatol*.
- Löttker, P., Huck, M., Heymann, E.W. & Heistermann, M. (2004). Endocrine correlates of reproductive status in breeding and non-breeding wild female moustached tamarins. *IntJPrimat*, 25, 919-937.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B. & Pemberton, J.M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *MolEcol*, 7, 639-655.
- Queller, D.C. & Goodnight, K.F. (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, 258-275.
- Snowdon, C.T. & Soini, P. (1988). The tamarins, genus *Saguinus*. In *Ecology and Behavior of neotropical primates*, eds. R.A. Mittermeier, A.B. Rylands, A. Coimbra-Filho & G.A.B. Fonseca. World Wildlife Fund, Washington, D. C., pp. 223-298.
- Soini, P. & Soini, M. (1990). Distribución geográfica y ecología poblacional de *Saguinus mystax*. In *La Primatología en el Perú*, ed. N.E. Castro-Rodríguez. Imprenta Propaceb, Lima, pp. 272-313.
- Stevenson, M.F. & Rylands, A.B. (1988). The marmosets, genus *Callithrix*. In *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*, eds. R.A. Mittermeier, A. F. Coimbra-Filho & G.A.B. da Fonseca. World Wildlife Fund, Washington, D. C., pp. 131-222.
- Terio, K.A., Brown, J.L., Moreland, R. & Munson, L. (2002). Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. *ZooBiol*, 21, 215-222.
- Wasser, S.K., Risler, L. & Steiner, R.A. (1988). Excreted steroids in primate feces over the menstrual cycle and pregnancy. *BiolReprod*, 39, 862-872

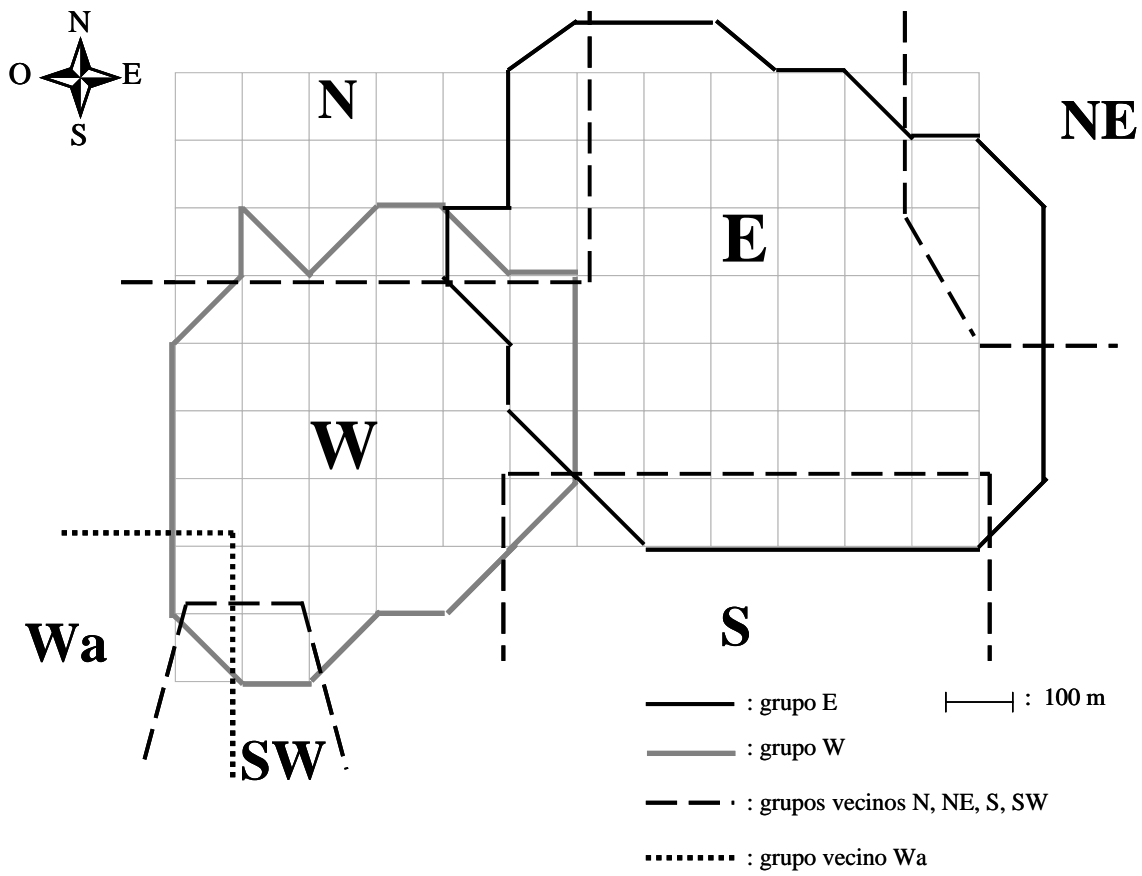


Figura 1. Territorios de los grupos principales E y W en el sistema de trochas, y posiciones aproximadas de los grupos vecinos N, NE, S, SW y Wa (Fig. adaptado por Löttker *et al.* en prensa)

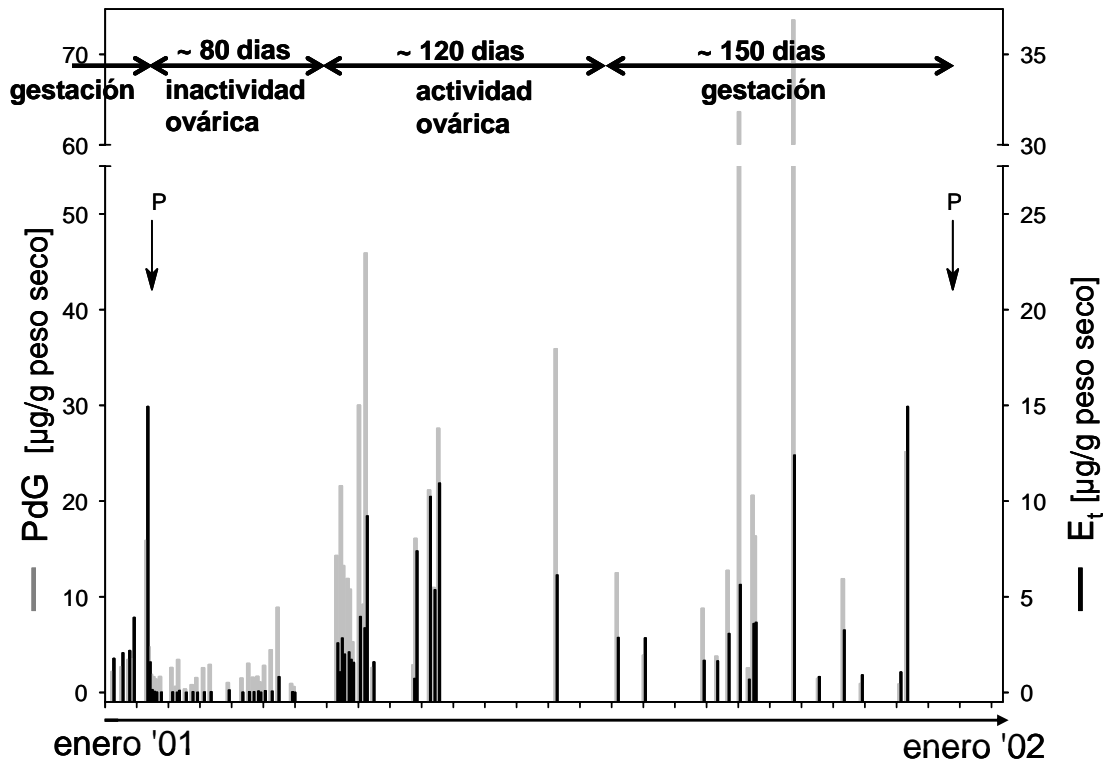


Figura 2. Perfil de excreción de "PdG" - un producto de desintegración de la hormona progesterona - y "Et" - diferentes estrógenos - fecales en la hembra reproductora del grupo E en un ciclo reproductor de un año completo. Marcas en la eje x indican un período de dos semanas. Flechas indican el día del parto (P). (Fig. adaptado por Löttker *et al.* 2004)

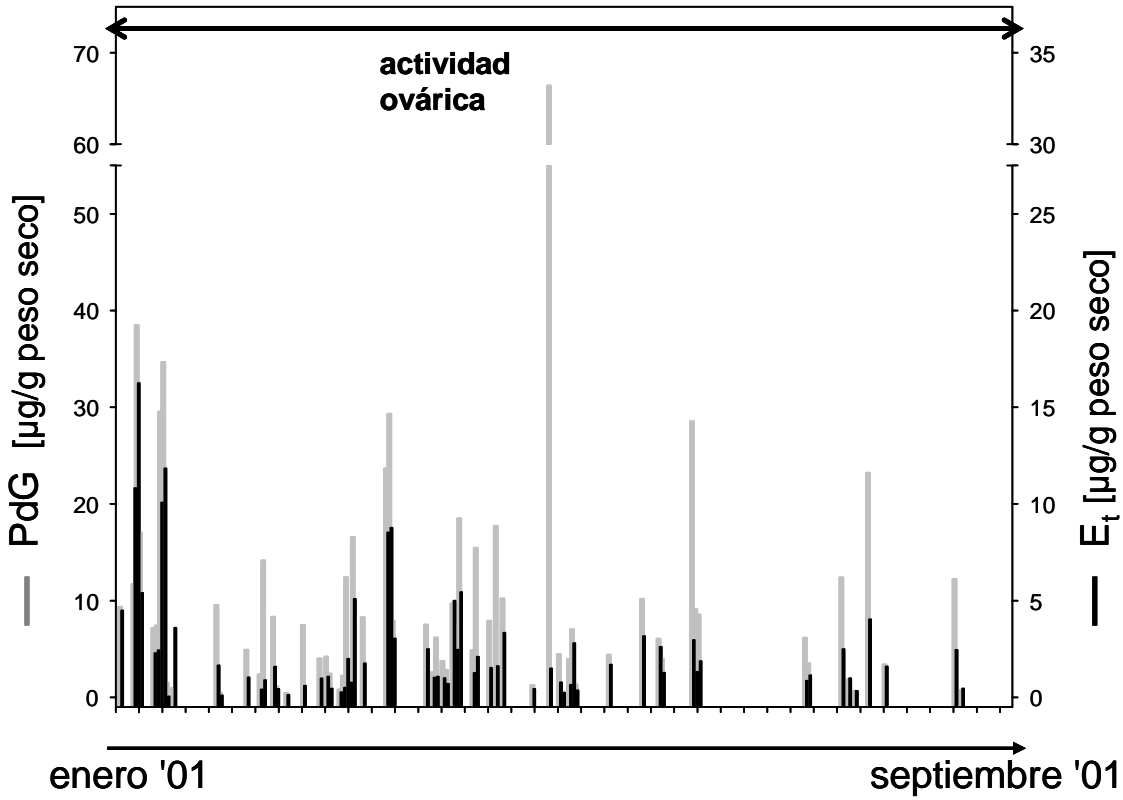


Figura 3. Perfil de excreción de "PdG" - un producto de desintegración de la hormona progesterona - y "E₁" - diferentes estrógenos - fecales en una hembra no-reproductora del grupo E de enero hasta septiembre 2001. Marcas en la eje x indican un período de una semana. (Fig. adaptado por Löttker *et al.* 2004)