

Validación y aplicación de la prueba ELISA para medir cortisol fecal en jaguar (*Panthera onca*) y puma (*Puma concolor*) durante un programa de enriquecimiento ambiental en el Zoológico Jaime Duque¹

Catalina Rodríguez Álvarez* / Leonardo Arias Bernal**

FIGURA 9B

El enriquecimiento ambiental busca aumentar el bienestar de los animales cautivos mediante la provisión de estímulos que motiven la realización de comportamientos típicos de la especie. A las poblaciones de jaguares (*Panthera onca*) y pumas (*Puma concolor*) presentes en el Zoológico Jaime Duque se les aplicó un programa de enriquecimiento ambiental y con el fin de probar si su bienestar aumentaba, se realizaron mediciones de cortisol en materia fecal mediante la prueba de ELISA, para lo cual hubo necesidad de validar la técnica para cada especie. La prueba utilizada resultó ser válida para ambas especies; sin embargo, los niveles de cortisol se ven influenciados por múltiples variables y no se hizo evidente la reducción de los niveles del mismo con el enriquecimiento ambiental.

Palabras clave: cortisol, estrés, jaguar (*Panthera onca*), puma (*Puma concolor*).

J 5@-85H-CB 5B8 5DD@-75H-CB C: 9@-G5
H9GHIC A 95G F9: 5975@7CFH-GC@
=B >5; I 5F | G fD5BH-9F5 CB75L 5B8
7CI ; 5F | G fDi A 5 7CB7C@CF L 8I F=B; 5B
9BJ =FCBA 9BH5@ 9BF =7<A 9BH 5H >5=A 9
8i EI 9 Ncc

56GF57H

The aim of the environmental enrichment is to increase the captive animal welfare, by providing them with stimulus that motivate the fulfilment in the specie natural behaviour. An environmental enrichment program was tested on the jaguar's (*Panthera onca*) and cougar's (*Puma concolor*) population at the Zoológico Jaime Duque, the objective was to confirm if the welfare really increased, Faecal cortisol was monitored by ELISA test, for this, validating the technique for each specie was needed. The carried out test turned out to be valid for both species; however, the cortisol levels are influenced by many multiples variables, and it was not evident the reduction of the levels with environmental enrichment.

Key words: Cortisol, Stress, Jaguar (*Panthera onca*), Cougar (*Puma concolor*).

1 Este trabajo es producto del grupo de investigación en medicina de la conservación reconocido ante el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, Colciencias.

* Bióloga, Coordinadora Departamento de Manejo Comportamental, Zoológico Jaime Duque. Correo electrónico: crodriguez@parquejaimeduque.com

** Médico Veterinario ULS, Esp. Coordinador Convenio Universidad de La Salle - Parque Jaime Duque. Docente Universidad de La Salle. Correo electrónico: larias.2lasalle.edu.co

Fecha de recepción: 22 de marzo de 2005.

Fecha de aprobación: 8 de septiembre de 2005.

ESTRÉS

Entre las responsabilidades de los zoológicos está el apoyar la conservación de las especies a su cargo, y como tal, es indispensable que se ocupen de su bienestar. Entre los factores que afectan a los animales en cautiverio, el estrés es uno de los más importantes, puesto que interfiere en el desarrollo de comportamientos naturales tan importantes como la reproducción (Smith, 2004).

Las variaciones de la homeóstasis provocan una serie de respuestas endocrinas y neuronales conocidas como estrés (Turner *et al.*, 2002; Abbott *et al.*, 2003). Éste es un fenómeno adaptativo de protección y por lo general actúa para conservar la vida en situaciones de amenaza (Klein, 1998).

Un estresor puede ser definido como cualquier disruptor de la homeóstasis, entre los que se encuentran factores ambientales como las temperaturas extremas o factores fisiológicos como la escasez de agua y/o alimento y factores sicosociales como peleas, subordinación social o carencia de control sobre una situación dada (Nelson, 2000).

En 1915, Walter Cannon propuso la «teoría de emergencia» de las glándulas adrenales, la cual sugiere que la secreción de epinefrina en la médula adrenal se incrementa luego de la exposición a un estresor. Este componente inmediato de la respuesta al estrés se llama pelea o huida, debido a que los cambios fisiológicos que se producen en cuanto al tono cardiovascular, tasa respiratoria y flujo sanguíneo dirigido a los músculos, pueden soportar cualquiera de las dos respuestas comportamentales. Luego de unos minutos, la corteza adrenal secreta glucocorticoides (corticosterona en la mayoría de los roedores, aves y reptiles; cortisol en primates y carnívoros) (Nelson, 2000).

La respuesta al estrés tiene varios efectos adaptativos: incrementa la disponibilidad inmediata de energía, incrementa la utilización de oxígeno, reduce el flujo sanguíneo en partes no necesarias para el movimiento, inhibe la digestión, el crecimiento, la función inmune, la reproducción y la percepción del dolor. Sin embargo, las características patológicas del estrés crónico incluyen fatiga, miopatía, hipertensión, úlceras gástricas, enanismo sicosocial, impotencia y anovulación, entre otras (Nelson, 2000).

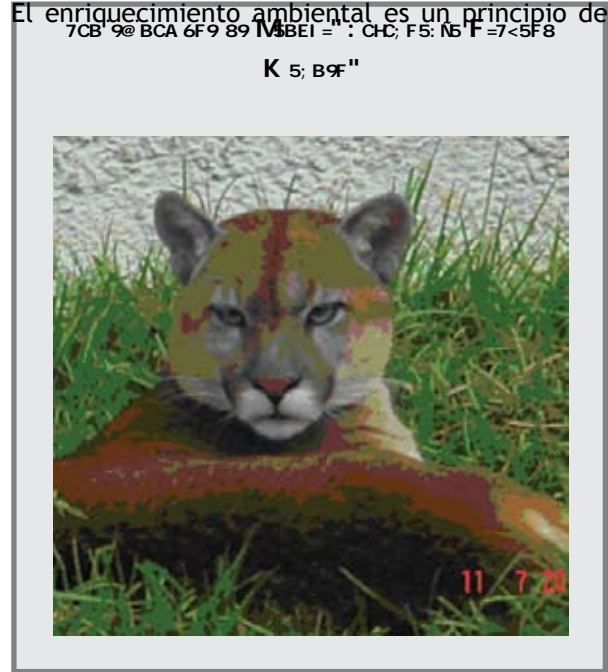
Recientemente, el aumento en la disponibilidad de los radioinmunoensayos (RIA) y los inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA) ha facilitado que se cuantifique el estrés mediante la medición de la concentración de glucocorticoides en la sangre. Las ventajas de este método son: la precisión, la medición de la cantidad de hormonas independientemente de las fluctuaciones temporales y las mediciones seriadas sobre el mismo individuo. Sin embargo, el solo hecho de obtener una muestra de sangre incrementa el estrés del animal, razón por la cual se desarrolló la técnica de medición de glucocorticoides en productos de excreción (orina y heces) (Harper y Austad, 2000).

Se ha probado que las hormonas esteroideas fecales son muy útiles para monitorear la fisiología reproductiva y del estrés, puesto que las heces contienen grandes cantidades de dichas hormonas, tales como estrógenos, progestinas, corticosterona, cortisol y mineralocorticoides. Estas hormonas son estables, a pesar de que en el intestino son metabolizadas por la flora y enzimas intestinales (Wasser *et al.*, 2002).

Los metabolitos fecales presentan fuertes diferencias especie-específicas, por lo cual es necesario validar la prueba para cada nueva especie con la que se va a trabajar (Dehnhard *et al.*, 2001; Wasser *et*

al., 2002). El objetivo del presente trabajo es validar la técnica de ELISA para medir la concentración de cortisol presente en la materia fecal del jaguar

(*Panthera onca*) y el puma (*Puma concolor*) y así disponer de una manera objetiva de monitoreo del estrés en estos animales (Figuras 1 y 2).



cuidado animal por medio del cual se pretende mejorar la calidad del ambiente en cautiverio mediante la identificación y provisión de estímulos ambientales que son necesarios para el bienestar fisiológico y psicológico. Esto incluye una gran variedad de técnicas innovadoras e ingeniosas, objetos y prácticas cuyo objetivo es mantener a los animales en cautiverio ocupados (Figuras 4 y 5), incrementando el rango y diversidad de las oportunidades comportamentales y proveyendo ambientes más estimulantes (Shepherdson, 1998).

Este trabajo se desarrolló simultáneamente con un estudio comportamental que buscaba identificar

las diferencias relacionadas con la actividad de los animales antes y durante el enriquecimiento ambiental. Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de esta técnica es la reducción del estrés, se analizaron las muestras de materia fecal tomadas durante el mismo periodo de tiempo, una vez validada la técnica de medición de cortisol fecal por ELISA para cada especie.

A 94800; 15

Este estudio se llevó a cabo en el Zoológico Jaime Duque, ubicado en la Sabana de Bogotá, durante 9 meses de muestreo no continuo. En la Tabla 1 se presentan los individuos estudiados, los cuales fueron divididos en grupos.

H6e5 %' 89G7F=D7=0B '89'@CG' =B8=J =8I CG' 9GH 8=58CG''@CG'; FI DCG' %M&' 9GH B' 7CB: CFA 58CG' DCF' >5; I 5F 9GZ'
 A =9BF 5G' EI 9' @CG'; FI DCG' ' M(' GCB' 89' DI A 5G''

Especie	Individuo	Grupo	Sexo	Edad	Procedencia
<i>Panthera onca</i>	Manchas	1	Macho	12 años	Vida silvestre
	Buffy	2	Hembra	7 años	Cautiverio
	Orión		Macho	1 años	Cautiverio
<i>Puma concolor</i>	Martín	3	Macho	16 años	Vida silvestre
	Maye		Hembra	13 años	Vida silvestre
	Yanqui	4	Macho	3 años	Vida silvestre
	Tyson		Macho	3 años	Vida silvestre

Cada grupo sale a la zona de exhibición día de por medio, mientras el otro grupo permanece en el cubil. Diariamente se hace limpieza en los encierros, por lo que este momento se aprovechó para recoger las muestras de materia fecal, cada una de las cuales se marcó con el nombre del grupo al cual pertenecía y la fecha de recolección. Las muestras se mantuvieron refrigeradas a -20° C hasta el momento de su análisis. No todos los días se podían recoger muestras puesto que no siempre se encontraban heces en los encierros, por lo tanto se decidió hacer un muestreo aleatorio.

Para extraer los esteroides de las materia fecal, se adaptó el protocolo utilizado en Morais *et al.* (1996); Terio *et al.*, 1999 y Wielebnowski *et al.* (2002).

- ◆ Descongelar las muestras.
- ◆ 0.5 gr de materia fecal se disuelve en etanol acuoso (90%) y se calienta en un baño María durante 20 minutos.

- ◆ Centrifugar a 1200 gravedades (g) durante 15 minutos.
- ◆ Recuperar el sobrenadante.
- ◆ Resuspender el *pellet* en 5 ml de etanol acuoso (90%).
- ◆ Mezclar utilizando *vortex* por 1 minuto.
- ◆ Centrifugar a 1200 g durante 15 minutos.
- ◆ Recuperar el sobrenadante.
- ◆ Combinar ambos sobrenadantes y dejarlos secar completamente.
- ◆ Redisolver en 1 ml de metanol.
- ◆ Diluir 1:10 en una solución buffer fosfato (0.01MPO₄; 0.14M NaCl; 0.01% NaN₃; 0.5%BSA; pH 7)

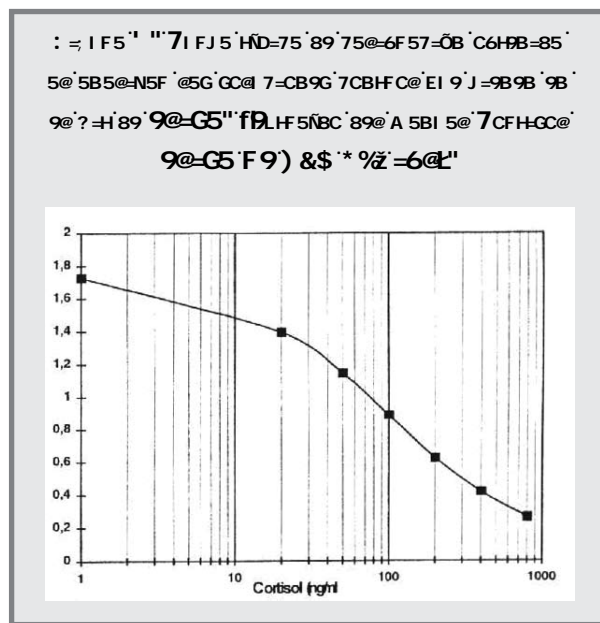
La cantidad de cortisol presente en esta extracción se cuantificó mediante la técnica ELISA. En el presente estudio se utilizó un kit para la determinación cuantitativa de cortisol en suero y plasma humano (Cortisol ELISA Cat.-No.:RE 520 61)².

Para estandarizar la prueba en ambas especies, se escogió la extracción (una por especie) que es-

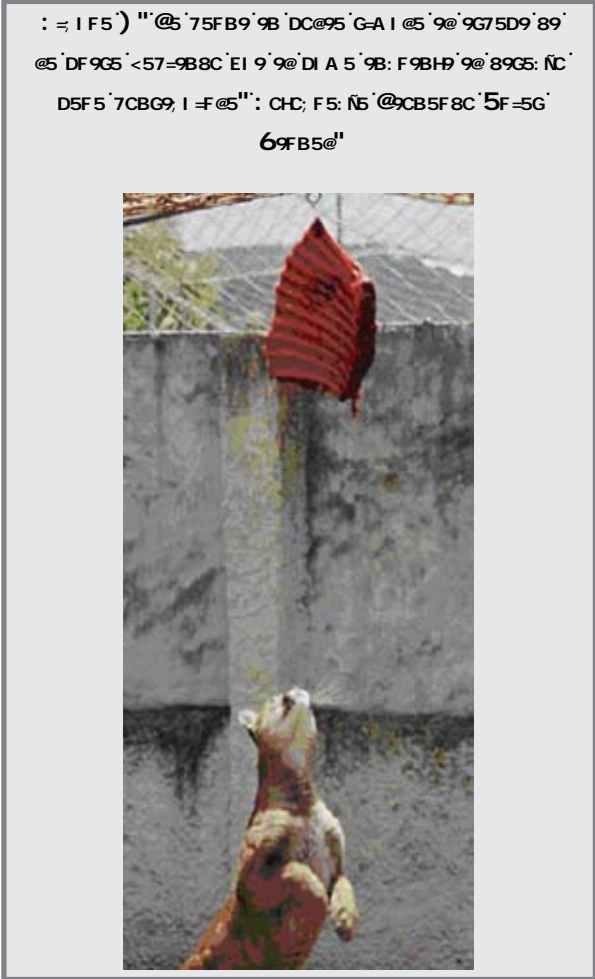
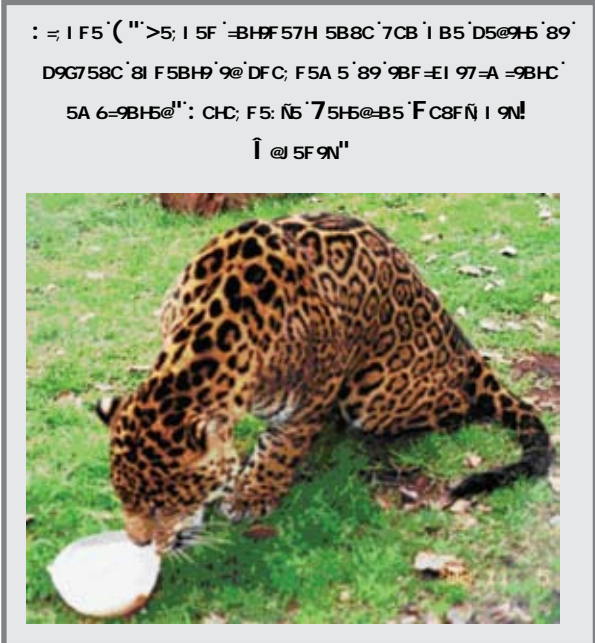
2 IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburgo.

tuviera más oscura, asumiendo que era allí donde había una mayor concentración de esteroides, y se diluyó en concentraciones de 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320 (en los jaguares se realizó dos diluciones adicionales de 1:640 y 1:1280). Luego de medir la absorbancia a 450nm se graficaron los resultados en papel semi-logarítmico, donde las abscisas corresponden a la concentración de la muestra y las ordenadas a la densidad óptica.

El kit incluye soluciones control de diferentes diluciones (1; 20; 50; 100; 200; 400; 800) que al analizarlas y luego graficarlas dan como resultado una curva (Figura 3). Para determinar que el ensayo es válido para las muestras tratadas, la curva obtenida debe tener la misma forma que la del control.



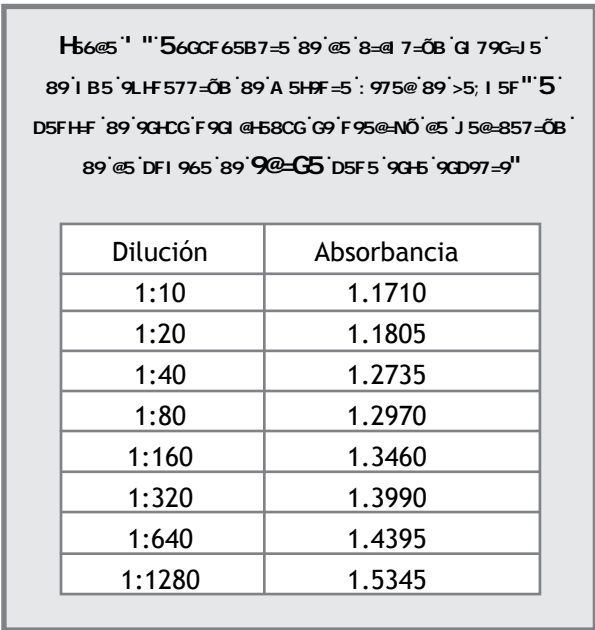
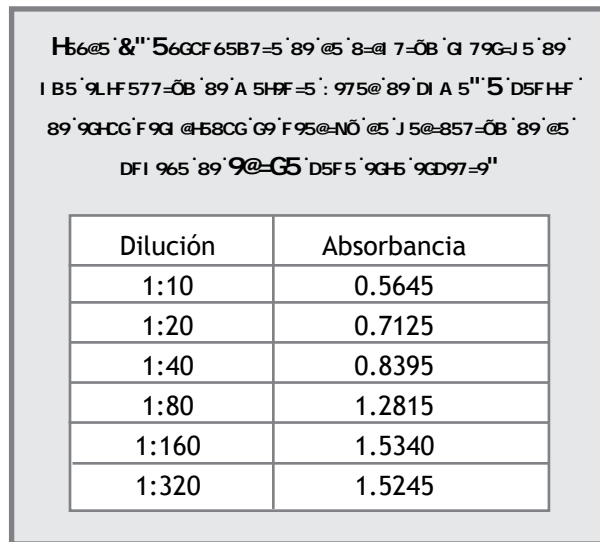
Este estudio se realizó simultáneamente con la aplicación de un programa de enriquecimiento ambiental en ambas especies, por lo que se recogieron muestras de materia fecal antes y después de la aplicación del mismo, con el fin de observar los cambios que se pudieran presentar en cuanto a la concentración de cortisol, y por lo tanto medir el estrés, una vez al animal se le ofrecieran diferentes enriquecedores (Figuras 4 y 5).



Con la curva de validación, se procede a ubicar sobre ésta los puntos de las otras muestras para obtener la concentración de cortisol en cada una de ellas. Al tener la densidad óptica, se ubica este valor sobre la curva y se traza una línea perpendicular al eje de las abscisas y el punto donde esta línea y el eje se crucen, corresponde al valor de la concentración de cortisol.

F 9G @H58CG M8-G7I G-ÖB

En las Tablas 2 y 3 se presentan los valores de absorbancia obtenidos en una serie de diluciones de una misma extracción de glucocorticoides de pumas y jaguares, respectivamente. Dichos valores se graficaron para obtener la curva de estandarización.

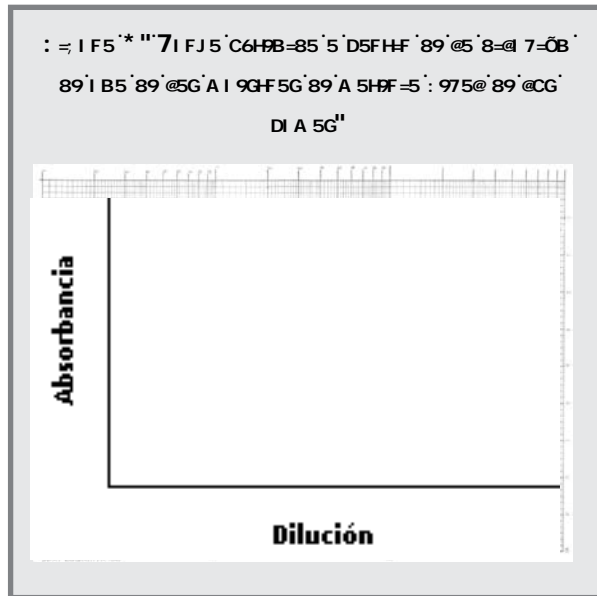


Para comparar la curva control, y las obtenidas con la dilución de las muestras, se debe tener en cuenta que en la primera, sobre el eje de las abscisas, la concentración de cortisol en las muestras, aumenta hacia la derecha; mientras que en las curvas obtenidas sucede lo contrario. Esto implica que se debe analizar la forma de la gráfica como si estuviera reflejada en un espejo.

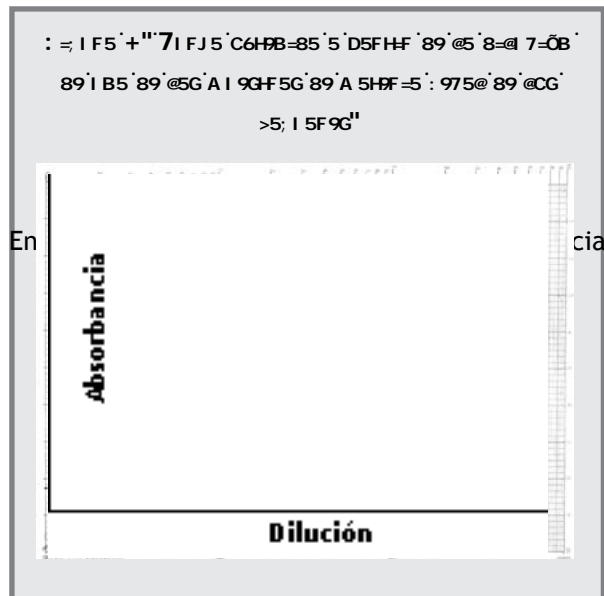
La curva obtenida a partir de la dilución de una de las extracciones de glucocorticoides de los pumas (Figura 6), no deja muy claro si la prueba es válida o no para la especie. La forma es similar a la curva control mostrada en la Figura 3; sin embargo esta última no presenta la meseta que se observa en el caso de los pumas. Esto puede indicar que cuando la concentración de cortisol en la muestra es muy baja (la dilución es mayor) la prueba pierde sensibilidad.

Con base en los resultados anteriores, no se puede afirmar que la prueba sea válida para la especie *Puma concolor*, sería recomendable validar otro ensayo que utilice un anticuerpo diferente al que se utilizó para este estudio. Sin embargo, en este caso

se decidió analizar las muestras recogidas puesto que las absorbancias obtenidas fueron muy bajas, lo que indica que la concentración de cortisol es muy alta (Tabla 4).



La curva de los jaguares (Figura 7) es mucho más parecida a la del control (Figura 3), por lo que se consideró que la prueba era válida para la especie *Panthera onca*.



de las muestras de materia fecal tomadas en ambas especies antes y durante el programa de enriquecimiento ambiental. A partir de estos datos se obtuvo la concentración de cortisol en cada muestra, dada en ng/ml. En los pumas, donde no aparece la concentración de cortisol indica que el valor de la absorbancia fue muy bajo y por lo tanto no se pudo ubicar sobre la gráfica.

El número de muestras colectadas antes de iniciar el plan de enriquecimiento ambiental fue muy bajo, en comparación a las tomadas durante la realización del mismo; lo cual impide un análisis estadístico de los resultados.

Sin embargo, se puede observar (Tabla 4) que la concentración de cortisol en la materia fecal es mucho mayor en el grupo 1 que en el grupo 2. Este hecho pudo estar afectado por la edad de los individuos y la composición de los grupos (Tabla 1). En

un estudio comportamental llevado a cabo conjuntamente se evidenció que Manchas era el individuo que presentaba con mayor frecuencia estereotipias (comportamientos asociados a estrés), en relación a los otros jaguares. Es posible que esto haya influido en los resultados obtenidos. Es importante tener en cuenta también que hubo un periodo en que Buffy estuvo en celo, lo cual pudo interferir en la producción de cortisol de los tres individuos, pero en especial de Manchas, puesto que éste podía sentir el olor pero no podía estar en contacto con ella. También sucedió que Orión comenzó a marcar su territorio, se le observó orinando en spray repetidas veces y en diferentes lugares, lo que pudo haber alterado a Manchas (Rodríguez-Alvarez, 2004).

H6@5 ("J 5@CF9G C6H9B=8CG 89 56GCF65B7=5 M7CB79BH57=0B 89 7CFHGC@ 9B @5G A I 9GF5G 89 A 5H9F=5 : 975@ F97C; =85G 5BH9G M8I F5BH9 @5 F95@N57=0B 89@ 9BF=EI 97-A =9BHC 5A 6=9BH5@''@CG 85HCG GI 6F5M58CG 7CFF9GDCB89B 5 @5G A I 9GF5G F97C; =85G 8I F5BH9 9@ 9BF=EI 97-A =9BHC'' 9B @5G 75G=@@5G 8CB89 BC 5D5F979 @5 7CB79BH57=0B 89 7CFHGC@ G9 8969 5 EI 9 vGH5 9G 89A 5G=58C 5@H5 MBC DI 8C G9F I 6=7585 9B @5 ; FI : =75''

Especie	Grupo	Nº muestra	Absorbancia	Concentración de cortisol (ng/ml)		
Jaguar	1	1	0,2182	200		
		2	0,2016	210		
		3	0,2915	120		
		4	0,1871	230		
		5	0,2416	160		
		6	0,1985	230		
		7	0,1977	230		
		8	0,3610	80		
	2	9	0,4562	44		
		11	0,2964	120		
		12	0,3892	70		
		14	0,3206	94		
		15	0,2624	140		
		16	0,2415	160		
		17	0,2939	120		
		18	0,5579	18		
		19	0,4436	44		
		20	0,3420	88		
		21	0,3141	94		
		Puma	3	23	0,1019	800
				24	0,0672	--
26	0,0661			--		
27	0,0590			--		
28	0,1925			220		
29	0,0714			--		
30	0,0780			--		
31	0,0865			--		
32	0,0976			--		
4	33		0,0831	--		
	35		0,0864	--		
	37		0,0716	--		
	39		0,0905	--		
	40		0,1896	240		
	41		0,1544	310		
	42	0,0682	--			
	43	0,0889	--			
44	0,0920	--				
45	0,0834	--				
46	0,0720	--				

En cuanto a la gran diferencia que se observa en los valores obtenidos para el Grupo 2, hay que tener en cuenta que al recoger la muestra de materia fecal no se sabía de quién era, por lo que es posible que los valores más bajos correspondieran todos a uno de los integrantes de este grupo, pero no es posible asegurarlo. Sin embargo, es posible ver que no hay un patrón claro de reducción o aumento de la concentración del cortisol fecal antes y durante el enriquecimiento ambiental, esto pudo deberse a los acontecimientos mencionados anteriormente o que el enriquecimiento propuesto no fue efectivo frente a este aspecto, como lo reporta Mench (1998), los estímulos novedosos pueden llegar a causar miedo y por lo tanto, estrés; sin embargo, al correlacionar los análisis hormonales con el comportamental, hace pensar que este no fue el caso, puesto que se observó una reducción significativa en el tiempo de inactividad (Rodríguez-Alvarez, 2004).

En lo que se refiere a los pumas, pocas muestras pudieron ser cuantificadas en cuanto a la concentración de cortisol. Según esto los cuatro individuos sufren de altos niveles de estrés, pero hay que tener en cuenta que no se sabe con certeza si la prueba es válida para esta especie (Figura 6). Según los resultados obtenidos en el estudio comportamental (Rodríguez-Alvarez, 2004), el enriquecimiento ambiental no influyó de manera importante sobre la diferencia de comportamientos desplegados; en este mismo trabajo se explica que el hecho de que los cuatro individuos hayan sido mantenidos en cautiverio desde muy pequeños puede influir en estos resultados, puesto que de cierta forma podrían estar acostumbrados a un ambiente con pocos estímulos; sin embargo, sería lógico pensar que esto causaría niveles de estrés mínimos, pero según los resultados lo que sucede es lo contrario.

No es posible hacer una comparación, a simple vista, de las posibles variaciones que se presentarían según el periodo de recolección de la muestra, pero una explicación posible a este hecho es el miedo a la novedad (Mench, 1998); puesto que la mayor parte de sus vidas vivieron en un ambiente poco complejo, la presencia de estímulos novedosos puede desencadenar una respuesta de estrés. La muerte de uno de los integrantes del Grupo 4, durante el desarrollo del trabajo, pudo también haber influido en estos resultados, debido a interrupciones sociales (Wasser *et al.*, 2002).

7CB7@ G=CB9G

La medición de cortisol fecal mediante ELISA es una técnica no invasiva que evita el estrés de los animales que van a ser monitoreados, teniendo la ventaja de ser relativamente segura para la persona encargada de coleccionar las muestras, como lo describe Gual-Sill *et al.* (1999). Además de proveer una medida representativa de la secreción acumulada de glucocorticoides durante varias horas, como se reporta en los trabajos de Monfort *et al.*, (1998) y Turner *et al.*, (2002).

No es posible determinar si el kit de medición de cortisol (Cortisol ELISA Cat. N°: RE 520 61) es válido para la especie *Puma concolor*, puesto que se observa una meseta que podría indicar pérdida de la sensibilidad cuando la dilución de la muestra es muy alta. Sin embargo, para la especie *Panthera onca*, aunque las curvas control y la obtenida para esta especie no son idénticas, son muy similares y podría considerarse que este kit de medición de cortisol es válido.

Los niveles de glucocorticoides se elevan en respuesta a una gran variedad de estresores, incluyendo la falta de alimento, cambios en el hábitat, enfermedad o cambios sociales (Wasser *et al.*, 2002). Lo anterior dificulta el análisis de los datos

obtenidos a partir de las muestras de materia fecal recolectadas antes y durante el proceso de enriquecimiento ambiental. De esta manera se ve que los valores del Grupo 1 son más altos que los del Grupo 2, siendo influidos por una gran variedad de factores externos.

En cuanto a los resultados de los pumas, las absorbancias fueron muy bajas, imposibilitando la ubicación de dichos valores sobre la curva control. Esto indica que la concentración de cortisol en las muestras es muy alta (mayor de 800 ng/ml, como se ve en la Tabla 4), lo que pudo haberse debido a que los individuos fueron mantenidos en cautiverio desde muy pequeños y por lo tanto están acostumbrados a un ambiente con pocos estímulos, por lo que el enriquecimiento ambiental desencadenaría estrés. Lo anterior está de acuerdo con los resultados observados por Mench en 1998.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el número de muestras tomadas antes y durante el enriquecimiento ambiental no son equiparables y por lo tanto no permiten un análisis estadístico de las mismas.

Un inconveniente que se presentó en el estudio fue la incapacidad de reconocer el individuo al que pertenecía la muestra de materia fecal. Terio *et al.* (1999) reportan que para los animales que habitan juntos, las heces pueden ser diferenciadas

mezclando con el alimento de uno de los animales un tinte comestible. Como se observa en los datos del Grupo 2, es necesario hacer la diferenciación de los individuos, ya que la edad, el sexo y las experiencias previas son factores decisivos en cuanto al tipo de respuesta que se desencadene frente a un estímulo (Mench, 1998).

Este estudio sirve de base para resaltar la importancia de medir y evaluar el bienestar de los animales que se encuentran bajo nuestro cuidado y presenta una de las formas más útiles y sencillas para hacerlo, a pesar de que los costos son elevados. En futuras investigaciones se deberá ampliar el número de individuos y muestras colectadas, con el fin de obtener resultados más representativos de las especies. Así mismo, será necesario probar la técnica con anticuerpos diferentes para elegir el de mejor desempeño.

5; F 5897-A =9BHC

Agradecemos a todas las personas que aportaron sus valiosos conocimientos para el desarrollo de este proyecto, Doctores Andrés Gómez, José Luis Azumendi, Victoria E. Pereira y Fernando Nassar-Montoya. A todo el personal del Zoológico Jaime Duque. Al equipo de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) y en especial al Doctor Manuel Elkin Patarroyo, quien hizo posible la consecución de los materiales y la utilización de sus equipos para el desarrollo del proyecto.

6-6@C; F5: N5

- Abbott, D. *et al.* «Are Subordinates always Stressed? A Comparative Analysis of Rank Differences in Cortisol Levels among Primates». *Hormones and Behavior*. (2003): 67-82.
- Dehnhard, M. *et al.* «Noninvasive Monitoring of Adrenocortical Activity in Roe Deer (*Capreolus capreolus*) by Measurement of Fecal Cortisol Metabolites». *General and Comparative Endocrinology* 123 (2001): 111-120.
- Gual-Sill, F. *et al.* «Preliminary Results of Noninvasive Monitoring of the Estrous Cycle in Female Asian Elephants (*Elephas maximus*) through Fecal Steroid Analysis». *Proceedings AAZV*. (1999): 87-92.
- Harper, J. y Austad, S. «Fecal Glucocorticoids: A Noninvasive Method of Measuring Adrenal Activity in Wild and Captive Rodents». *Physiological and Biochemical Zoology*, 73 (1). (2000): 12-22.
- Klein, P. «La importancia de la rehabilitación de fauna silvestre». *Memorias Seminario El Estrés en Fauna Silvestre, Su Manejo en Cautiverio y Centros de Rehabilitación*. Centro de Primatología Arauquatos. Bogotá, 1998.
- Mench, J. «Environmental Enrichment and the Importance of Exploratory Behavior». *Shepherdson, D. J; Mellen, J. D; Hutchins, M. (Eds.) Second Nature, Environmental Enrichment for Captive Animals*. Smithsonian Institution Press. Washington and London. (1998): 30-46.
- Monfort, S.*et al.* «Evaluating Adrenal Activity in African Wild Dogs (*Lycaon pictus*) by Fecal Corticosteroid Analysis». *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 29. 2. (1998): 129-133.
- Morais, R.; Moreira, N; Moraes, W; Mucciolo, R.; Lacerda, O; Gomes, M.; Swanson, W.; Graham, L.; Brown, J. *Testicular and Ovarian Function in South American Small Felids Assessed by Fecal Steroids. Proceedings AAZV*, (1996): 561-565.
- Nelson, R. «Stress». *An Introduction to Behavioral Endocrinology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. (2000): 557-591.
- Rodríguez-Álvarez, C. *Enriquecimiento Ambiental para Grandes Felinos Colombianos en Cautiverio en el Zoológico Jaime Duque. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga*. Universidad de los Andes. Bogotá, 2004.
- Shepherdson, D. «Introduction: tracing the path of environmental enrichment in zoos». *Shepherdson, D.J.; Mellen, J.D.; Hutchins, M. (Eds.) Second nature, environmental enrichment for captive animals*. Smithsonian Institution Press. Washington and London. (1998): 1-12.
- Smith. T. *Zoo Research Guidelines: Monitoring Stress in Zoo Animals*. The Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland. London, 2004.
- Terio, K.; Citino, S. y Brown, J. «Fecal Cortisol Metabolite Analysis for Noninvasive Monitoring of Adrenocortical Function in the Cheetah (*Acinonyx jubatus*)». *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 30. 4. (1999): 484-491.
- Turner Jr., J.; Tolson, P. y Hamad, N. «Remote Assessment of Stress in White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*) and Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) by Measurement of Adrenal Steroids in Feces». *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33. 3. (2002): 214-221.

Wasser, S.; Hunt, K. y Clarke, C. «Assessing Stress and Population Genetics Through Noninvasive Means». Aguirre, A; Ostfeld, R. S; Tabor, G. M; House, C; Pearl, M. C. (Eds.) *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice*. Oxford University Press. 130-144.

Wielebnowski, N. *et al.* «Noninvasive Assessment of Adrenal Activity Associated with Husbandry and Behavioral Factors in the North American Clouded Leopard Population». *Zoo Biology*. (2002): 77-98.