

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2005
July-September

Artículo:

Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)

Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres

Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals

Dulce Ma. Brousset Hernández-Jáuregui* Francisco Galindo Maldonado* Ricardo A. Valdez Pérez**
Marta Romano Pardo** Aline Schuneman de Aluja***

Abstract

Glucocorticoid evaluation from samples obtained by non-invasive means has opened the possibility of carrying out these determinations in different species of wild mammals, facilitating studies on stress and the impact produced by different stimuli. A proportion of steroid hormones can appear in saliva and they are all metabolized to be eliminated through urine or feces, generally as conjugated or as non-conjugated metabolites, respectively. Nevertheless, the route of excretion and the type of metabolites could change depending on the species, making it necessary to validate the test in each case. The assessment of these steroids could be done through immunoanalysis tests such as radioimmunoassay (RIA), enzyme immunoassay (EIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). This longitudinal evaluation has been used to evaluate the impact of different types of management, the introduction of new animals, environmental manipulation, transport, translocation, veterinary procedures and assisted reproduction techniques.

Key words: CORTISOL, URINE, FECES, SALIVA, ADRENOCORTICAL EVALUATION, WILD MAMMALS.

Resumen

La evaluación de glucocorticoides a partir de muestras obtenidas en forma no invasiva ha abierto la posibilidad de llevar a cabo estas determinaciones en las especies de mamíferos silvestres, lo cual ha facilitado los estudios sobre estrés y el impacto de diferentes estímulos. Una proporción de las hormonas esteroides puede aparecer en la saliva y todas se metabolizan para ser eliminadas a través de la orina y las heces. Los metabolitos que aparecen en la orina son generalmente conjugados, a diferencia de los de las heces; sin embargo, la ruta de excreción y el tipo de metabolitos presentes varía considerablemente entre especies, por lo que es necesario estandarizar la prueba en cada caso. La evaluación de estos esteroides se realiza a través de pruebas de inmunoanálisis como el radioinmunoanálisis (RIA), enzaimmunoanálisis (EIA) y pruebas inmunoabsorbentes de unión enzimática (ELISA). Esta evaluación longitudinal se ha utilizado para valorar respuestas a cambios en el tipo de manejo, la introducción de nuevos animales, manipulaciones ambientales, transporte, reubicación, procedimientos veterinarios o de reproducción asistida.

Palabras clave: CORTISOL, ORINA, HECES, SALIVA, EVALUACIÓN ADRENOCORTICAL, MAMÍFEROS SILVESTRES.

Recibido el 25 de noviembre de 2004 y aceptado el 27 de mayo de 2005.

*Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., Tel.: 5622-5941, Fax: 5616-2342, Correo electrónico: brousset@servidor.unam.mx

**Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional. Avenida Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360, México, D.F.

***Laboratorio Aline S. de Aluja, Consejo Interno de Investigación Científica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Autor para separatas: Dulce Ma. Brousset Hernández-Jáuregui, Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Introduction

Measurement of the negative impact that different factors can have on the homeostasis of animals has widespread application in conservation biology, wild animal handling behavioral ecology, animal wellness and biomedicine. In animals that are confined it has been used to evaluate veterinary procedures and anesthetic handling, the impact of different types of facilities or environment enrichment practices, and even in assisted reproduction techniques, with the advantage that obtaining urine or fecal samples can be relatively easy. In free range animals it has been proposed as a tool to assess relocation processes, reintroductions, and aggressive interactions and even to identify populations that are vulnerable to human impact or to severe environmental conditions such as drought, El Niño events, etc. These protocols could also identify populations that are already subject to stress and that could rapidly decline when confronted with negative stimuli.¹⁻³

Although there is no precise definition, stress generally refers to a variety of responses to internal or external stimuli (stressors) that modify the homeostasis of an individual. This stimuli can be physical, physiological, behavioral or psychological factors.⁴⁻⁷ The duration of the stimulus, more than its intensity, is what seems to differentiate its impact because if a stimulus is prolonged it is generally considered to be negative, and whenever it is brief and does not repeat itself it is considered to be positive.^{8,9}

When a stimulus acts on the senses of the animal, the afferent peripheral nervous system receives it and carries it to the sensitive areas of the central nervous system (CNS). When confronted with this stimulus the animal organizes a response that is focused on decreasing its impact through the autonomous nervous system and neuroendocrine activity. The stimulation of the sympathetic part of the autonomous nervous system causes the secretion of catecholamines from the adrenal cortex. Neuroendocrine activity elicits the response of the hypothalamus-hypophysis-adrenal cortex (HHA) that begins with the secretion of the corticotrophin releasing hormone (CRH) by the hypothalamus. This hormone stimulates the anterior part of the hypophysis to secrete the adrenocorticotropin hormone (ACTH), which induces the secretion of glucocorticoids from the adrenal cortex. These steroids affect the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids, as well as other responses. Once the organism has responded to the stimulus, a negative feedback is activated; the blood levels of cortisol stop the release of ACTH by the hypophysis and CRH from the hypothalamus ceasing the secretion of catecholamines.^{4-6, 10-12}

Introducción

La medición del impacto negativo que pueden tener diferentes factores sobre la homeostasis animal tiene amplia aplicación en la biología de la conservación, manejo de fauna silvestre, ecología conductual, bienestar animal y biomedicina. En animales mantenidos en cautiverio se ha utilizado para evaluar procedimientos veterinarios y manejos anestésicos, el impacto de diferentes tipos de instalaciones o prácticas de enriquecimiento ambiental, e incluso de técnicas de reproducción asistida; con la ventaja de que obtener muestras de orina o heces puede ser relativamente sencillo. En animales de vida libre se ha propuesto como herramienta para evaluar procedimientos de reubicación, reintroducción, interacciones agresivas e incluso para identificar poblaciones vulnerables a los impactos humanos, o a condiciones ambientales severas como sequía, eventos del Niño, etc. Estos protocolos podrían incluso identificar poblaciones que ya estén sometidas a estrés y que podrían declinar rápidamente al tener que enfrentarse a nuevos estímulos negativos.¹⁻³

Aunque no existe definición precisa, generalmente el estrés se refiere a una variedad de respuestas frente a estímulos (estresores) internos o externos, que modifican la homeostasis de un individuo. Estos estímulos pueden ser factores físicos, fisiológicos, conductuales o psicológicos.⁴⁻⁷ La duración del estímulo, más que su intensidad, es lo que parece diferenciar su impacto, ya que si el estímulo es prolongado, generalmente se considera negativo, y cuando es breve y no se repite, se considera positivo.^{8,9}

Cuando un estímulo actúa sobre los sentidos del animal, el sistema nervioso periférico aferente lo recibe y lo lleva a las áreas sensitivas del sistema nervioso central (SNC). Ante este estímulo, el animal organiza una respuesta que va enfocada a disminuir su impacto, a través del sistema nervioso autónomo y actividad neuroendocrina. La estimulación de la parte simpática del sistema nervioso autónomo provoca la secreción de catecolaminas a partir de la médula adrenal. La actividad neuroendocrina activa la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal (HHA), que empieza con la secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRH) por el hipotálamo. Ésta, a su vez, estimula a la hipófisis anterior para secretar hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que induce la secreción de glucocorticoides de la corteza adrenal. Estos esteroides afectan el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, además de otros efectos. Una vez que el organismo ha respondido al estímulo, se

The glucocorticoids have at least two modes of action on the CNS. One is associated with the perception and coordination of the circadian cycles of food intake and sleep. The other is necessary in metabolic and stress processes.¹³ A great variety of specific and unspecific stimuli can increase cortisol levels: trauma, fear, intense cold or heat, electrical shock, handling, capture, anesthesia, surgery, transport, disease, exercise, a new environment, pregnancy, constant noise, aggression, mother-offspring separation and many more.^{14,15}

A single measurement of the glucocorticoid levels in plasma, saliva or urine provides little information on the wellness level of an individual. Even if the measurement is done in such a way that obtaining the sample does not activate a stress response in the animal, the level can be affected by the circadian rhythms of the glucocorticoid activity. In light of this, it is necessary to assess several regularly obtained samples during a period of several hours or days in order to compare the wellness levels of the animals that are kept in different conditions or subject to diverse stimuli.¹⁵⁻¹⁶

Furthermore, even when an increase in the concentration of glucocorticoids can represent a sensible index to assess the intensity of the lack of wellness experienced by the animal as a response to a stressor, one must remember that the adrenal cortex does not respond in the same way to all of the chronic adverse stimuli because the animals could be habituated to the stimulus and the feedback mechanism tends to decrease hormone levels.¹⁷⁻¹⁹ Also, the sensibility to these stimuli can change with the time of year, body condition and reproductive state of the animal.^{2,20} For this reason, besides assessing the glucocorticoid level it is necessary to combine it with the results of other wellness indicators.^{13,15,16}

Cortisol metabolism

In the majority of mammals the main glucocorticoid is cortisol, although in some rodent species such as the rat (*Rattus norvegicus*) it is known that it is the corticosterone.^{7,21}

Cortisol and other corticosteroids are freely transported in the blood stream or sometimes conjugated with specific globulins such as the transcortin. Its catabolism is carried out mainly in the liver, although it also occurs in the kidney, connective tissue, fibroblasts and muscle.²² the glucocorticoids are rapidly eliminated from circulation and their mean life is 80 to 120 minutes.²³⁻²⁵

Following their catabolism in the liver, steroids are eliminated through urine or bile as conjugates. In the intestine these metabolites can be reabsorbed

activa una respuesta de retroalimentación negativa, que consiste en que los niveles sanguíneos de cortisol provocan que deje de secretarse ACTH de hipófisis y CRH de hipotálamo, lo que, a su vez, produce que dejen de secretarse catecolaminas.^{4-6,10-12}

Los glucocorticoides tienen por lo menos dos modos de acción en el SNC. Uno está asociado con la percepción y coordinación de los ciclos circadianos de consumo de alimento y sueño. El otro es necesario en procesos metabólicos y de estrés.¹³ Una gran variedad de estímulos específicos e inespecíficos pueden aumentar el cortisol: trauma-tismos, miedo, calor o frío intensos, choque eléctrico, manejo, contención, anestesia, cirugía, transporte, enfermedades, ejercicio, ambiente nuevo, gestación, ruido constante, agresión, separación madre-cría y otros más.^{14,15}

Una sola medición de los niveles de glucocorticoides en plasma, saliva u orina proporciona muy poca información acerca del nivel de bienestar de un individuo. Aun si la medición se hace de tal manera que la obtención de la muestra no provoque la activación de la respuesta de estrés en el animal, el nivel puede verse afectado por los ritmos circadianos en la actividad de los glucocorticoides. Debido a esto, es necesario evaluar varias muestras obtenidas de manera regular, en un periodo de horas o días, para comparar el nivel de bienestar de los animales mantenidos en diferentes condiciones o sometidos a diversos estímulos.^{15,16}

Además, aun cuando un incremento en la concentración de glucocorticoides puede representar un índice sensible para evaluar la intensidad en la falta de bienestar experimentado por el animal como respuesta a un estresor, debe recordarse que la corteza adrenal no responde a todos los estímulos adversos crónicos siempre de la misma manera, ya que los animales pueden habituarse al estímulo y el mecanismo de retroalimentación tiende a disminuir los valores hormonales.¹⁷⁻¹⁹ Asimismo, la sensibilidad a estos estímulos puede cambiar con la época del año, la condición corporal y el estado reproductivo del animal.^{2,20} Por esta razón, además de evaluar el nivel de glucocorticoides, es necesario combinarlo con los resultados de otros indicadores del nivel de bienestar.^{13,15,16}

Metabolismo del cortisol

En la mayoría de los mamíferos el principal glucocorticoide es el cortisol, aunque en algunas especies de roedores, como la rata (*Rattus norvegicus*), se sabe que es la corticosterona.^{7,21}

El cortisol y otros corticosteroides son transportados en la sangre de manera libre o unidos a

by the enterohepatic circulation, separated by bacteria and eliminated through feces. In general, the final metabolites that appear in urine are conjugated while those that appear in feces are not. Only a small portion of free steroids in blood is secreted through the large intestine wall, which allows the finding of a small portion of the original non-conjugated steroid in urine or feces.^{22,26}

Liver metabolism of cortisol has not been described in all species; nevertheless, it is known that in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*),²⁷ rat (*Rattus norvegicus*), mouse (*Mus musculus*),²⁸ guinea pig (*Cavia porcellus*),²⁹ sheep (*Ovis aries*)³⁰ and domestic cat (*Felis catus*) it can include oxidation in C-11, oxidation or reduction in C-20 and C-21, which can produce 20-oxo and 21-oico acids, reduction of the A ring or elimination of the lateral branch in order to form a ketone group in C-17.²²

It is not possible to predict the type of metabolism that will predominate in any given species; for example among primates cortisol is present in feces of marmosets (*Saguinus* sp and *Callithrix* sp), but it has not been detected in baboons (*Papio* sp), macaques (*Macaca* sp) and chimpanzees (*Pan troglodytes*).^{3,32} Chimpanzees and humans metabolize cortisol mainly to tetra-hydroxylated steroids and to a lesser degree cortolic and cortolonic acids. Baboons carry out a 20 β reduction and eliminate the lateral chain thus producing two C-21 metabolites,²⁷ while the macaques produce 11,17-dioxoandrostanos.

Due to the aforementioned, it is necessary to identify the most important excretion route in the species of interest, as well as the type and proportion of the metabolites present in the sample. For this, radioactively labeled cortisol (14-C or 3H) is administered and then chromatography and immunoassay techniques are carried out.^{3,34} The differences, specific to each species in steroid metabolism, and the action of intestinal microflora make feces and urine contain multiple metabolites with a small amount of pure cortisol. As a consequence, the tests that use very specific cortisol antibodies can give relatively low results.³

Finally, quantification of the hormone or its metabolites present in the sample is done through radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunoassay (EIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).³

Validation of the cortisol assessment

The most important step to ensure the effectiveness of the adrenal glucocorticoid assessment system from saliva, urine or fecal samples consists in establishing the physiological importance of the components that are being assessed. Validation through a dosage-

globulinas específicas como la transcortina. Su catabolismo se lleva a cabo principalmente en el hígado, aunque también ocurre en riñón, tejido conectivo, fibroblastos y músculo.²² Los glucocorticoides son rápidamente eliminados de la circulación y la vida media es de 80 a 120 minutos.²³⁻²⁵

Después de su catabolismo en el hígado, los esteroides son eliminados en la orina o bilis como conjugados. En el intestino estos metabolitos pueden ser reabsorbidos por la circulación enterohepática, desconjugados por las bacterias y eliminados por las heces. En general, los metabolitos finales que aparecen en la orina son conjugados, en tanto que los de las heces no lo son. Sólo una pequeña proporción de los esteroides sanguíneos libres es secretada a través de la mucosa del intestino grueso, lo que permite encontrar una pequeña proporción del esteroide original, sin conjugar, en la orina o heces.^{22,26}

El metabolismo hepático del cortisol no está descrito en todas las especies; sin embargo, se sabe que en conejo (*Oryctolagus cuniculus*),²⁷ rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*),²⁸ cuyo (*Cavia porcellus*),²⁹ borrego (*Ovis aries*)³⁰ y gato doméstico (*Felis catus*) puede incluir la oxidación en el C-11, oxidación o reducción en C-20 y C-21, lo que puede producir ácidos 20-oxo, 21-oicos, reducción del anillo A o eliminación de la rama lateral para formar un grupo cetona en C-17.²²

No es posible predecir el tipo de metabolito que predominará en alguna especie; por ejemplo, entre los primates el cortisol está presente en las heces de marmosetas (*Saguinus* sp y *Callithrix* sp), pero no ha sido detectado en papiones (*Papio* sp), macacos (*Macaca* sp) y chimpancés (*Pan troglodytes*).^{3,32} Los chimpancés y los humanos metabolizan el cortisol principalmente a esteroides tetra-hidroxilados y en menor cantidad a ácidos cortolico y cortolónico. Los papiones realizan una reducción 20 β y eliminan la cadena lateral produciendo dos metabolitos C-21,²⁷ mientras que los macacos producen 11,17-dioxoandrostanos.³³

Debido a lo anterior, es necesario identificar la ruta de excreción más importante en la especie de interés, así como el tipo y proporción de los metabolitos presentes en la muestra. Para ello se administra cortisol marcado radiactivamente (14-C o 3H) y después se realizan técnicas de cromatografía e inmunoanálisis.^{3,34} Las diferencias específicas de especie en el metabolismo de los esteroides y la acción de la microflora intestinal ocasionan que las heces y la orina contengan múltiples metabolitos, con muy poco cortisol puro. Como consecuencia, las pruebas que utilizan anticuerpos de cortisol muy específicos pueden dar resultados relativamente bajos.³

Finalmente, la cuantificación de la hormona o

response curve close to one and the parallels between serial dilutions of the sample and the standard assay curve, only indicate that the test is quantifying a steroid metabolite, but it does not signify that there are or there are not changes in the concentration of hormone metabolites that reflect adrenal cortex function.^{3,34}

The most direct way to establish the physiological importance is to obtain serum and urine or feces and compare the longitudinal changes in the levels of circulating glucocorticoids and their metabolites. Also, the infusion of radioactively labeled cortisol can also help to demonstrate the direct relationship between the steroid in the serum and the metabolites that appear in urine or feces.^{35,36}

Another way to establish the physiological relevance of the quantified metabolites is through hormone challenges because when the adrenocortical stimulating hormone is used (ACTH) the concentration of glucocorticoid metabolites should increase in urine or feces after an appropriate elimination time.³ In all cases it is important to establish the physiological significance in more than one way.

Challenge with ACTH

Repeated exposure to different adverse stimuli can sensitize the HHA axis so that the response to a new stimulus could be greater. This could happen because there is a greater enzyme synthesis activity or some other type of facilitation of the HHA axis.³⁷

The objective of the ACTH challenge is to estimate the degree of alteration present in the activity of the enzyme synthesis within the adrenal cortex, which is caused by the previous activity. This test requires the injection of a hormone amount sufficient to cause the maximum glucocorticoid secretion possible by the adrenal cortex.^{15,38} In lions (*Panthera leo*)³⁹ and in some antelope species (*Connochaetes taurinus* and *Tragelaphus strepsiceros*)⁴⁰ the ACTH challenge tests have been used to demonstrate that electroejaculation causes a much smaller release of cortisol than when exogenous ACTH is administered.

Some wild animal species where this test has been carried out in order to validate the measurement of cortisol metabolites in feces or urine include hares (*Lepus europaeus*),³⁴ spotted hienas (*Crocuta crocuta*),⁴¹ cheetah (*Acinonyx jubatus*),^{3,42} clouded leopard (*Neofelis nebulosa*),^{3,43} baboons (*Papio* sp), macaques (*Macaca* sp), African elephants (*Loxodonta africana*), sea otter (*Enhydra lutris*), moose (*Cervus elaphus*), sun bear (*Helarctos malayanus*), black rhinoceros (*Diceros bicornis bicornis*) and scimitar oryx (*Oryx gazella*).³

Suppression test with dexamethasone

de sus metabolitos, presentes en la muestra, se hace mediante el radioinmunoanálisis (RIA), enzaimunoanálisis (EIAs) y pruebas inmunoabsorbentes de unión enzimática (ELISA).³

Validación de la determinación de cortisol

El paso más importante para asegurar la eficacia de un sistema de evaluación de los glucocorticoides adrenales a partir de muestras de saliva, orina o heces, consiste en establecer la relevancia fisiológica de los componentes que se están evaluando. La validación a través de la curva de dosis-respuesta cercana a uno y el paralelismo entre las diluciones seriadas de la muestra y la curva estándar del ensayo, sólo indica que la prueba está cuantificando un metabolito de un esteroide, pero no señala si hay o no cambios en la concentración de los metabolitos hormonales que reflejen función adrenocortical.^{3,34}

La forma más directa de establecer la relevancia fisiológica es obtener suero y orina o heces y comparar los cambios longitudinales en los niveles de glucocorticoides circulantes y sus metabolitos. Además, la utilización de una infusión de cortisol marcado radiactivamente también puede ayudar a mostrar la relación directa entre el esteroide en el suero y los metabolitos que aparecen en la orina o las heces.^{35,36}

Otra forma de establecer la relevancia fisiológica de los metabolitos cuantificados es a través de desafíos hormonales, ya que al utilizar la hormona que estimula la función adrenocortical (ACTH), deberá aumentar la concentración de metabolitos de glucocorticoides en la orina o las heces después de un tiempo apropiado de eliminación.³ En todos los casos es importante establecer el significado fisiológico en más de una forma.

Desafío con ACTH

La exposición repetida a diferentes estímulos adversos puede sensibilizar al eje HHA, de manera que la respuesta a un nuevo estímulo sea mayor. Esto quizá ocurre porque hay mayor actividad de síntesis enzimática o algún otro tipo de facilitación en el eje HHA.³⁷

El objetivo de la prueba de desafío de ACTH es estimar el grado de alteración existente en la actividad de síntesis enzimática en la corteza adrenal provocada por la actividad previa. Esta prueba requiere de la inyección de una cantidad suficiente de hormona para provocar la máxima secreción posible de glucocorticoides por la corteza adrenal.^{15,38} En leones (*Panthera leo*)³⁹ y algunas especies de antílopes

Dexamethasone normally provokes a suppression of ACTH production, which decreases the release of glucocorticoids; but does not have this effect when the HHA axis is hyperactive, suggesting a malfunction in the negative feedback mechanism.¹⁵ Sapolsky⁴⁴ found that subordinate baboons had a greater level of cortisol than dominant animals in the stable social hierarchy season and that when ACTH was administered the same response was produced in all animals. Nevertheless, dexamethasone did not achieve cortisol suppression in the subordinates. The author concluded that glucocorticoid regulation by negative feedback in the hypothalamus and anterior hypophysis was less effective in subordinate animals.

Other tests to assess adrenal function are the administration of corticotrophin releasing hormone (CRH) or *post-mortem* assessment of the size and structure of the gland, which in general are associated with a greater activity.¹⁵

Selection of the sample type

Blood

The activation of the HHA axis and the release of cortisol are common to a great variety of stimuli, including capture and handling of animals. These successes produce a rapid elevation of glucocorticoids within 5 to 10 minutes and reaching a maximum level in 30 to 60 minutes. Serial samples present the cumulative effect of stress caused by handling. Assessment from blood samples is carried out more frequently in domestic animals and for this type of studies the use of catheters is preferred over frequent vein puncture.^{30,45}

For free ranging animals it has been suggested to use a "serial stress assessment protocol" which consists in obtaining a blood sample immediately after their capture and after each predetermined time period during handling. Interpretation of these glucocorticoid patterns must be done with caution because handling also activates the HHA axis; but they can still be used as a standard for the population under benign conditions and then compared to further assessments when the population is under different stimuli. If, for example, the individuals of a population show a rapid and marked increase in glucocorticoids they could be more vulnerable to impacts from other environmental stimuli.²

Some cortisol determinations in blood carried out in wild animals have been done in order to compare the negative impact of physical capture and anesthesia in wild felines,⁴⁶ relocation of African ungulates,⁴⁷ during reproductive assessment in leopards (*Panthera*

(*Connochaetes taurinus* y *Tragelaphus strepsiceros*),⁴⁰ las pruebas de desafío con ACTH se han utilizado para demostrar que la electroeyaculación provoca una liberación de cortisol mucho menor que cuando se administra ACTH exógena.

Algunas especies de fauna silvestre en las que se ha realizado esta prueba para validar la medición de metabolitos de cortisol en heces u orina, incluyen liebres (*Lepus europaeus*),³⁴ hienas manchadas (*Crocuta crocuta*),⁴¹ guepardos (*Acinonyx jubatus*),^{3,42} leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*),^{3,43} papiones (*Papio* sp), macacos (*Macaca* sp), elefantes africanos (*Loxodonta africana*), nutria marina (*Enhydra lutris*), alce (*Cervus elaphus*), oso malayo (*Helarctos malayanus*), rinoceronte negro (*Diceros bicornis bicornis*) y oryx cimitarra (*Oryx gazella*).³

Prueba de supresión con dexametasona

La dexametasona normalmente provoca supresión de la producción de ACTH, lo que disminuye la liberación de glucocorticoides; pero no tiene este efecto cuando el eje HHA está hiperactivo, ello sugiere mal funcionamiento en el mecanismo de retroalimentación negativo.¹⁵ Sapolsky⁴⁴ encontró que los papiones subordinados tenían mayor nivel de cortisol que los animales dominantes en la época de jerarquía social estable y que cuando les administraba ACTH se producía la misma respuesta en todos los animales. Sin embargo, la dexametasona no logró suprimir la secreción de cortisol en los subordinados. El autor concluyó que la regulación de los glucocorticoides por retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis anterior era menos efectiva en los animales subordinados.

Otras pruebas para evaluar la función adrenal son la administración de hormona liberadora de corticotropina (CRH) o la evaluación *postmortem* del tamaño y de la estructura de la glándula, que generalmente se asocian con mayor actividad de ésta.¹⁵

Selección del tipo de muestra

Sangre

La activación del eje HHA y la liberación de cortisol son comunes a una gran variedad de estímulos, incluyendo la captura y manejo de los animales. Estos sucesos provocan una elevación rápida de glucocorticoides, normalmente en 5-10 minutos y que alcanza su nivel máximo en 30-60 minutos. Las muestras seriadas presentan el efecto acumulativo del estrés causado por el manejo. La evaluación a partir de muestras de sangre se realiza con más frecuencia en animales domésticos, y para este tipo de

pardus japonensis) and tigers (*Panthera tigris*)⁴⁸ and the influence of gender, age and season of the year in wild and semi-domesticated dolphins (*Tursiops truncatus*).⁴⁹

Saliva

Studies in pigs (*Suis scrofa*) have demonstrated that the cortisol that is present in saliva is related to cortisol that is free in the bloodstream and represents approximately 10% of that which is in plasma.⁵⁰ Cortisol takes less than a minute to pass from blood to saliva therefore, it is recommended that the sample collection time be less than a minute.⁵¹ This type of samples has been assessed in non-human primates used in biomedical research, such as Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) that have been trained to become habituated to sample collection.⁵²

Urine

Urine samples can be obtained directly from the animal, aspirated from the floor or from cages specifically designed for this.^{53,54} Due to the fact that the collection of all urine produced by an animal during the full 24 hours in a day is difficult and impractical, in general one sample a day is obtained. The amount of urine produced in one day is not constant and the concentration of any solute present in it is modified according to the amount of water and inorganic salts filtered through the kidney. For this reason, it is recommended to adjust the concentration of the urinary metabolite found in a urine sample so that it is not as dependant on the general concentration of the urine therefore, better reflects the changes in hormone production. This is achieved by creatinin measurements which index the metabolite concentrations according to its amount.^{53,55}

Some examples of cortisol determination from urine samples are those that have been used for assessing the effect of space and type of housing in animals kept in captivity such as in foxes (*Alopex lagopus*),⁵⁶ macaques (*Macaca nemestrina* and *M. fascicularis*)⁵⁷ and in diverse species of wild felines.⁵⁸ In gorillas (*Gorilla gorilla*) it was used for assessing the changes produced after giving birth⁵⁹ and in leopard cats (*Felis bengalensis*) in relation to different environment enrichment techniques.⁶⁰

Feces

Because steroid metabolites that are found in the intestine are transported with the ingesta, the passage speed from the duodenum to the rectum can give an estimate of the time they appear in feces;

estudios se prefiere la cateterización en lugar de la punción venosa frecuente.^{30,45}

En animales en vida libre se ha sugerido usar un "protocolo seriado de evaluación de estrés", que consiste en obtener una muestra sanguínea inmediatamente después de la captura del animal y de cada determinado tiempo mientras dura el manejo. La interpretación de estos patrones de glucocorticoides debe hacerse con precaución, ya que el manejo también activa al eje HHA; pero pueden usarse como un estándar de la población bajo condiciones benignas y compararse con evaluaciones posteriores cuando la población se encuentre bajo diferentes estímulos. Si los individuos de una población, por ejemplo, muestran elevación muy rápida y marcada de glucocorticoides, podrían ser más vulnerables al impacto de otros estímulos ambientales.²

Algunas determinaciones de cortisol en sangre realizadas en fauna silvestre se han llevado a cabo para comparar el impacto negativo de la captura física y la anestesia en felinos silvestre,⁴⁶ de la reubicación de ungulados africanos,⁴⁷ durante la evaluación reproductiva en leopardos (*Panthera pardus japonensis*) y tigres (*Panthera tigris*)⁴⁸ y de la influencia del sexo, edad y época del año en delfines silvestres (*Tursiops truncatus*) y semidomesticados.⁴⁹

Saliva

Estudios en cerdos (*Suis scrofa*) han demostrado que el cortisol que está presente en saliva se relaciona con el cortisol libre en sangre y representa aproximadamente 10% del que se encuentra en plasma.⁵⁰ El cortisol tarda menos de un minuto en pasar de sangre a saliva, por lo que se recomienda que el tiempo de recolección de la muestra sea menor a un minuto.⁵¹ Este tipo de muestras se ha evaluado en primates no humanos utilizados en investigación biomédica, como monos rhesus (*Macaca mulatta*) que han sido entrenados para habituarse a la obtención de la muestra.⁵²

Orina

Las muestras de orina pueden obtenerse del animal, aspirarse del piso, o de jaulas adaptadas especialmente para ello.^{53,54} Debido a que la obtención de toda la orina producida por un animal durante las 24 horas del día es difícil e impráctico, generalmente se obtiene una muestra al día. La cantidad de orina producida a lo largo del día no es constante y la concentración de cualquier soluto presente en ella se modifica de acuerdo con la cantidad de agua y sales inorgánicas filtradas a través del riñón. Por esta razón, se recomienda ajustar la concentración del

nevertheless, the time can be modified by factors such as constipation, diarrhea, feed restriction, amount of fiber in the diet, treatment with antibiotics that modify the intestinal flora or even due to individual variations.^{22,61}

In fecal samples there is no correction index such as creatinin in urine. Therefore, dehydration, pulverization and homogenization of the samples has been recommended before subjecting them to the extraction procedure, in order to present the results in dry matter basis.^{62,63} Selection of the extraction method to which fecal samples are subjected before hormone measurement, shall depend on the different proportions of conjugated and non-conjugated metabolites present in the species.³

Some applications of the cortisol metabolite assessment in feces are to estimate the impact of relocation, agonistic interactions and physical conflicts⁴¹ of social behavior^{20,42,64} and even their relationship with reproductive activity.^{1,65,66}

Table 1 presents some species of wild mammals where cortisol metabolite assessment has been carried out from saliva, feces or urine samples.

Conclusions

One of the indicators that have been proposed for assessing animal wellness is the level of adrenocorticoid corticosteroids assuming that stress causes an increase in the reactivity of the adrenal cortex. This is reflected in a higher level of glucocorticoids and that the response of the animal to an acute stimulus is greater if the individual has been repeatedly exposed to other negative stimuli.^{3,16} For example, in the study by Nogueira and Silva,⁴⁶ where they assessed the effect of anesthesia on the plasmatic values of cortisol in jaguars, tigrine cat, pumas, ocelots and jaguarondis they found that it increased after handling. In the same manner, Carlstead⁵⁸ in a study where he assessed the impact on the level of urinary cortisol metabolites when moving different feline species to new housings, he found that the values decreased after several days. Furthermore, an increase in fecal glucocorticoid metabolites has been found after relocation of cheetahs to unknown environments.⁴²

There is a great quantity of valuable information that can be obtained from assessing adrenal glucocorticoid metabolites present in urine or feces of the different wild animal species, both in captivity and free ranging. This technique can be applied to assess different handling systems, facilities, social interactions and even, to detect vulnerable free roaming populations.

Nevertheless, it is necessary to remember that: a) there is a time interval between the changes in

metabolito urinario encontrado en una muestra de orina, de tal manera que sea menos dependiente de la concentración general de la orina y refleje mejor los cambios en la producción de la hormona, lo cual se logra mediante determinaciones de creatinina, que indizan las concentraciones del metabolito de acuerdo con el valor de ésta.^{53,55}

Algunos ejemplos de las determinaciones de cortisol a partir de muestras de orina son los que la han utilizado para evaluar el efecto del espacio y tipo de albergues en animales mantenidos en cautiverio, como en zorras (*Alopex lagopus*),⁵⁶ en macacos (*Macaca nemestrina* y *M. Fascicularis*)⁵⁷ y en diversas especies de felinos silvestres.⁵⁸ En gorilas (*Gorilla gorilla*) se utilizó para evaluar los cambios producidos después del parto⁵⁹ y en gatos leopardo (*Felis bengalensis*) en relación con diferentes técnicas de enriquecimiento ambiental.⁶⁰

Heces

Debido a que los metabolitos de los esteroides que se encuentran en el intestino son transportados con la ingesta, la velocidad del paso del duodeno al recto puede dar una estimación del tiempo en que aparecen en las heces; sin embargo, el tiempo puede modificarse por factores como constipación, diarrea, restricción de alimento, cantidad de fibra en la dieta, tratamientos con antibióticos que modifiquen la flora intestinal, o incluso por variación individual.^{22,61}

En las muestras de heces no se cuenta con un índice de corrección como es la creatinina para las muestras de orina. Por ello se ha recomendado la deshidratación, pulverización y homogeneización de las muestras antes de someterlas al procedimiento de extracción, para informar los resultados en base seca.^{62,63} La selección del método de extracción al que se sometan las muestras de heces antes de la medición hormonal dependerá de las diferentes proporciones de metabolitos conjugados y no conjugados presentes en la especie.³

Algunas aplicaciones de la evaluación de metabolitos de cortisol en heces son estimar el impacto de la reubicación, de las interacciones agonistas y de los conflictos físicos,⁴¹ de la conducta social^{20,42,64} e incluso de su relación con la actividad reproductiva.^{1,65,66}

En el Cuadro 1 se incluyen algunas especies de mamíferos silvestres en las que se ha realizado la evaluación de metabolitos de cortisol a partir de muestras de saliva, heces u orina.

Cuadro 1

**RELACIÓN ENTRE EL PERIODO DE GESTACIÓN Y EL PERIODO CRÍTICO
DE DESARROLLO EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DE ALGUNOS MAMÍFEROS**

**RELATIONSHIP BETWEEN THE GESTATION PERIOD AND THE CRITICAL PERIOD IN THE
DEVELOPMENT OF SEXUAL DIFFERENTIATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF
CERTAIN MAMMALS**

<i>Species</i>	<i>Time of gestation (days)</i>	<i>Critical period (days after conception)</i>
Rat	20 a 22	18 a 27
Mouse	19-20	Postnatal
Hamster	16	Postnatal
Guinea pig	63-70	30-37
Ferret	42	Postnatal
Dog	58-63	Prenatal and postnatal
Bovine	280-285	80-100
Sheep	145-155	30-90
Rhesus monkey	146-180	40-60



the level of a hormone in the blood stream and its appearance in saliva, urine and feces; b) that feces and urine contain metabolites of the hormone and not the natural hormone, that the metabolites vary between species, even among those that are very related, even though the natural hormone is the same; c) that when interpreting the results of these assessments it must be taken into account that glucocorticoids participate in many functions of the organism, not only as a response to stress. Furthermore, there is a great diversity of stimuli that initiate the activation of the HHA axis and that the response can vary among individuals and also within an individual according to the time of year, reproductive stage, body condition and even experience and habituation.

Several studies that have used this type of assessment,^{3,32,41,67} emphasize the need to carry out species specific validations before its use to assess biological responses associated with stress. Furthermore, the selection of the type of sample, extraction method and specific antibody shall depend on the species in question and the particular conditions of each study.^{68,69}

Since there are continuous activities developed with wild animals in zoos, in species conservation and relocation, it is important that studies be continued to detect the stress levels during these activities and thus be able to fine-tune the procedures.

Referencias

1. Brown JL, Wildt DE. Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal steroid monitoring. *Int Zoo Yb* 1997; 35:173-191.
2. Wingfield JC, Hunt K, Breuner C, Dunlap K, Fowler GS, Freed L, *et al.* Environmental stress, field endocrinology and conservation biology. In: Clemmons JR, Buchholz editors. *Behavioral approaches to Conservation in the wild*. Cambridge: University Press, UK; 1997: 95-131.
3. Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, *et al.* A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Endocrinology* 2000; 120: 260-275.
4. Dantzer R, Mormede P. Stress in farm animals: a need for reevaluation. *J Anim Sci* 1983; 57:6-18.
5. Knol BW. Stress and the endocrine hypothalamus-pituitary-testis system: a review. *Vet Q* 1991; 13:104-114.
6. Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanism; a review. *Biol Reprod* 1991; 45:523-532.
7. Stratakin CA, Chrousos GP. *Neuroendocrinology*

Conclusiones

Uno de los indicadores que han sido propuestos para la evaluación del bienestar animal es el nivel de corticosteroides adrenocorticales, asumiendo que el estrés provoca aumento en la reactividad de la corteza adrenal. Esto se refleja en un nivel mayor de glucocorticoides y en que la respuesta del animal ante un estímulo agudo sea mayor si el individuo ha estado expuesto en forma repetida a otros estímulos negativos.^{3,16} Por ejemplo, en el estudio de Nogueira y Silva,⁴⁶ donde evaluaron el efecto de la anestesia sobre los valores plasmáticos de cortisol en jaguares, tigrinas, pumas, ocelotes y jaguarundis, encontraron que éste aumentaba después del manejo. De igual manera, Carlstead,⁵⁸ en un estudio donde evaluó el impacto sobre el nivel de metabolitos urinarios de cortisol al mover a diferentes especies de felinos a albergues nuevos, encontró que los valores disminuyeron después de varios días. Asimismo, se ha encontrado elevación de metabolitos fecales de glucocorticoides después de la reubicación de los animales a ambientes desconocidos en guepardos.⁴²

Existe gran cantidad de información valiosa que puede ser obtenida a través de la evaluación de los metabolitos de glucocorticoides adrenales presentes en orina o heces de las diferentes especies de fauna silvestre, tanto en cautiverio como en vida libre. Esta técnica puede ser aplicada para evaluar diferentes sistemas de manejo, instalaciones, interacciones sociales e, incluso, detectar poblaciones vulnerables en vida libre.

Sin embargo, es necesario recordar que: a) Existe un espacio de tiempo entre los cambios en el nivel de una hormona en la sangre y su reflejo en la saliva, orina y heces; b) las heces y la orina contienen metabolitos de la hormona y no la hormona natural, los metabolitos varían entre especies, aun entre aquellas muy relacionadas, a pesar de que la hormona natural sea la misma; c) al interpretar los resultados de estas evaluaciones debe tomarse en cuenta que los glucocorticoides participan en infinidad de funciones del organismo, no sólo como respuesta al estrés. Además, existe gran diversidad de estímulos que desencadenan la activación del eje HHA y la respuesta puede variar entre individuos y también en un mismo individuo de acuerdo con la época de año, etapa reproductiva, condición corporal e incluso su experiencia y habituación.

Varios de los estudios que han utilizado este tipo de evaluación^{3,32,41,67} enfatizan la necesidad de realizar validaciones específicas por especie antes de utilizarla para evaluar respuestas biológicas asociadas con el estrés. Asimismo, la selección del tipo de muestra, método de extracción y anticuerpo especí-

- and pathophysiology of the stress system. In Stress, basic mechanism and clinical implications. Ann N Y Acad S 1995; (771): 1-18.
8. Moodie EM, Chamove AS. Brief threatening events beneficial for captive tamarins? Zoo Biol 1990; 9:275-286.
 9. Wingfield JC, Ramenofsky M. Hormones and the behavioral ecology of stress. In: Balm PHM, editor. Stress physiology in animals. England Sheffield Academic Press-CRC Press; 1999:1-41.
 10. Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: their interaction and regulation. Science 1984; 224:452-459.
 11. Friend TH. Symposium response of animals to stress: behavioral aspects of stress. J Dairy Sci 1991; 74:292-303.
 12. Kopin IJ. Definitions of stress and sympathetic neuronal response. In Stress, basic mechanism and clinical implications; Ann N Y Acad Sci, 1995; 771:19-30.
 13. Clark JD, Rager DR, Calpin JP. Animal well-being III. Specific assessment criteria. Lab Anim Sci 1997b; 47: 586-596.
 14. Guyton AC. Textbook of medical physiology. 8th ed Philadelphia: WB Saunders Co, 1991.
 15. Broom DM, Johnson KG. Assessing welfare: short term responses. In: Broom DM, Johnson KG, editors. Stress and animal welfare, London: Chapman and Hall, 1993:87-144.
 16. Broom DM. The scientific assessment of animal welfare. Appl Anim Behav Sci 1988; 20:5-19.
 17. Moberg GP. Problems defining stress and distress in animals. J Am Vet Assoc 1987; 191:1207-1211.
 18. Rushen J. Problems associated with the interpretation of physiological data in the assessment of animal welfare. App Anim Behav Sci 1991; 28:381-386.
 19. Clark JD, Rager DR, Calpin JP. Animal well-being III. An overview of assessment. Lab Anim Sci 1997a ; 47: 580-585.
 20. Strier KB, Ziegler TE, Wittwer DJ. Seasonal and social correlates of fecal testosterone and cortisol levels in wild male muriquis (*Brachyteles arachnoids*). Horm Behav 1999; 35:125-134.
 21. Bélanger B, Couture J, Caron S, Boudou P, Fiet J, Bélanger A. Production and secretion of C19 steroids by rat and guinea pig adrenals. Steroids 1990; 55:360-365.
 22. Brownie AC. The metabolism of adrenal cortical steroids. In: James VHT, editor. The adrenal gland. New York: Raven Press Ltd; 1992: 209-224.
 23. Setchel KDR, Gontscharow NP, Axelson M, Sjövall J. The characterization of polar corticosteroids in the urine of the macaque monkey (*Macaca fascicularis*) and the baboon (*Papio hamadryas*). Acta Endocrinol 1975; 79:535-550.
 24. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocr Rev 1984; 5:25-44.
 25. Vylitová M, Miksik I, Pácha J. Metabolism of corticosteron in mammalian and avian intestine. Gen Comp Endocrinol 1998; 109:315-324.
 26. Shille VM, Haggerty MA, Shackleton C, Lasley BL. Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology 1990; 34:779-794.
 27. Senciall IR, Rahal S, Roberts R. Corticosteroid side chain oxidation and metabolism of 20-dihydro steroids and evidence for steroid acid formation by direct oxidation at C-21. J Steroid Biochem Mol Biol 1992; 41:151-160.
 28. Han A, Marandici A, Monder C. Metabolism of corticosterone in the mouse, identification of 11, 20 - dihydroxy-3-oxo-4-pregnen-21-oii acid as a major metabolite. J Biol Chem 1983; 258:13703-13707
 29. Quinkler M, Kosmale B, Bahr V, Oelkers W, Diederich S. Evidence for isoforms of 11 -hydroxysteroid dehydrogenase in the liver and kidney of the guinea pig. J Endocrinol 1998; 153:291-298.
 30. Palme R, Möstl E, Brem G, Schellander K, Bamberg E. Faecal metabolites of infused ¹⁴C progesterone in domestic livestock. Reprod Domestic Anim 1997; 32:199-201.
 31. Graham LH, Brown JL. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for noninvasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. Zoo Biol 1996; 15:71-82.
 32. Bahr NI, Palme R, Mohle JK, Heistermann M. Comparative aspects of the metabolism of cortisol in three individual nonhuman primates. Gen Comp Endocrinol 2000; 117:427-438.
 33. Setchel KDR, Shackleton CHL. The *in vivo* metabolism of cortisol and corticosterone by the macaque monkey (*Macaca fascicularis*). Acta Endocrinol 1973; 78:91-109.
 34. Gimpel J, Lord A. Validation of faecal corticosteroid analysis. Proceedings of the International Society of Applied Ethology. 2000 Oct 17-20 Florianopolis, Brasil; Ramos A, Pinheiro MLC, Hötzel MJ, editors, Florianopolis; Brasil: Federal University of Santa Catarina, 2000: 137.
 35. Teskey-Gerstl A, Bamberg E, Steineck T, Palme R. Excretion of corticosteroids in urine and feces of hares (*Lepus europaeus*). J Comp Physiol 2000; 170:163-168.
 36. Schatz S, Palme R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. Vet Res Commun 2001; 25:271-287.
 37. Restrepo A, Armario A. Chronic stress alters pituitary-adrenal function in prepuberal male rats. Psychoneuroendocrinology 1987; 12:393-398.
 38. Dantzer R. Animal welfare methodology and criteria. Rev Sci Tech 1994; 13:291-302.

39. Wildt DE. Male reproduction: assessment, management and control of fertility. In: Kleiman DG, Allen ME, Thompson KV, Lumpkin S, editors. Wild mammals in captivity. Chicago, Chicago Press; 1996:429-450.
40. Schiewe MC, Bush M, de Vos V, Brown JL, Wildt DE. Semen characteristics, sperm freezing and endocrine profiles in free-ranging wildebeest (*Connochaetes taurinus*) and greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) J Zoo Wildl Med 1991; 22:58-72.
41. Goyman W, Möstl E, van't Hof T, East ML, Hofer H. Non-invasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas *Crocuta crocuta*. Gen Comp Endocrinol 1999; 114:340-348.
42. Terio KA, Citino SB, Brown JL. Fecal cortisol metabolism analysis for noninvasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*) J Zoo Wildl Med 1999; 30:484-491.
43. Stillwell HJ, Brown JL, Graham LH. Assessment of a commercially available radioimmunoassay for the detection of fecal cortisol metabolites in several non domestic felid species. Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians; 1996 November 3-8; Puerto Vallarta, Mexico. St Louis Missouri USA: Charlotte Kirk editor, AZV-AZCARM: 1996: 582-583.
44. Sapolsky RM. Individual differences in cortisol secretory patterns in the wild baboon: role of negative feedback sensitivity. Endocrinology 1983; 113:2263-2267.
45. Friend TH, Polan CE, Gwazdauskas FC, Heald CW. Adrenal glucocorticoid response to exogenous adrenocorticotropin mediated by density and social disruption in lactating cows. J Dairy Sci 1977; 60:1958-1963.
46. Nogueira GP, Silva JCR. Plasma cortisol levels in captive wild felines after chemical restraint. Braz J Med Biol Res 1997; 30:1359-1361.
47. Morton DJ, Anderson E, Foggin CM, Kock MD, Tiran EP. Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. Vet Rec 1995; 136:60-63.
48. Brown JL, Goodrowe KL, Simmons LG, Armstrong DL, Wildt DE. Evaluation of the pituitary-gonadal response to GnRH, and adrenal status in the leopard (*Panthera pardus japonensis*) and tiger (*Panthera tigris*). J Reprod Fertil 1988; 82:227-236.
49. Aubin DJ, Ridgway SH, Wells RS, Rhinehart H. Dolphin thyroid and adrenal hormones: circulating levels in wild and semidomesticated *Tursiops truncatus*, and influence of sex, age and season. Marine Mammal Sci 1996; 12:1-13.
50. Parrot RF, Misson BH, Baldwin BA. Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. Br Vet J 1989; 145:362-366.
51. De Jong IC, Prelle IT, Van de Burgwal JA, Lambooy E, Korte SM, Blokhuis HJ, et al. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. Physiol Behav 2000; 68:571-578.
52. Lutz CK, Tiefenbacher S, Jorgensen MJ, Meyer JS, Novak MA. Techniques for collecting saliva from awake, unrestrained, adult rhesus monkeys for cortisol assay. Am J Primatol 2000; 52:93-99.
53. Hodges JK. Determining and manipulating female reproductive parameters. In: Kleiman DG, Allen ME, Thompson KV, Lumpkin S, editors. Wild mammals in captivity, principles and techniques. Chicago: The University of Chicago Press; 1996; 418-428.
54. Lasley, BL. Methods for evaluating reproductive function in exotic species. Adv Vet Sci Comp Med 1985; 30: 209-228.
55. Goossens MMC, Meyer HP, Voorhout G, Sprang EPM. Urinary excretion of glucocorticoids in the diagnosis of hyperadrenocorticism in cats. Dom Anim Endocrinol 1995; 12:355-362.
56. Korhonen H, Niemela P, Jauhiainen L, Tupasela T. Effects of space allowance and earthen floor on welfare-related physiological and behavioural responses in male blue foxes. Physiol Behav 2000; 69:571-580.
57. Crockett CM, Shimoji M, Bowden DM. Behavior, appetite and urinary cortisol responses by adult female pigtailed and longtailed macaques to cage size, cage level, room changes and sedation. Am J Primatol 2000; 52:63-80.
58. Carlstead K, Brown JL, Monfort SL, Killens R, Wildt DE. Urinary monitoring of adrenal responses to psychological stressors in domestic and nondomestic felids. Zoo Biol 1992; 11:165-176.
59. Bahr NI, Pryce CR, Dobeli M, Martin RD. Evidence from urinary cortisol that maternal behavior is related to stress in gorillas. Physiol Behav 1998; 64:429-437.
60. Carlstead K, Brown JL, Seidensticker J. Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). Zoo Biol 1993; 12:321-331.
61. Palme R, Fischer P, Schildorfer H, Ismail MN: Excretion of infused 14C-steroid hormones via feces and urine in domestic livestock. Anim Reprod Sci 1996; 43:43-63.
62. Adams NR, Abordi JA, Briegel JR, Sanders MR. Effect of diet on the clearance of estradiol-17 in the ewe. Biol Reprod 1994; 51:668-674.
63. Wasser SK, Thomas R, Nair PP, Guidry C, Southers J, Lucas J, et al. Effects of dietary fiber on faecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). J Reprod Fertil 1993; 97:569-574.
64. McLeod PJ, Moger WH, Ryon J, Gadbois S, Fentress JC. The relation between urinary cortisol levels and social behavior in captive timber wolves. Can J Zool 1996; 74:209-216.
65. Morais, RN, Mucciolo RG, Gomes ML, Lacerda O, Moraes W, Moreira N, et al. Adrenal activity assessed by fecal corticoids and male reproductive traits in three South American felid species. Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians; 1996 November 3-8; Puerto Vallarta, Mexico. St Louis Missouri USA: Charlotte Kirk editor, AZV-AZCARM: 1996: 220-223.
66. Jurke MH, Czekala NM, Lindburg DG, Millard SE. Fecal corticoid metabolite measurement in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). Zoo Biol 1997; 16:133-147.

67. Wallner B, Möstl E, Dittami J, Prossinger H. Faecal glucocorticoids document stress in female Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). *Gen Comp Endocrinol* 1999; 113:80-86.
68. Möstl E, Palme R. Hormones as indicators of stress. *Dom Anim Endocrinol* 2002; 23:67-74.
69. Creel S. Social dominance and stress hormones. *Ecol Evol* 2001; 16:491-497.
70. Schwarzenberger F, Kolter L, Zimmermann W, Rietschel W, Matern B, Bircher, P *et al.* Faecal cortisol metabolite measurement in the okapi (*Okapia johnstoni*). Proceedings of the 2nd International Symposium on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals Hofer H editor, Institute of Zoo and Wildlife Research, Berlin 1998, Oct 7-10.
71. Foley CAH, Papageorge S, Wasser SK. Noninvasive stress and reproductive measures of social and ecological pressure in free-ranging elephants (*Loxodonta africana*). *Conserv Biol* 2001; 15:1134-1142.
72. Stead SK, Meltzer DG, Palme R. The measurement of glucocorticoid concentrations in the serum and feces of captive African elephants (*Loxodonta africana*) after ACTH stimulation. *J S Afr Vet Assoc* 2000; 71:192-196.
73. Whitten PL, Stavisky R, Aurell F, Russell E. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am J Primatol* 1998; 44:57-69.
74. Boinski S, Swing SP, Gross TS, Davis JK. Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus paella*): behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. *Am J Primatol* 1999; 48:49-68.
75. Ziegler TE, Scheffler G, Snowdon CT. The relationship of cortisol levels to social environment and reproductive functioning in female cotton-top tamarins, *Saguinus oedipus*. *Horm Behav* 1995; 29:407-424.
76. Smith TE, French JA. Social and reproductive conditions modulate urinary cortisol excretion in black tufted-ear marmosets (*Callithrix kuhli*). *Am J Primatol* 1997; 42:253-267.
77. Sousa MB, Ziegler TE. Diurnal variation on the excretion patterns of fecal steroids in common marmoset (*Callithrix jacchus*) females. *Am J Primatol* 1998; 46:105-117.
78. Cavigelli SA. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Anim Behav* 1999; 57:935-944.
79. Wielebnowski NC, Fletchall N, Carlstead K, Busso JM, Brown JL. Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biol* 2002; 21:77-98.
80. Creel S. Social stress and dominance. *Nature* 1996; 379: 212.
81. Creel S, Creel NM, Monfort SL. Rank and reproduction on cooperatively breeding African wild dogs: behavioral and endocrine correlates. *Behav Ecol* 1997; 8:298-306.
82. Creel S, Creel NM, Monfort SL. Radiocollaring and stress hormones in African wild dogs. *Conserv Biol* 1997; 11:544-548.
83. Monfort SL, Mashburn KL, Brewer BA, Creel SR. Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *J Zoo Wildl Med* 1998; 29:129-133.
84. D Agostino J. Steroid metabolites as an indicator of chronic stress. Proceedings of the 2nd International Symposium on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals. Hofer H, editor, Institute of Zoo and Wildlife Research, Berlin 1998, Oct 7-10.
85. Creel S, Creel NM, Monfort SL. Behavioral and endocrine mechanisms of reproductive suppression in Serengeti dwarf mongoose. *Anim Behav* 1992; 43:231-245.