



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO Y RESPUESTA
ADRENOCORTICAL EN 4 ESPECIES DE CARNIVOROS (LOBO
MEXICANO, COYOTES, LEÓN AFRICANO Y OCELOTES), ANTE SU
UBICACIÓN EN NUEVOS ALBERGUES**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

SANDRA ELIZABETH HERNÁNDEZ MÉNDEZ

TUTOR: MVZ MSc. FERNANDO GUAL SILL

COMITÉ TUTORIAL: DRA. MARTHA ROMANO PARDO

DR. FRANCISCO GALINDO MALDONADO

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi pequeña gran familia, que son Viky, y los Ponchos.

A la abuela Angélica y las muchachas bastoneras que son las tías putativas; que por circunstancias maravillosas son parte de mi familia también.

A los seres que han enriquecido este pedacito de vida que he recorrido.

A todos aquellos que respetan, aman la vida y a los seres que habitan en este mundo.

Y a DIOS...

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Marta Romano, ya que a mí y a muchos otros nos ha dado albergue en su laboratorio y también por que sin su apoyo no se hubiera podido llevar a cabo este trabajo.

Y otra mención especial al Ing. Pablos, que le puso pies y cabeza a esta tesis.

Al Dr. Juan Arturo, la Dra. Julieta, al Dr. Gerardo y a todos guarda animales de los zoológicos de San Juan de Aragón, de Chapultepec y de Los Coyotes, que me brindaron su ayuda, durante los muchos periodos que les di lata.

A Ricardo, que me tuvo que aguantar en otra tesis más.

A Carolina, Víctor, Chucho, Armando, Luz Ma y todos los miembros del laboratorio de Fisiología del CINVESTAV que soportaron de manera estoica, (una vez más) las pestes y mis tiraderos.

A Dulce que me dio la idea y su confianza.

A Pancho por la chispa de la investigación.

A Val, Alba, Beto, Anne, Felipe, Claudia, Carlos, Ivonne, Ana, y a todas las ayudantes, que son miembros del Departamento de Etología y Fauna por tener un tiempo para escuchar mis frustraciones y darme sus comentarios.

A esta maravillosa vida que tengo.....

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Importancia de la conservación ex situ de animales silvestres	7
1.2. Respuesta fisiológica a estrés	8
1.3. ¿Qué es afrontar (coping)?	10
1.3.1. Mecanismos para afrontar eventos estresantes	12
1.3.2. Función de los glucocorticoides en los mecanismos para afrontar	12
1.4. Evaluaciones de la respuesta a estrés	14
1.4.1. Evaluación conductual	15
1.4.2. Evaluación de la actividad adrenocortical	15
1.5. Metabolismo del cortisol	16
1.6. El radioinmunoanálisis (RIA) como herramienta en la evaluación hormonal corticoadrenal	14
1.7. Justificación	21
1.8. Hipótesis	21
1.9. Objetivo	22
1.10. Objetivos específicos	22
2. MATERIAL Y MÉTODOS	23
2.1. Localización y sujetos	23
2.2. Diseño experimental	28
3. RESULTADOS	38
3.1. Análisis de la variable respuesta: Niveles hormonales de cortisol	38
a) Validación del ensayo	38
b) Valores hormonales obtenidos	41
3.2. Análisis de la variable respuesta: Conducta	45
3.3. Análisis de la variable respuesta: Relación entre niveles hormonales y conducta	50
4. DISCUSIÓN	51
4.1. Validación	51
4.2. Variables respuesta en estudio	51
5. CONCLUSIONES	59
6. REFERENCIAS	60
7. ANEXOS	74
7.1. Figuras	74
7.2. Etogramas	86

RESUMEN

Hoy en día la evaluación conductual junto con las determinaciones de niveles de hormonas corticoadrenales, han sido herramientas muy útiles para evaluar la respuesta a estresores como por ejemplo, cambios en el ambiente. La mayoría de los estudios se enfocan a evaluar en un periodo corto, la presencia de cambios significativos de tipo hormonal y conductual como respuesta a un estresor, pero no se da un seguimiento a largo plazo de estas respuestas. Las evaluaciones a largo plazo nos proporcionarían información valiosa, ya que no solo nos indicarían si se presentó un cambio de tipo conductual u hormonal ante el estresor, sino también si esta enfrentando de forma exitosa este cambio y cuanto tiempo le esta llevando habituarse a su nuevo hábitat.

El objetivo del presente estudio fue determinar si existen diferencias y relación de la respuesta conductual y adrenocortical en 6 caninos silvestres (4 *Canis lupus baileyi* y 2 *Canis latrans*) y en cuatro felinos silvestres (2 *Leopardus pardalis* y 2 *Panthera leo*), mantenidos en cautiverio; posterior a su ubicación en nuevos albergues. De los diez animales muestreados se consideraron a las familias (caninos y felinos) y sexos (machos y hembra), como los factores de estudio. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos para regresar a valores iniciales de cortisol y de conductas de vigilancia entre sexos $p \leq 0.05$. Los niveles de cortisol en hembras al finalizar las primeras 4 semanas posteriores al traslado no igualaron a los valores iniciales (semana 0), esto indica que probablemente la respuesta de habituación a un nuevo albergue es mucho más gradual en las hembras de las especies utilizadas al hacer la comparación con machos. Al parecer el tamaño y la complejidad del albergue tuvieron un efecto sobre la conducta estereotipada en locomoción ya que desapareció en los felinos y disminuyó en el caso de caninos. La prueba de correlación por familias dio como resultado una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los niveles de cortisol con conductas en vigilancia ($p \leq 0.05$) y de tipo negativa con las conductas estereotipadas ($p \leq 0.05$). Así que se podría tomar a las conductas de vigilancia como un evaluador indirecto para la respuesta a un cambio de albergue en caninos y felinos silvestres mantenidos en cautiverio. Y en el caso de las estereotipias al parecer son parte de los mecanismos que utilizan los animales para poder hacer frente a un evento estresante que en este caso en particular fue el cambio de albergue. En el caso de conductas en exploración, se observaron diferencias significativas entre familias y sexos ($p \leq 0.05$), siendo que los felinos dedicaron mayor tiempo a conductas de exploración en el albergue nuevo en comparación con los caninos y entre sexos se observó que las hembras dedicaron mayor tiempo a explorar su albergue nuevo en comparación con machos, así mismo se encontró una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los niveles de cortisol y conductas en exploración entre las hembras de los grupos evaluados ($p \leq 0.05$).

Palabras clave: cortisol, carnívoros silvestres, Lobo mexicano, Coyotes, Ocelotes, León africano, extractos fecales, habituación, afrontar, estrés, animales de zoológico, conducta individual.

Summary

The behavioral evaluation together with the determination of corticoid hormones level, have been useful tools to evaluate the stress response, as for example, the changes in the environment.

The objective of the current study was to determine differences between the behavior and hormonal stress response, and its relationships in six wild canids (4 *Lupus baileyi* and 2 *Canis latrans*) and in four felids (2 *Leopardus pardalis* and 2 *Panthera leo*), maintained in captivity; after its relocation in new enclosures. In the ten animals investigated we were considered the families (canids and felids) and sexes (males and females), as the study factors. The results in the present study, detected statistically differences between sexes in the return time of cortisol levels. This indicates that probably the habituation to a new enclosure is much more slowly in the female than in the male. We detected a possible positive effect of the new enclosure in the decrease of abnormal behavior and in the increase of the exploratory behaviors. The correlation tests detect a statistical positive correlation between cortisol and arousal behaviors and in the exploration behavior in the group of females, its means that in response of a new enclosure relocate, the females has more arousal and exploratory behavior than the males, as tools to recollect the necessary information for the central nervous system and this is for its habituation in the new enclosure. Even these correlation test, it detect a statistical negative correlation between cortisol and stereotyped behavior, then these means that the stereotypes are more than a merely abnormal behavior and maybe they help the animals to cope with stress.

key words: cortisol, wild carnivores, Mexican grey wolf, coyote, ocelot, African lion, fecal extract, RIA, cope with stress, stress, zoo animals, individual behavior.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. IMPORTANCIA DE LA CONSERVACIÓN EX SITU DE ANIMALES SILVESTRES

El incremento en el número de especies animales en peligro de extinción ha provocado la planeación de estrategias efectivas de conservación que involucran entre otros puntos la preservación de su hábitat natural, como punto clave de conservación “*ex-situ*”. Pero en algunos casos el impacto de las actividades del humano ha llegado a tal grado, que varias especies han desaparecido de su hábitat natural, provocando que los zoológicos en donde se les mantenía en cautividad, fueran el foco de inicio de programas para la recuperación de estas poblaciones y poder pensar en la reintroducción de las mismas en esos lugares en donde habían desaparecido (Kreger MD, 1995).

Desde tiempos antiguos existen los zoológicos, pero sus funciones han ido evolucionando a lo largo de los siglos. Al principio eran sitios de exhibición de especies exóticas y de recreación para las personas que los visitaban. En la actualidad son centros de investigación y de educación que se han convertido en una herramienta invaluable para la conservación (Hutchins M et al., 2003; Shepherdson DJ, 1998). De hecho, la Asociación Mundial de Parques y Acuarios (WAZA), dentro de la estrategia mundial de conservación 2005, declara que la misión más importante de los zoológicos es la conservación de especies en peligro de extinción, es por eso que los mayores esfuerzos de la investigación van encarados a estudios que apoyen a los programas de conservación ex-situ de las especies en peligro de extinción (Hutchins M et al., 2003). Pero el papel de la

conservación *ex-situ* tiene importantes limitaciones. Por un lado los programas de reproducción no son tan exitosos como se desearía debido a la disminución de la variabilidad genética, lo que puede provocar endogamia (Campbell S, 1980.), como consecuencia del número restringido de animales que pueden albergar y de los pocos organismos fundadores de la población cautiva, ya que éstos individuos son también una muestra reducida y sesgada de la diversidad genética y conductual de la especie (Cuarón AD, 2004). Así que Actualmente los zoológicos se están encontrando con el reto de superar una tasa reproductiva baja y un alto grado de consanguinidad en especies que son importantes dentro de los programas de conservación a nivel mundial (Cuarón AD, 2004).

Para tratar de coadyuvar estos problemas, se han planteado programas de Colaboración multi-institucional, en donde los intercambios de ejemplares y la creación de árboles genealógicos de los mismos, han sido puntos clave para iniciar programas de reproducción asistida, que sean exitosos y que se evite en la medida de lo posible problemas de consanguinidad entre individuos.

Sin embargo el bajo éxito en programas de conservación en cautiverio, no solo puede deberse a problemas genéticos sino a otros factores, como es la capacidad de los animales para hacerle frente al cautiverio *per se* y si poseen o no las herramientas necesaria para poder sobrevivir a largo plazo en esta condición. Debemos tener en cuenta que los animales mantenidos en cautiverio en zoológicos son animales silvestres, es decir, animales no domésticos. Con ello, se ven obligados a intentar enfrentar una situación a la que no están genéticamente preparados (Tennesen T, 1989.). El cautiverio proporciona a los animales silvestres un ambiente que difiere mucho del medio en el que se han desarrollado (Carlstead K, 1996b), por esa razón muchos de ellos se ven incapacitados a adaptarse a las condiciones de confinamiento (Dawkins M, 1990). La manipulación de algunos factores biológicos como la complejidad del medio que lo rodea, factores sociales, fotoperiodo, micro clima, entre otros, han sido muy importante para la identificación de algunos recursos necesarios para la supervivencia y reproducción de las especies (Kleiman DG, 1980.). Pero es importante determinar si los animales están respondiendo de forma adecuada a estas manipulaciones y

que a largo plazo se reflejara no solo en un aumento en su tasa reproductiva sino en su habilidad de sobrevivir al cautiverio. Por ello es necesario realizar estudios enfocados a valorar las situaciones que tienen que enfrentar en cautiverio las diferentes especies y cuales son los factores que pueden influenciar la habituación al cautiverio.

Hoy en día la evaluación conductual junto con las determinaciones de niveles de hormonas corticoadrenales, han sido herramientas muy útiles para evaluar la respuesta a estresores como por ejemplo, cambios en el ambiente al que normalmente están acostumbrados los animales mantenidos en cautiverio. La mayoría de los estudios se enfocan a evaluar en un periodo corto, la presencia de cambios significativos de tipo hormonal y conductual como respuesta a un estresor, pero no se da un seguimiento a largo plazo de estas respuestas. Las evaluaciones a largo plazo nos proporcionarían información valiosa, ya que no solo nos indicarían si se presentó un cambio de tipo conductual u hormonal ante el estresor, sino también si está enfrentando de forma exitosa este cambio y cuanto tiempo le está llevando habituarse a su nuevo hábitat.

1.2. RESPUESTA FISIOLÓGICA A ESTRÉS

El término estrés es usualmente utilizado para explicar el evento (estresor) o la respuesta (respuesta a estrés). Además es utilizado para describir el estado crónico de desbalance como respuesta al estrés (McEwen BS, 1999). En este caso se utiliza el término estrés para explicar la respuesta fisiológica y conductual ante un estresor definido como desafío o desafíos a los que los individuos están expuestos, que ya sea que perturben la homeostasis y requieran una respuesta adaptativa o que sean interpretados como una amenaza y resulten en una respuesta hormonal o conductual en donde la homeostasis fisiológica no está comprometida (Broom DM and Johnson KG, 1993; McEwen BS, 2002), pero que a largo plazo reduce la habilidad inclusiva, definida como la capacidad de los individuos de transmitir sus genes a futuras generaciones (Dawkins, citado en Broom DM and Johnson KG, 1993).

El sistema fisiológico de respuesta a estrés más comúnmente estudiado es el eje Hipotalamo-Hipofisaria-Adrenal (HHA) y el Sistema Nervioso Autónomo (SNA), particularmente la respuesta del simpático a nivel medular y de los nervios periféricos. Estos sistemas responden a lo largo de la vida de acuerdo a los eventos estresantes así como en los ciclos diurnos de descanso y de actividad. Pero estos sistemas hacen más que responder a “estresores” en sí; ya que participan en lo que comúnmente es conocido como el “Síndrome General de Adaptación” (Broom DM and Johnson KG, 1993; McEwen BS, 2002; McEwen BS et al., 1995). Conductualmente, estas respuestas a estrés consisten en reacciones de pelea o huida. Biológicamente, estos dos mecanismos tienen diferentes ejes. Por un lado, el pelear se relaciona a una respuesta simpatoadrenal rápida y por otro, la defensa se relaciona a una respuesta adrenocortical lenta (Broom DM and Johnson KG, 1993; Ursin H and Olff M, 1993). Estas respuestas no deben de estar presentes en una forma constante y sus niveles deben de permanecer siempre en un rango preciso ya que son esenciales en los procesos enfocados para la adaptación y homeostasis en el organismo, pero también participan en procesos patofisiológicos, cuando son producidos insuficientemente o en exceso, o sea fuera de sus rangos normales (McEwen BS, 2002).

Asimismo, otro tipo de respuesta a un evento estresante es el incremento en los estados de vigilancia (conductas de Alerta), acompañado por un incremento en la ansiedad y miedo (Ursin H and Olff M, 1993).

Los tipos de percepción de estrés que participan en estas respuestas son a la larga, resultado de la interpretación de un individuo de lo que es amenaza para él. La reacción del organismo a esta reacción de amenaza es la que causa el problema, particularmente si se convierte en crónico. Contrario a lo que Hans Selye enfatiza acerca de los estresores físicos, los factores mentales y de experiencias, son quizás los estresores más poderosos (Broom DM and Johnson KG, 1993; McEwen BS, 2002). Por ejemplo, la novedad y la anticipación de un castigo, aún más que el castigo en si, son quizás factores más potentes en la

activación del eje HHA y del SNA (Haile CN et al., 2001; McEwen BS, 2002; Sapolsky RM et al., 2000).

Asimismo la percepción del individuo a los eventos estresantes y por lo tanto las respuestas orgánicas al estrés están influenciados por experiencias tempranas de la vida. Por ejemplo se ha visto en modelos animales, que el estrés impredecible prenatal causa incremento en la emotividad y en la actividad tanto del eje HHA como del SNA (Weinstock M, 1997; Weinstock M et al., 1998). Por otro lado, manipulaciones postnatales en ratas y estrés ligero al exponerlas a una separación diaria de su madre, tiene un efecto contrario a los efectos del estrés prenatal, resultando en una emotividad reducida y una reactividad reducida tanto del eje HHA, como del SNA (McEwen BS, 2002).

Como previamente se dijo la falta de información (incertidumbre), y la ausencia o pérdida de control producen alarma. Luego entonces la presencia de información y de control o de mecanismos cognitivos de defensa, reducen la presentación o la magnitud los estados de alarma (McEwen BS, 2002; Pijlman FT et al., 2003).

1.3. ¿QUÉ ES AFRONTAR (COPING)?

Varios autores han definido el término afrontar en base a respuestas fisiológicas:

Wiepkema (1992) considera que afrontar, es la respuesta de un individuo para reducir la respuesta a un estresor, que normalmente tiene efectos dañinos (Wechsler B, 1995).

Dantzer (1991) afirma que si un estresor, provoca una reacción fisiológica A, que se encuentra relacionada a una respuesta conductual específica, la cual a su vez provoca una respuesta fisiológica denominada B. Si la diferencia de reacción de B, es menor a A; entonces el individuo está haciendo frente al estresor (Dantzer R, 1991).

De acuerdo a estas definiciones, el afrontar puede presentarse tanto en situaciones aversivas que pueden ser eliminadas por medio de muchas respuestas para hacerle frente; como a situaciones en donde los efectos fisiológicos adversos, pueden ser atenuados por medio de varias respuestas; aún y cuando el estresor no pueda ser eliminado.

Fraser y Broom (1990), van más allá de una descripción de efectos fisiológico y definen el afrontar, como los mecanismos necesarios para tener estabilidad física y mental (Broom D M, 2004; Fraser AF and Broom D M, 1990; Galindo MF, 2004). El fracaso prolongado para enfrentar algún cambio en el ambiente, resulta en fallas en el crecimiento, reproducción o incluso en la muerte. Así un individuo puede tener los mismos problemas; pero tiene la posibilidad de acceder a un conjunto de mecanismos para afrontarlos. Por lo tanto es posible que pueda lidiar con ellos y pueda sobrevivir (Broom D M, 2004; Fraser AF and Broom D M, 1990; Galindo MF, 2004). La capacidad de afrontar varía entre especies e individuos y la capacidad de una especie para responder con conductas de su repertorio natural a las condiciones de cautiverio depende de una compleja interacción de factores del desarrollo, experiencia y herencia, entre otros (Carlstead K, 1996a; Clark JD et al., 1997).

Wechsler (1995) define afrontar como las respuestas comportamentales que tienen como objetivo el disminuir el efecto adverso de un estresor (Wechsler B, 1995).

En forma general tomando las diferentes opiniones, se puede resumir el término afrontar, a la o las estrategias cognoscitivas y fisiológicas, que le permiten a un individuo hacer frente a un evento (estresor), que pone en peligro su supervivencia a largo plazo y que puede ser medido, por medio de la o las respuestas fisiológicas o conductuales que despliega ante el estresor.

1.3.1. MECANISMOS PARA AFRONTAR EVENTOS ESTRESANTES

Cuando un animal enfrenta un estímulo nuevo (estresor), implica la necesidad de activar las respuestas fisiológicas enfocadas a llevar a cabo los ajustes necesarios para poder enfrentarse a esta nueva situación. Estos incluyen cambios fisiológicos en el cerebro (McEwen BS, 2002; Zanella AJ et al., 1991), en glándulas adrenales (Broom DM, 1988), en el sistema inmune (Kelley KW, 1985; Tizard I, 1992) y cambios en el comportamiento (Broom DM, 1988). La magnitud y el tipo de respuesta activada por un nuevo estímulo, varía entre especies, individuos así como por experiencias previas. Asimismo, la capacidad con la que pueden tener control sobre esta nueva situación, se encuentra relacionada con la manera en que enfrentan su medioambiente. (Broom DM, 1988; Carlstead K, 1996a; Clark JD et al., 1997; Kelley KW, 1985; Zanella AJ et al., 1991).

El éxito de los individuos para hacer frente a estas situaciones se refleja en su capacidad para sobrevivir y reproducirse en cautiverio y este éxito afecta a largo plazo la capacidad de la especie para existir como una población en cautiverio (Carlstead K, 1996a; Clark JD et al., 1997).

1.3.2. Función de los glucocorticoides en los mecanismos para afrontar

El síndrome general de adaptación de Selye (1953), ha sido el modelo de la respuesta a estrés. Dentro de éste, los glucocorticoides están involucrados en las etapas de resistencia y de agotamiento (Chrousos GP et al., 1995). Siendo en la etapa de agotamiento, en donde se presentan la mayoría de los problemas de tipo fisiológico, que comprometen la supervivencia del individuo (Chrousos GP et al., 1995; McEwen BS et al., 1995). Actualmente se sabe que el problema es multifactorial y por un lado, uno de los causales principales es la mala regulación de glucocorticoides en receptores de CRH a nivel SNC, que da como resultado una mala regulación del eje HHA (Chrousos GP et al., 1995) y por otro lado, de

neurotransmisores como son la serotonina (5H) y dopamina (DA) que son liberados para la expresión de conductas y que tienen también una acción en la liberación de CRH (Chrousos GP et al., 1995; McEwen BS and Wingfield JC, 2003; Sapolsky RM et al., 2000).

Las hormonas esteroides, no solo están relacionadas a la regulación de la respuesta a estrés, sino también a los mecanismos necesarios, para que un organismo tenga una respuesta adaptativa adecuada y pueda enfrentar en forma exitosa eventos estresantes. Por ejemplo, en un inicio el encuentro con un peligro requerirá una acción rápida de evasión, en donde la actividad neural y la movilización de hormonas como la epinefrina al torrente sanguíneo, juegan un rol importante. Posteriormente sobrevendrá la secreción de esteroides adrenales de forma paulatina, apareciendo un pico minutos después del evento estresante. Si la acción evasiva es exitosa, el animal sobrevivirá y se restablecerá la homeostasis. Muy probablemente aprenderá de la experiencia y aumentarán sus opciones en otro encuentro. Los esteroides adrenales facilitan la adaptación a largo plazo; esto significa que a nivel de SNC facilitan la extinción de una respuesta de evasión condicionada (McEwen BS, 1999; McEwen BS et al., 1986). O sea un animal ha aprendido a evitar cierto lugar donde previamente fue agredido, en el cual tiene la oportunidad de obtener alimento y agua; pero tiempo después descubre que ya no hay peligro. Entonces el animal tendrá la necesidad de extinguir la respuesta de evasión, a fin de poder tomar ventaja de la oportunidad y poder acceder a recursos. Se ha visto que los esteroides facilitan dicha extinción y ayudan a dicha adaptación (McEwen BS et al., 1986). Asimismo los esteroides adrenales juegan un rol, tanto en la atención selectiva y la consolidación de la información obtenida de los episodios de la vida diaria (Lupien SJ and McEwen BS, 1997). Otro aspecto dentro de la adaptación del organismo, en donde están involucrados los esteroides adrenales, es en los cambios neuroquímicos en los potenciales de acción, necesarios en el aprendizaje (McEwen BS et al., 1995).

Tanto en ratas como en primates, la secreción de glucocorticoides precede a la actividad diaria y al parecer, ayuda a optimizar la efectividad en la

actividad del hipocampo para potenciales de larga duración (LTP) que están relacionados al aprendizaje. Es en este aspecto en donde los glucocorticoides contribuyen a aumentar la atención y a mejorar la retención de memorias episódicas (Lupien SJ and McEwen BS, 1997).

Por otro lado una respuesta inadecuada a estrés, o sea que el animal no pudo lidiar con un problema de forma adecuada, causa que el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal sea activado de forma crónica y por lo tanto el organismo está expuesto de forma constante a esteroides adrenales, que a largo plazo tienen un efecto detrimental en el organismo (Broom DM and Johnson KG, 1993).

Se ha demostrado que los glucocorticoides tienen un efecto neurodegenerativo a nivel de SNC, principalmente en regiones del hipocampo, las cuales están relacionadas al aprendizaje (Sapolsky RM, 2000; Sapolsky RM et al., 2000). Así que si por un lado los glucocorticoides están vinculados en el aprendizaje, un exceso de ellos causa un detrimento en el mismo y por lo tanto en la capacidad de los individuos de poder aprender y adaptarse a situaciones nuevas y luego entonces de sobrevivir.

1.4. EVALUACIONES DE LA RESPUESTA A ESTRÉS

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el investigador, al tratar de determinar si un animal está teniendo una respuesta adecuada a eventos estresantes, es que los medios de monitoreo deben de ser lo menos invasivo posible, para evitar un aumento de estrés y ansiedad que pueden influenciar los resultados.

Debido a ello se han propuesto muchos parámetros diferentes. Entre estos parámetros se contemplan, el análisis de la conducta, tasa de mortalidad, el éxito reproductivo, incidencia de enfermedades, así como la relación que existe entre el comportamiento y la función adrenocortical, como respuesta a la presencia crónica de diversos estímulos (estrés crónico) y la influencia de esta última, en la actividad del sistema inmune (Broom DM, 1988; Kelley KW, 1985; Tizard I, 1992).

1.4.1. Evaluación conductual

La mejor forma de detectar un problema es viéndolo. Por lo tanto un indicador obvio de que un individuo no está teniendo éxito en enfrentar un problema, son los comportamientos que presenta (Broom DM and Johnson KG, 1993).

Las evaluaciones del comportamiento se basan, en determinar las proporciones y frecuencias de presentación de las diversas conductas que pueden presentar durante un periodo de tiempo establecido.

En respuestas inadecuadas a eventos estresantes, como por ejemplo las que se presentan en animales con niveles de bienestar bajo, las evaluaciones en conducta se dirigen principalmente a detectar la presencia de conductas anormales o fuera de contexto, como pueden ser estereotipias, conductas redirigidas, inactividad o agresividad (Broom DM, 1988; Broom DM and Johnson KG, 1993). Pero también son importantes otras conductas de mantenimiento y sociales, las cuales pueden también estar afectadas (Broom DM, 1988).

La posibilidad de medir el comportamiento, nos permite entender la manera en que se relaciona con otras disciplinas, como la fisiología, endocrinología, inmunología, epidemiología y producción animal (Galindo MF, 2004). Lo cual nos permite utilizarlo como un estimador fiable, para la evaluación de forma indirecta y no invasiva de las mismas.

1.4.2. Evaluación de la actividad adrenocortical

La evaluación de la actividad adrenocortical, se realiza mediante la determinación de niveles de glucocorticoides (cortisol, corticosterona), que en caso de estrés agudo o crónico generalmente aumentan. Se ha demostrado en estudios en varias especies animales (mamíferos y aves), que el aumento de glucocorticoides está relacionado con estrés fisiológico o mental. Estas determinaciones, se han utilizado en casos de translocación a medio ambientes nuevos (Baker ML et al., 1998; Baker ML and Gemmell RT, 1999; Goyman W et

al., 1999; Palme R et al., 2000; Terio KA et al., 1999), recuperación de anestesia (Whitten P L et al., 1998), degradación medioambiental (Wasser S K et al., 1997) e interacciones agresivas (Goyman W et al., 1999). Esta determinación puede ser llevada a cabo a partir de muestras de sangre, orina, saliva o heces.

Hoy en día la medición de glucocorticoides en heces, ha sido muy utilizada para la evaluación del grado de bienestar en diferentes especies (Brousset D, 2003; Goyman W et al., 1999; Morais NR et al., 1997; Pifarré M, 2004; Rendon FE, 2003; Terio KA et al., 1999; Wasser S K et al., 1997; Whitten P L et al., 1998) ya que es relativamente fácil la recolección de muestras fecales sin necesidad de someter al animal a contención

1.5. METABOLISMO DEL CORTISOL

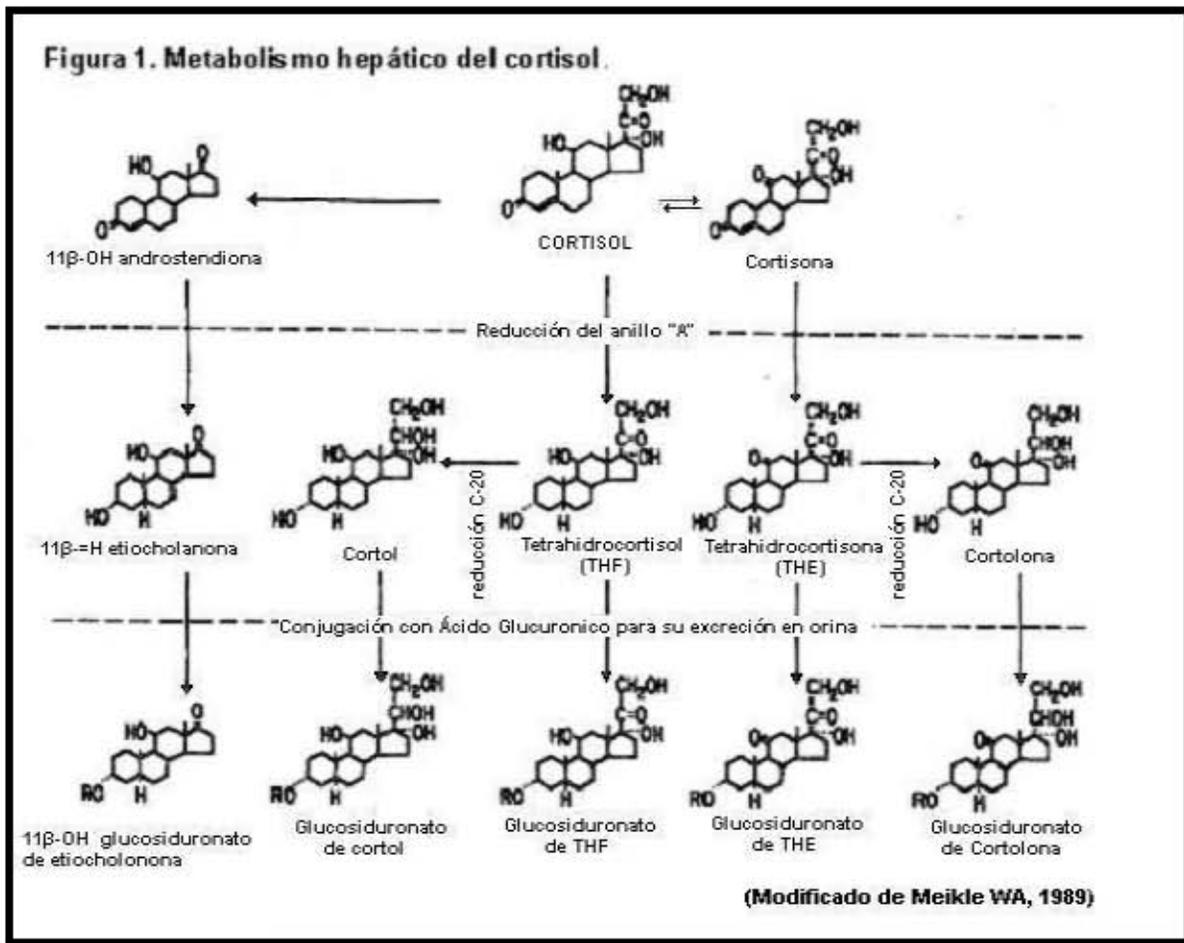
En la mayoría de los mamíferos, el principal glucocorticoide secretado como respuesta a un evento estresante es el cortisol, aunque en algunas especies de roedores como la rata, se sabe que es la corticosterona (Stratakin CA and Chrousos GP, 1995).

Los corticosteroides se encuentran en la sangre de manera libre o unida a proteínas como la transcortina. Una vez que han realizado su función son transportados al hígado para ser metabolizados, aunque también esto también puede ocurrir en el riñón, tejido conectivo, fibroblastos y músculo (Brownie AC, 1992; Meikle WA, 1989). Los glucocorticoides son rápidamente eliminados de la circulación y la vida media es de 80 a 120 minutos (Meikle WA, 1989; Vylitová M et al., 1998).

El hígado es el principal responsable de la regulación, de la tasa a la cual el cortisol es removido de la circulación sanguínea. Las células hepáticas ligan al cortisol por medio de proteínas de alta afinidad y lo metabolizan de forma irreversible (Meikle WA, 1989). La reducción de anillo A es el paso más importante en la inactivación el cortisol (Figura 1). Esta reducción se acompaña de dos pasos secuenciales por dos enzimas hepáticas; una α -reductasa, que reduce el doble

enlace entre C-4 y C-5 y una 3 β -ol deshidrogenaza, que convierte la cetona a hydroxilo.

De un 5 a un 10% del cortisol producido, es metabolizado a 17-ketoesteroides 11-oxigenados, por medio de la vía ilustrada en la figura1 (Meikle WA, 1989). Otros esteroides secretados por la corteza supra adrenal son metabolizados a 17-ketoesteroides, por ello en humanos se ha utilizado este metabolito como punto determinante de niveles de cortisol en orina. Cerca de dos tercios de 17-ketoesteroides se excretan en orina en el hombre y más de tres cuartos en la mujer. Esta diferencia entre sexos se debe a que se elevan como resultado del metabolismo de la androstendiona. Así en el hombre más de un tercio de los 17-ketoesteroides, derivan del metabolismo de la testosterona de origen gonadal (Meikle WA, 1989).



El metabolismo hepático del cortisol no ha sido descrito en todas las especies; pero en conejo (Senciall IR et al., 1992), rata, ratón (28)(Han A et al., 1983) y gato doméstico (Graham LH and Brown JL, 1996) se menciona que ocurre por medio de la oxidación en el C-11 y la 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 (Brownie AC, 1992).

Una vez que los ácidos biliares llegan al intestino, los esteroides sufren una reabsorción, pero durante su circulación en el intestino están expuestos a procesos metabólicos, por parte de los microorganismos presentes en la flora normal intestinal, principalmente en el íleo y colon (Hill-J Makin, 1984; Meikle WA, 1989; Wasser SK, 2000). Se ha visto que la flora intestinal en ratas y humanos pueden metabolizar cortisol a compuestos C-21 y C-19 (Cerone-McLernon AM, 1981). En el caso de metabolitos C-21 se ha encontrado 21-deoxicortisol, tetrahydro-21-deoxicortisol y tetrahydrocortisol. Y en los C-19 se encuentran agrupados 5β -androstano- 3α , tetrahydro-21-deoxycortisol y 5ϵ -androstano- $3\alpha,11\beta$ -diol-17-ona (Bokkenheuser VD, 1984; Cerone-McLernon AM, 1981).

Esto da como resultado que los factores determinantes en el tipo de metabolito que se puede obtener a partir de heces, dependen del tiempo de tránsito intestinal y el tipo de flora intestinal, así como de cualquier factor que pueda llegar a modificarlos (Brown JL et al., 1994; Wasser SK, 2000).

El tiempo entre la circulación y la excreción en orina es corta (menos de 5hrs), pero en heces es más larga, aproximadamente el tiempo necesario entre el paso de la bilis al recto que es de 24-48hrs en animales con fermentación cecal y en carnívoros de 12-24hrs (Brown JL et al., 1993; Schwasberg F et al., 1996; Shielle VM et al., 1990; Wasser SK, 2000).

En forma general, se puede mencionar que los metabolitos finales que aparecen en la orina son conjugados y los de heces son no conjugados (Meikle WA, 1989; Shielle VM et al., 1990; Vylitová M et al., 1998; Wasser SK, 2000).

1.6. EL RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA) COMO HERRAMIENTA EN LA EVALUACIÓN HORMONAL CORTICOADRENAL

En la década de los 80's se inician las investigaciones de determinación hormonal por medio de radioinmunoanálisis, en varias especies de animales domésticos y silvestres. Este método se basa en la especificidad que tienen los anticuerpos de unirse a los antígenos, que en este caso son las hormonas. Así, al añadir una cantidad conocida de hormona esteroide marcada radioactivamente, más un anticuerpo contra ella, a los extractos que contienen hormonas desconocidas, se produce una competencia entre la hormona marcada y la desconocida por el anticuerpo. Entonces es posible medir la cantidad de hormona marcada unida al anticuerpo, que será inversamente proporcional a la cantidad de hormona no marcada de la muestra y es así como se puede calcular la concentración de hormona en la muestra desconocida (Zambrano AZ and Díaz SV, 1996).

Antes de establecer un protocolo para la determinación de metabolitos de algunos esteroides en heces ú orina por medio de radioinmunoanálisis, es importante determinar la vía principal de excreción y el tipo de metabolito excretado para decidir el tipo de muestra y de anticuerpo a usar (Meikle WA, 1989; Wasser SK, 2000). Para esto es necesaria la administración del esteroide marcado radioactivamente que permite obtener información de la ruta y el tiempo de excreción. Y luego por medio de cromatografía de alta sensibilidad (HPLC) se podrá entonces detectar el tipo de metabolito final en heces y orina (Wasser SK, 2000).

Por ejemplo, entre los primates el cortisol está presente en las heces de marmosetas, pero no ha sido detectado en papiones, macacos y chimpancés (Wasser SK, 2000). Los chimpancés y los humanos metabolizan el cortisol principalmente a esteroides tetra-hidroxilados y su excreción principalmente es por medio de orina (Bahr NI, 2000; Meikle WA, 1989).

En felinos solo se han hecho pruebas de radioinmunoinfusión en gatos y se encontró, que menos del 5% de los glucocorticoides se eliminan por orina y que la

mayoría de los metabolitos, son excretados por heces (Graham LH and Brown JL, 1996; Morais NR et al., 1997). El análisis de los glucocorticoides en orina demostró, que el cortisol encontrado en su forma original es muy pequeña y la mayoría son metabolitos. Resultados similares se hallaron en heces, ya que no se encontraron ni cortisol ni corticosterona en su forma original. (Graham LH and Brown JL, 1996; Morais NR et al., 1997). El análisis por HPLC detectó que los metabolitos en heces son formas no hidrolizadas y solubles al agua (Graham LH and Brown JL, 1996). Asimismo se observó que los metabolitos en gatos son mayormente inmunoreactivos a 11,17-dioxoandrostano (11,17-DOA)(Schatz S, 2001).

En caninos, pruebas por medio de HPLC en hienas (*Crocuta crocuta*), demostraron que los metabolitos obtenidos a partir de heces muestran movilidad cromatográfica hacia esteroides no conjugados, pero que no son ni cortisol ni corticosterona puros (Goyman W et al., 1999). En el caso de perros domésticos HPLC muestra que son metabolitos no conjugados hidrosolubles, con movilidad cromatográfica hacia cortisol (Schatz S, 2001).

Como se observa existen diferencias específicas entre especies en el metabolismo de los glucocorticoides y por otro lado como anteriormente se hizo notar la acción de la microflora intestinal ocasiona que las heces contengan múltiples metabolitos, con muy poco cortisol puro.

Como resultado de esto, las pruebas que utilizan anticuerpos de cortisol muy específicos pueden dar resultados de niveles relativamente bajos (Wasser SK, 2000). Por ello se recomienda el uso de anticuerpos poco específicos, si se van a evaluar especies, en las que no se han identificado los metabolitos finales de cortisol obtenidos en heces.

1.7. JUSTIFICACIÓN

La importancia de este estudio reside, en que existen pocos estudios de tipo longitudinal de la evaluación del cambio de animales mantenidos en cautiverio a nuevos albergues, para determinar como se distribuyen los niveles de metabolitos de cortisol, así como en los cambios conductuales de estos.

Asimismo servirá como base para determinar si existen diferencias de habituación ante un mismo tipo de estímulo (estresor), que en este caso es el cambio de albergue, entre sexos y familias, para poder plantear protocolos de manejo en los cuales se tomen en cuenta las características particulares entre ellos y el tiempo de habituación a un nuevo albergue.

1.8. HIPÓTESIS

Ante el cambio a un nuevo albergue en un grupo de caninos (*Canis lupus baileyi* y *Canis latrans*) y felinos (*Leopardus pardalis* y *Panthera leo*) silvestres mantenidos en cautiverio, un mes es un periodo suficiente para que los niveles de cortisol y la proporción de tiempo en estados conductuales de mantenimiento regresen a niveles iniciales, existiendo diferencias de la respuesta conductual y hormonal entre familias y sexos.

1.9. OBJETIVO

Evaluar la respuesta conductual y adrenocortical en 6 caninos silvestres (4 *Canis lupus baileyi* y 2 *Canis latrans*) y en cuatro felinos silvestres (2 *Leopardus pardalis* y 2 *Panthera leo*), mantenidos en cautiverio posterior a su ubicación en nuevos albergues.

1.10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- b. Determinar si un mes es un periodo de tiempo suficiente, para que los niveles hormonales y las proporciones de tiempo dedicados a conductas individuales, regresen a valores iniciales, entre familias de caninos (*Canis lupus baileyi* y *Canis latrans*) y de felinos (*Leopardus pardalis* y *Panthera leo*), así como entre sexos, en carnívoros silvestres mantenidos en cautiverio después de haber sido trasladados a albergues nuevos.
- c. Evaluar las diferencias en los niveles hormonales y conductuales entre familias de caninos (*Canis lupus baileyi* y *Canis latrans*) y de felinos (*Leopardus pardalis* y *Panthera leo*) silvestres mantenidos en cautiverio, así como entre sexos, como respuesta al cambio a un albergue nuevo.
- d. Evaluar la relación entre conductas y niveles hormonales, entre caninos (*Canis lupus baileyi* y *Canis latrans*) y felinos (*Leopardus pardalis* y *Panthera leo*) silvestres mantenidos en cautiverio y entre sexos, como respuesta al cambio a un albergue nuevo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Localización y sujetos

En este trabajo se evaluaron un total de 10 individuos, siendo 6 caninos y 4 felinos silvestres. Los ejemplares pertenecen a 3 zoológicos diferentes localizados dentro de la República Mexicana; y hoy en día se encuentran confinados en zoológicos del Distrito Federal, México.

El primer zoológico (Chapultepec) se encuentra en la delegación Miguel Hidalgo D. F., con ubicación geográfica de 19°25' de latitud norte y a 99°12' de longitud oeste, a una altitud de 2250 metros sobre el nivel del mar (msnm). El clima presente en esta zona es templado subhúmedo con lluvias en verano de humedad media (CW1), la temperatura media anual es de 15°C y la precipitación pluvial anual en promedio es de 801 mm (INEGI, 1998)

El segundo zoológico (San Juan de Aragón) se encuentra en la Delegación Gustavo A. Madero, México, D.F., con una ubicación geográfica de 19°28' de latitud norte y a 99°04' de longitud oeste. El clima de esta zona es semiseco templado con lluvias en verano (BS1K), la temperatura media anual es de 16.8°C y la precipitación pluvial anual promedio es de 580.9mm (INEGI, 1988)

El tercer zoológico (Africam Safari) se encuentra en Valsequillo Puebla, con una ubicación geográfica de 18° 58' latitud norte y a 97° 54' de latitud oeste. El clima de la zona es semicálido subhúmedo con lluvias en verano (ACw), la temperatura media anual es de 15.2° C y la precipitación pluvial anual promedio es de 900.8mm (INEGI, 2003).

2.1.1. Grupo de caninos

El grupo de caninos (cuadro 1) se encuentra conformado por 4 ejemplares de lobo mexicano siendo 2 hembras (Can H1, Can H2) y 2 machos (Can M1, Can M2). Y por 2 ejemplares de coyote, siendo 1 hembra (Can H3) y 1 macho (Can M3).

La hembra Can H1 es del linaje McBride (SB 605), con una edad de 4 años, perteneció al zoológico de Africam Safari. Por haber tenido problemas de pelea con la otra hembra con la que compartía el albergue se separó del grupo y permaneció por un periodo de 4 meses confinada en el albergue nocturno donde tenía contacto visual con los otros miembros de su grupo. El albergue nocturno posee un área de 30m².

En el mes de enero del 2004 fue trasladada al zoológico de San Juan de Aragón y fue reubicada sola, en un albergue que se encuentra fuera de exhibición, el cual tiene un área de 700m²

Los lobos (Can M2, Can H2) coyotes (Can M3, Can H3), pertenecieron al zoológico de Chapultepec.

Los ejemplares Can M2 y Can H2 son pareja desde noviembre de 1999. Can M2 es originario de Río Grande USA (SB 485) tiene una edad de 9 años , Can H2, es originaria del parque nacional de la Nación Navajo USA (SB 445) tiene una edad de 10 años. La pareja se encontraba en exhibición en el zoológico de Chapultepec en un albergue con un área de 776m² cuenta con cubierta vegetal que les permite evadir la vista del público si lo desean. En el mes de diciembre del 2002 fueron trasladados a un albergue nuevo en el zoológico de San Juan de Aragón D.F. El cuál presenta un área de 900m², totalmente naturalista con abundante cubierta vegetal y sitios para que se escondan del público.

Los ejemplares Can M3 y Can H3, son pareja desde el año 2000, los dos ingresaron al zoológico como una donación. Can M3 ingreso el día 4 de julio de 1989 y en el periodo de muestreo tenía una edad aproximada de 15 años. Can H3 ingresó el día 23 de octubre de 1991 y en el año de muestreo tenía una edad aproximada de 13 años. La pareja se encontraba en un albergue fuera de la vista del público en el zoológico de Chapultepec, y cuenta con un área de 150m². En diciembre del 2002 fueron trasladados a un albergue nuevo en el zoológico de San Juan de Aragón D.F. con 642m², ambientado como zona árida y cuenta con acceso a zonas para ocultarse del público.

El macho Can M1 perteneció al zoológico de San Juan de Aragón, en el cual habitó en un albergue de 700m² fuera de la vista del público. Perteneció al linaje Aragón (SB 289) con fecha de nacimiento el 31 de marzo de 1994. En enero del 2004 fue trasladado al zoológico de Chapultepec a un nuevo albergue, junto con una nueva hembra para formar pareja reproductiva. El albergue tiene una extensión de 604m².

La alimentación se les proporciona por las tardes diariamente y es principalmente a base de pollo crudo troceado con hueso, adicionado con sales minerales y complementos vitamínicos (1.5kg/ animal), el agua se les da de forma *ad libitum*. Los animales permanecen juntos todo el día y la noche. El programa de medicina preventiva consiste en aplicar anualmente la vacuna antirrábica así como desparasitaciones semestrales dependiendo del resultado del examen coproparasitoscópico.

2.1.2. Grupo de felinos

El grupo de felinos (cuadro 1) se encuentra conformado por 2 ejemplares de león africano (*Panthera leo*) siendo 1 hembra (Fel H1) y 1 macho (Fel M1). Y por 2 ejemplares de Ocelote (*Leopardus pardalis*), siendo 1 hembra (Fel H2) y 1 macho (Fel M2).

La pareja de leones pertenecen al zoológico de Aragón. Tanto el macho Fel M1 como a hembra Fel H1, son adultos de aproximadamente 10 años. Ambos son nacidos en cautiverio y se encontraban confinados en un albergue con un área total de 1,335m², que cuenta en el área de exhibición con piso de concreto, un arenero y una tarima y de troncos y los albergues nocturnos son de concreto con tarimas de madera. En el mes de junio del 2003 fueron, trasladados a un albergue nuevo dentro del mismo zoológico con un área de exhibición de 2566m², totalmente naturalista. Su alimentación es a base de carne roja, 5Kg/animal, la cual se les suministra por las mañanas y agua *ad limitum*. Los animales permanecen durante los horarios de visita del público en el área de exhibición y por la noche se meten al albergue nocturno. El programa de medicina preventiva consiste, en aplicar anualmente la vacuna antirrábica y triple felina (CRP), así como desparasitaciones semestrales dependiendo del resultado del examen coproparasitoscopico.

La pareja de ocelotes pertenecen al zoológico de San Juan de Aragón, se encuentran juntos desde marzo del 2002. El macho Fel M2 tiene una edad aproximada de 11 años, ingresó como donación de un particular al zoológico el 25 de enero de 1995. La hembra Fel H2, ingreso como donación de un particular al zoológico el día 12 de agosto de 1991 y tiene una edad aproximada de 13 años. Se encontraban confinados en un albergue con área de 21m², con una zona con pasto y una tarima con troncos. En diciembre del 2002, fueron trasladados a un albergue nuevo con un área de 876m². La alimentación es a base de pollo crudo troceado con hueso y carne roja (600g/ animal), empanizados con alimento seco comercial molido para gatos adultos (50gr), el agua se les da de forma *ad libitum*. Los animales permanecen juntos todo el día y la noche y tienen libre acceso al exhibidor y al albergue nocturno. El programa de medicina preventiva consiste en aplicar anualmente la vacuna triple felina (PCR) y antirrábica, así como desparasitaciones semestrales, dependiendo del resultado del examen coproparasitoscopico.

En el cuadro 1 se encuentra la identificación de cada uno de los animales, el zoológico de procedencia y el zoológico de residencia final, así como la superficie en m² del albergue.

Cuadro 1. Procedencia y Residencia final de los animales en observación.

<i>Especie</i>	<i>Identificación</i>
Lobo mexica no	Hembra 605 (Can H1)
Lobo mexica no	Seewa (Can I)
Coyote	Yota (Can H3)
Lobo mexica no	Esdrah (Can M1)
Lobo mexica no	Ezequiel (Can M2)
Coyote	Mechas (Can M3)
Ocelote	Joselote (Fel M2)
Ocelote	Reyna (Fel H2)
León african o	Emiliano (Fel M1)
León african o	Elsa (Fel H1)

2.2. Diseño experimental

Para evaluar la respuesta de caninos y felinos silvestres ante su ubicación en nuevos albergues; se realizaron 6 semanas de muestro de conducta y heces en cuatro lobos mexicanos (unidad observacional: Can M1, Can M2, Can H1, Can H2), una pareja de coyotes (Unidad observacional: Can M3 y Can H3), una pareja de ocelotes (unidad observacional Fel M2 y Fel H1) y una pareja de leones africanos (unidad observacional Fel M1 y Fel H1) (cuadro 1). Las semanas de muestreo se distribuyeron de la siguiente manera: se muestrearon a los animales una semana antes de su traslado al nuevo albergue (semana 0) y una vez que llegaron a su albergue nuevo se realizaron muestreos por 4 semanas (semanas 1 a la 4); finalmente al finalizar la cuarta semana posterior a traslado, se dejó de muestrear por 2 semanas y nuevamente se volvió a muestrear una semana más (semana 13).

De los diez animales muestreados se consideraron a las familias (caninos y felinos) y sexos (machos y hembra), como los factores de estudio. Con las combinaciones de estos factores se obtuvieron 4 grupos; en los que se evaluaron las siguientes variables respuesta:

2.2.1. Análisis de la variable respuesta: Niveles hormonales de cortisol

La colección de heces se realizó diariamente durante los periodos de observación de conductas, siendo identificadas de acuerdo al individuo al que pertenecen, con la fecha y condiciones de recolección de las mismas y fueron mantenidas en congelación (-4°C), hasta su procesamiento.

A los animales que se encontraban confinados con una pareja, se les administró a uno de ellos colorante artificial para alimentos en la ración diaria de alimento, para poder identificar las heces de cada uno.

La evaluación de las muestras se realizó en el laboratorio del Departamento de Fisiología del CINVESTAV, IPN donde las muestras fueron trasladadas, para ser homogenizadas de forma manual y depositadas en cajas de Petri de plástico previamente rotuladas, con los datos de cada muestra y nuevamente se mantuvieron en congelación hasta el día en que se procesaron para su extracción.

2.2.1.1. Extracción de las muestras fecales

El procedimiento para la extracción fecal se realizó basándose en el protocolo desarrollado por Brown *et al* (Brown JL *et al.*, 1993; Brown JL *et al.*, 1994; Brown JL *et al.*, 1996a; Brown JL and Wildt DE, 1997; Brown JL *et al.*, 1996b) y modificado por Brousset (Brousset D, 2003) cuyo uso ha sido reportado en ocelote (Brousset D, 2003; Hernández MS, 2002; Ugaz RC, 2004), jaguar (Ojeda CJ, 2002), lobo mexicano (Pifarré M, 2004), rinoceronte (Rendon FE, 2003), oso negro (Gutierrez DM, 2004), mono araña (Rodas MA, 2005).

Las cajas de Petri de plástico con las muestras fecales húmedas, se secaron en un horno bacteriológico a <70°C. Posteriormente se pulverizaron y retiraron restos de alimento y pelo para poder pesar de 0.18-0.20gr de heces secas, en tubos de vidrio con rosca.

A estos tubos se agregó 5ml de etanol al 80% (4ml etanol en 1ml de agua destilada), marcando el nivel del líquido en cada tubo. Posteriormente se hirvieron en baño maría con una temperatura de 90-100°C por 20 minutos, añadiendo etanol al 80% a cada tubo, para evitar que el contenido de los tubos se seque. Al terminar el tiempo en el baño maría se aumentó el volumen del extracto con etanol hasta la marca del volumen inicial, para posteriormente

centrifugar los tubos a 1,500 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se decantó en un segundo juego de tubos de vidrio de 16x125mm, numerados idénticamente y el líquido decantado se evaporó con aire a presión en un baño de agua tibia a 36°C. Al sedimento que se obtuvo al final de la evaporación, se le añadió 1ml de etanol y se agitó en el vortex por 1 minuto y se dejaron reposar por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugaron nuevamente los tubos a 1500 rpm por 20 minutos y finalmente se decantó el sobrenadante en tubos RIA identificados con los datos de la muestra, se sellaron los tubos y se mantuvieron en congelación hasta el día de su análisis.

La prueba de porcentaje de recuperación de la hormona (FAO., 1984; Zambrano AZ and Díaz SV, 1996), bajo este protocolo de extracción para todas las especies muestreadas, fue por arriba del 50%.

2.2.1.2. Radioinmunoanálisis

2.2.1.2.1. Validación

La validación o control de calidad se refiere, a los procedimientos que nos permiten evaluar la eficacia de un análisis cuantitativo (FAO., 1984).

Específicamente en el RIA se estima la precisión, la reproductividad y la desviación de las medias de los duplicados de este. El resultado será confiable si el método cumple con las siguientes características: Exactitud, Precisión, Reproductividad, Especificidad y Sensibilidad (FAO., 1984; Zambrano AZ and Díaz SV, 1996).

Para este estudio se realizaron pruebas de validación para todas las especies en estudio y consistieron en lo siguiente:

a) Exactitud

Se calculó mediante la determinación de la curva Dosis-Respuesta y del Paralelismo de las muestras (Zambrano AZ and Díaz SV, 1996).

La Curva Dosis-Respuesta se obtuvo mediante la determinación del grado de correlación, de las curvas obtenidas a partir de la curva estándar y de la diferencia obtenida de la resta del nivel de concentración de una muestra conocida, contra los niveles de concentración de cada uno de los puntos de los estándares adicionados a la misma. Para ello se utilizaron 4 muestras (repeticiones) por duplicado, de extracto de heces, con concentraciones conocidas, de cada una de las especies en estudio, a las cuales se les adicionaron 4 puntos conocidos de la curva estándar (un punto para cada alícuota). Una vez obtenidos los resultados del ensayo, se restó el nivel promedio conocido de cada una de las muestras utilizadas a los niveles promedios obtenidos de los ensayos. Una vez obtenidos los datos, se graficaron en conjunto con los puntos de la curva utilizados y se determinó el grado de correlación de las mismas, el cual debe de dar un valor cercano a uno.

El paralelismo indica que la interacción de la hormona presente en el extracto con el anticuerpo, es similar a la del estándar con el anticuerpo. Para ello se eligieron muestras al azar de extractos de heces, de cada una de las especies en estudio y se realizaron diluciones seriadas. Una vez obtenidos los valores del ensayo se graficaron y se determinó que los valores obtenidos, fueran decreciendo de acuerdo a la dilución efectuada.

b) Sensibilidad y especificidad

Estas están dadas por el anticuerpo utilizado. En este caso se utilizó un anticuerpo de tipo policlonal, específico contra cortisol (AB916) desarrollado por los laboratorios Chemicon (CHEMICON Lab., Temecula, CA. USA) y levantado en conejos. El laboratorio lo señala como no categorizado y por lo tanto no se tienen las reacciones cruzadas para el mismo, pero el laboratorio asegura una especificidad del 100%, contra cortisol. Sin embargo en el laboratorio se realizó una prueba de reacciones cruzadas para el mismo. Esta consistió en desafiar al anticuerpo contra diferentes hormonas relacionadas con la ruta metabólica de cortisol, las cuales fueron: Corticosterona, Colesterol, Progesterona, Pregnenolona, Androstendiona, Estradiol y Testosterona, a diferentes

concentraciones (200, 50, 6.25) y se determinó el grado de unión de la hormona a los mismos (FAO., 1984).

c) Precisión.

Se define como la dispersión de una misma muestra alrededor de su promedio. Y esta determina la calidad del ensayo.

Esta es determinada por medio de la variación entre y dentro de cada ensayo (Bedolla TA et al., 1984; FAO., 1984; Zambrano AZ and Díaz SV, 1996).

La variación dentro del ensayo, es determinada por medio del coeficiente de variación intra-ensayo de las replicas de las muestras dentro del ensayo (Bedolla TA et al., 1984; Zambrano AZ and Díaz SV, 1996).

La variación entre ensayos, se calcula por medio de la varianza acumulada para obtener el valor de F, el cuál es comparado con su valor tabulado al 95% de confianza con 1, n-1 grados de libertad, donde la regla de decisión para aceptar el coeficiente de variación Inter.-análisis es si $F \leq F_{(1,n-1),\alpha}$ (Bedolla TA et al., 1984).

2.2.1.2.2. Ensayo

Las muestras fueron analizadas con la técnica de Radioinmunoanálisis en fase líquida. El protocolo de trabajo del mismo, se basó en el utilizado en el laboratorio de Fisiología, del CINVESTAV-IPN, a cargo de la Dra. Marta Romano. El anticuerpo utilizado fue de tipo policlonal, específico contra cortisol (AB916) desarrollado por los laboratorios CHEMICON (CHEMICON Lab., Temecula, CA. USA), levantado en conejos. Se marca como no caracterizado y por lo tanto no se conocen las reacciones cruzadas para el mismo; pero el laboratorio asegura una especificidad del 100% contra cortisol. El marcador utilizado fue de hidrocortisona [1,2,6,7-³H(N)] 70-100 Ci/mmol, o 1 mCi/ml etanol de NEN Life Science products, Inc. Los estándares de la curva utilizados fueron de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 pg/ml. Las muestras se trabajaron por duplicado y los conteos se realizaron por 1 minuto, mediante un contador de centelleo Beckman LS 6000 TA®.

Para el cálculo de la ecuación de la curva de regresión y de los niveles hormonales a partir de ella se capturaron los datos de las cuentas en CPM de las muestras en el programa estadístico RIA Logic.

2.2.1.2.3. Control de calidad

El control de calidad de los ensayos se determinó mediante la obtención de la precisión del ensayo, obtenida por medio del cálculo de la desviación estándar de cada uno de los duplicados; el cálculo del coeficiente de variación promedio (CVP) de cada ensayo, así como CVP intra e Inter análisis y la determinación de r^2 calculada para la curva estándar en cada ensayo (Bedolla TA et al., 1984; Dudley RA et al., 1985; Zambrano AZ and Díaz SV, 1996).

2.2.1.3. Análisis estadístico

Para el análisis de los niveles hormonales, se obtuvieron de cada unidad observacional (UO=10) los valores promedio de cortisol, obtenidos de las muestras fecales en cada una de las 6 semanas muestreadas que formaron parte del periodo de investigación.

La unión de estos 6 tiempos promedios, dará como resultado un perfil para cada uno de los grupos. Estos perfiles se analizaron de acuerdo a la técnica de análisis de perfiles (Morrison DF, 1990), que comprenden tres hipótesis:

- I. Paralelismo de los perfiles.
- II. Igualdad de efectos entre grupos.
- III. Igualdad de efectos dentro de cada grupo.

Estas tres hipótesis dan respuesta a las siguientes preguntas:

- I. ¿Los patrones a lo largo de las 6 semanas de muestreo son iguales para cada uno de los grupos en estudio?
- II. ¿No existen diferencias en las respuestas entre cada grupo, a lo largo de las semanas de muestreo?
- III. ¿Las respuestas en cada una de las semanas muestreadas, son las mismas dentro de cada uno de los grupos?

Esta prueba se deriva del análisis del modelo lineal. Así que para tener una validez del mismo, cada variable analizada debe de cumplir los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas (Kuehl RO, 2001).

Para demostrar el supuesto de normalidad se corrió una prueba de normalidad por medio del programa estadístico SAS, versión 8,00 (SAS INS-TITUTE INC, 1999), a la totalidad de los datos obtenidos. Y para el supuesto de de homogeneidad de varianzas, se realizó la prueba de F Max de Hardley, en cada uno de los grupos (Kuehl RO, 2001).

a) Paralelismo de los perfiles

El análisis de las hipótesis de paralelismo (H_0) para los niveles hormonales, es análogo a un Análisis de Varianza Multivariado (MANOVA). Por ello se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 10.0.1 (SPSS inc,1999). A partir de éste se obtuvieron las matrices de las sumas de cuadrados y productos cruzados de los tratamientos ($B = [bij]$) y del error ($E = [eij]$), para poder asociarlos a los elementos $B^* = [bij^*]$ y $E^* = [eij^*]$; mediante

$$\begin{aligned}bij^* &= bij - (bi + 1j) - (bij + 1) + (bi + 1j + 1) & 1 \leq i \leq p - 1 & 1 \leq i \leq p - 1 \\eij^* &= eij - (ei - 1j) - (eij + 1) + (ei + 1j + 1) & 1 \leq j \leq p - 1 & 1 \leq j \leq p - 1\end{aligned}$$

Similar al caso multivariado el estadístico de prueba para la hipótesis de paralelismo es lambda de Wilks (λ) donde:

$$\lambda = \frac{!E^*!}{!E^*+B^*!} = \frac{!M'EM!}{!M'(E+B)M!}$$

Con la aproximación de Bartlett, lambda de Wilks es:

$$-\left\{n-1-\frac{1}{2}(p-1+t)\right\} \ln \lambda \cap X^2((p-1)(t-1))$$

El criterio de rechazo de Ho1 es:

Si el valor transformado de $\lambda \leq X^2((p-1)(t-1)), \alpha$

b) Igualdad de efectos entre grupos

Para el análisis de la hipótesis de Igualdad de efectos entre familias y sexos (Ho2), se utilizó como estadístico de prueba, el Criterio de Prueba de Wilks (λ), el cual se obtuvo del análisis multivariado de los tratamientos, obtenidos del análisis por medio de SPSS.

c) Igualdad de efectos de los seis tiempos dentro de cada grupo

i) Si Ho1 no fue rechazada, o sea continuando con la suposición de que los perfiles son paralelos lambda de Wilks para Ho3 es

$$\lambda = \frac{!E^*!}{!E^*+H^*!} = \frac{!A'EM!}{!A'EA+H^*!}$$

Donde E es la matriz (p x p) de suma de cuadrados y productos cruzados correspondientes al error que se ha venido utilizando.

La matriz H* está definida por:

$$H^* = \sum_{i=1}^t ni(y^*i., yi.)'$$

El criterio de decisión para rechazar Ho3 es:

Si el valor transformado de $\lambda \geq X^2(t(p-1)), \alpha$

ii) Si Ho1 fue rechazada, el análisis de la igualdad de efectos dentro de cada tratamiento se realiza por separado para cada grupo o tratamiento

Así que el estadístico T^2 para esta prueba es:

$$T^2 = ni\bar{Y}'i.C'(CSiC')^{-1} C\bar{Y}i.$$

El estadístico T^2 está asociado a la distribución de F mediante

$$F = \frac{ni - p + 1}{(ni - 1)(p - 1)} T^2 \cap F_{(p-1)(ni, p+1)}$$

El criterio de decisión para rechazar Ho3 es:

Si el valor transformado de $F \geq F_{(p-1)(ni, p+1), \alpha}$

2.2.2. Análisis de la variable respuesta: Conducta

Consistió en observar a las unidades observacionales (UO), en cada uno de los encierros una semana antes de su ubicación (semana 0) en los nuevos encierros, por cuatro semanas una vez ubicados (semana 1 ala 4) y una semana más dos meses después (semana 13).

Para ello se utilizaron barridos cada 5 minutos en cada uno de los albergues, por medio de registros instantáneos con el fin de observar el repertorio de conductas y la proporción de tiempo que ocupan en cada una de ellas, con interés especial en conductas de locomoción; en locomoción estereotipada; en exploración; en descanso y en estados de vigilancia (alerta). Para ello se realizaron modificaciones de etogramas de varios autores (Bekoff M, 1978; Brousset D, 2003; Mellen JD, 1989; Rivera RA, 2003; Servín J, 1991; Stander PE, 1992), por medio de 10 horas de observaciones previas, en cada

una de las especies de interés en sus albergues, teniendo un interés principal en las conductas individuales y sociales (anexos 7.2.1 y 7.2.2).

Las observaciones fueron diurnas y vespertinas, distribuidas a lo largo de los periodos de observación, intercalándolas en cada uno de los albergues, obteniéndose un total de 20 horas de observaciones, en cada una de las 6 semanas de observación, en cada unidad observacional (120hrs totales de observación/UO).

En el caso del Can H1, no fue posible realizar observaciones directas, por ello el registro de sus conductas fue por medio de 24 hrs de video grabación, con circuito cerrado durante 6 semanas. Una vez obtenidos los videos, se observaron los mismos y se registraron las conductas video grabadas en las mañanas y antes de anochecer, para que coincidieran con los periodos de muestreo de los otros individuos, para posteriormente realizar su análisis.

Se procuró que en el transcurso de este proyecto, no se realizara ningún cambio en el manejo rutinario del zoológico y se registró cualquier novedad que pudiera afectar los resultados.

2.2.2.1. Análisis estadístico

Para el análisis de la variable conducta, se obtuvieron de cada unidad observacional (UO) los valores promedio en cada una de las 6 semanas muestreadas de las proporciones del tiempo, en cada una de las conductas individuales de interés.

La unión de estos 6 tiempos promedios, dará como resultado un perfil para cada uno de los grupos. Estos perfiles se analizaron de acuerdo a la técnica de análisis de perfiles (Morrison DF, 1990), que anteriormente fue descrita.

Para que se cumpliera el supuesto de normalidad, se aplicó a los porcentajes de cada una de las conductas por UO, la transformación de arcoseno (Martin P and Bateson P, 1993.). Esta se comprobó mediante una prueba de normalidad realizada en el programa estadístico SAS, versión 8,00 (SAS INSTITUTE INC, 1999).

Para el supuesto de de homogeneidad de varianzas, se realizó la prueba de F Max de Hardley en cada uno de los grupos (Kuehl RO, 2001).

1.2.3. Análisis variable de respuesta: Relación entre niveles hormonales y conducta

La determinación de la relación entre los niveles de hormonas y la variación de las conductas en cada una de las semanas, se evaluó por medio de una correlación lineal simple de Pearson (Daniel W, 2002). El análisis se realizó mediante el paquete estadístico SPSS versión 10.0.1 (SPSS inc,1999).

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de la variable respuesta: Niveles hormonales de cortisol

a) Validación

3.1.a.1. Exactitud

i. Curva Dosis-Respuesta:

Las muestras extraídas en cada una de las especies, mostró una $r^2 > 0.90$, de la relación entre la concentración de la hormona estándar añadida y de la concentración del analito a evaluar.

El cuadro 2, muestra los resultados de la curva respuesta para cada una de las especies evaluadas. Y en la figura 2 se puede ver las gráficas de la regresión lineal para cada curva.

Cuadro 2. Pg/ml de cortisol añadido a alícuotas de extractos de heces y promedio de cortisol obtenido en cada una de las especies muestreadas.

Pg/ml añadido	Promedio. Pg/ml obtenido				n
	León africano	Ocelote	Lobo mexicano	Coyote	

100	107.5 ± 8.5	113.275 ± 7.27	114.05 ± 9.16	113.04 ± 9.78	4
50	51.3 ± 7.8	59.96 ± 13.50	56.74 ± 9.88	47.59 ± 11.22	4
25	26.0 ± 8.83	29.47 ± 12.53	29.51 ± 10.13	23.77 ± 2.47	4
12.25		11.65 ± 1.66	16.35 ± 3.79	11.23 ± 3.56	4
6.25	6.2 ± 2.63				4

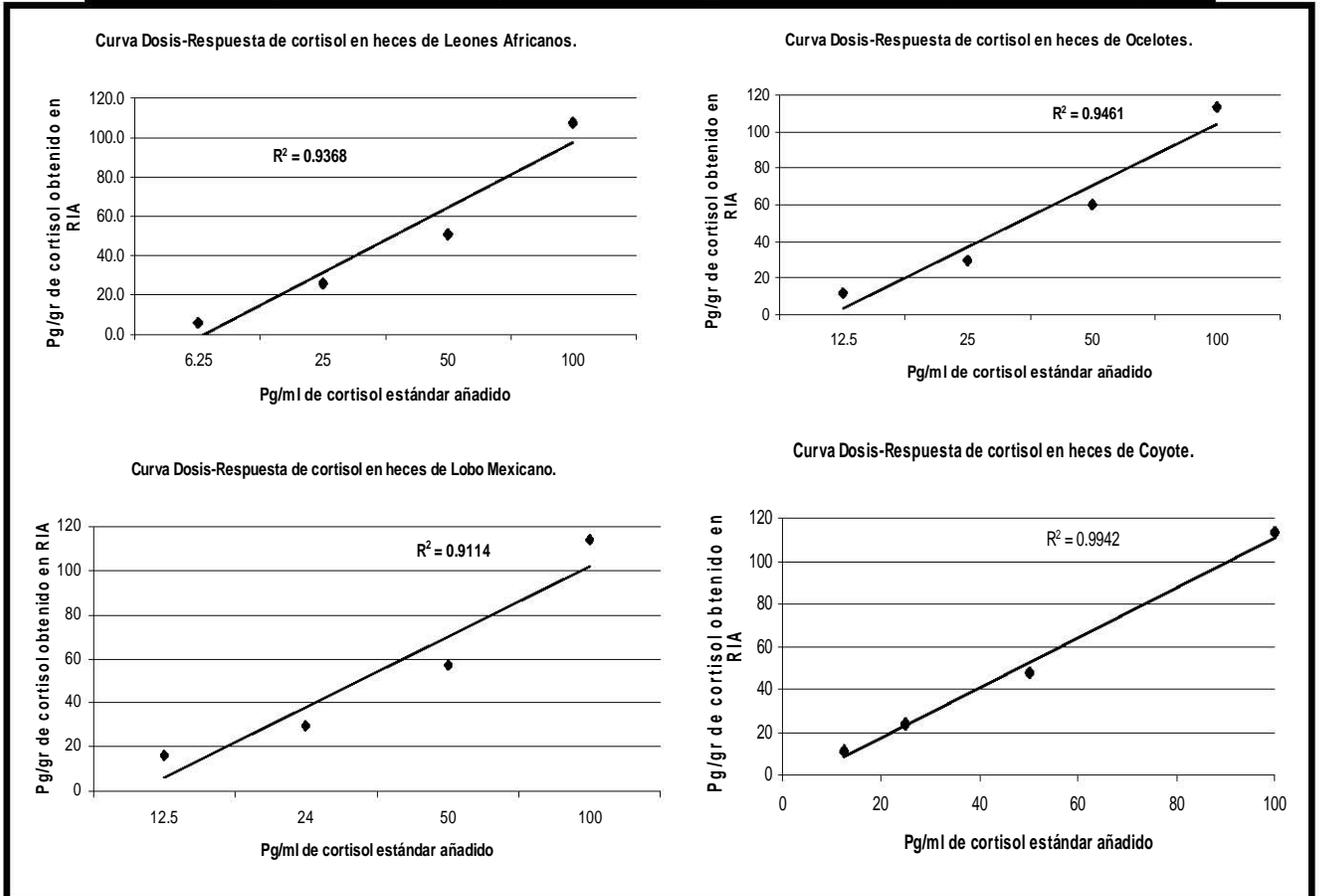


Figura 2. Gráficas de la regresión lineal para el análisis de la curva Dosis-Respuesta en las muestras de cada especie analizada.

i.i. Paralelismo:

Las graficas de la figura 3 muestran que la hormona que se encuentra en los extractos, tiene un patrón similar al cortisol empleado para elaborar la curva estándar para los ensayos.

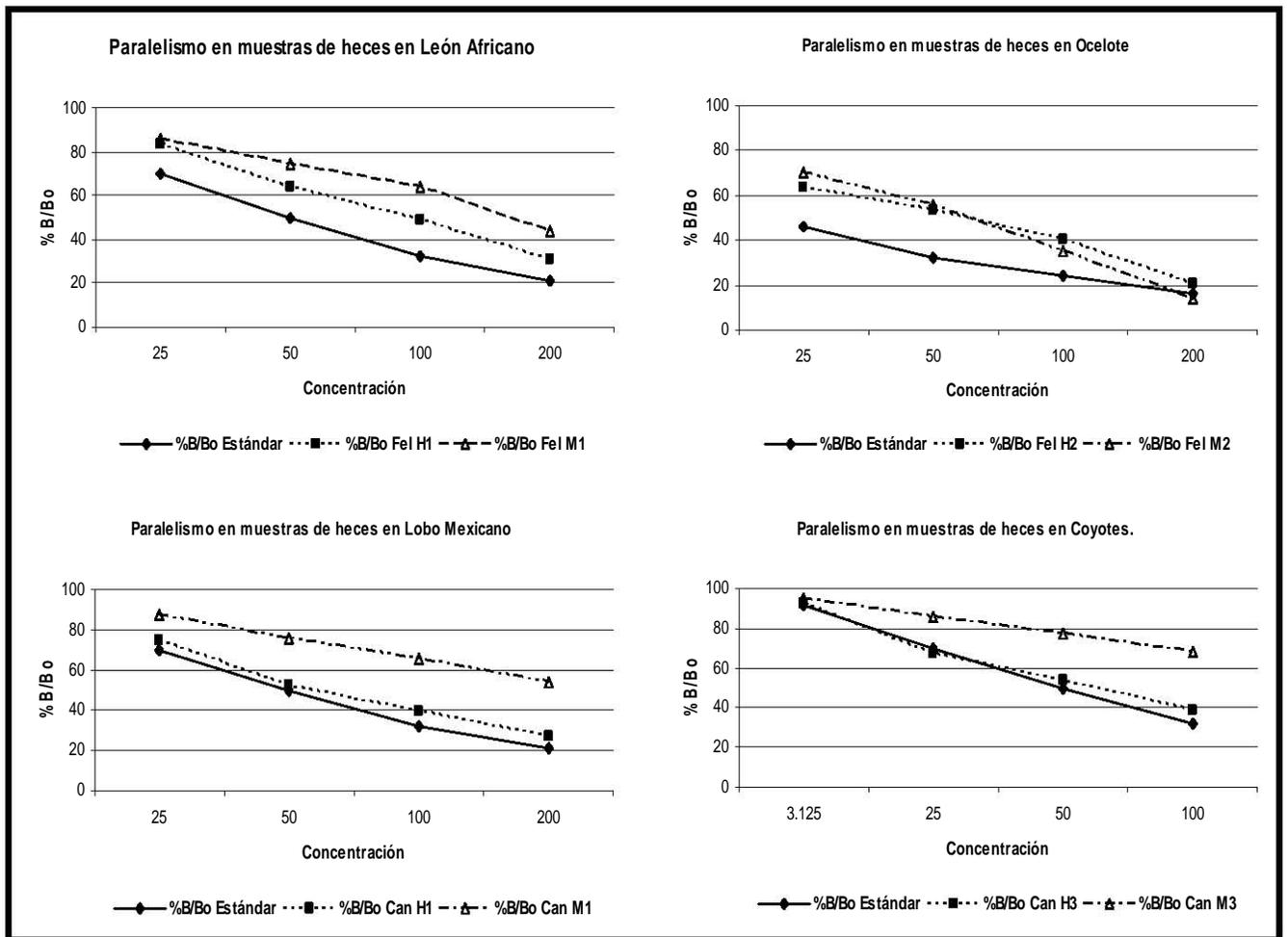
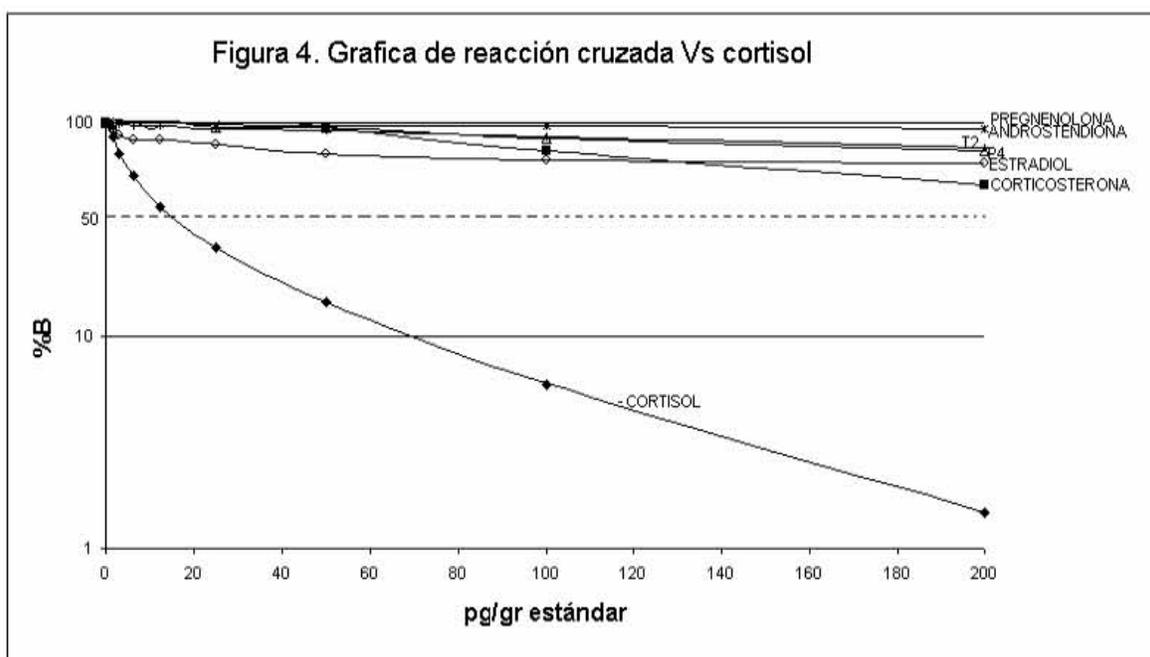


Figura 3. Graficas del paralelismo del % de unión del anticuerpo con la hormona estándar; con las diluciones decrecientes de los extractos de heces, en cada una de las especies analizadas.

* Las siglas de identificación de los animales muestreados corresponden al cuadro 1.

3.1.a.2. Sensibilidad y Especificidad.

La figura 4 muestra las curvas de reacción cruzada contra el anticuerpo de cortisol (AB916), realizada en el laboratorio, mientras que el cuadro 3 muestra los porcentajes de unión (%Bo), al nivel de 50% de reacción cruzada.



Cuadro 3. Porcentaje de unión al 50% de reacción cruzada con el anticuerpo de cortisol (AB916) Lab. Chemicon.

Hormonas	% de unión
Cortisol	100
Corticosterona	0.0096
Progesterona	0.0005
17 α -Hidroxipregenolona	0.0085
Androstendiona	0.0008
Estradiol	0.0196
Testosterona	0.0008

3.1.a.3. Precisión.

Se realizaron un total de 15 Radioinmunoanálisis, para la determinación de los niveles hormonales de los extractos fecales, en las diferentes unidades observacionales. La r^2 de las curvas estándar, de los diferentes ensayos fue mayor al 98%. El coeficiente de variación promedio total, de cada uno de los análisis fue del $6.31\% \pm 2.02$. El coeficiente de variación promedio total intra-análisis fue de $6.28\% \pm 2.41$. La F obtenida en el análisis Inter-análisis para los 15 ensayos fue 0.43 y F de tablas fue de 4.67.

Las diluciones óptimas para cada una de las especies evaluadas, se encuentran resumidas en el cuadro 4.

Cuadro 4. Factores de dilución.

Especie	Factor de dilución
León Africano	1:2000
Ocelote	1:1600
Lobo Mexicano	1:2400
Coyote	1:1000

b) Niveles hormonales obtenidos

Las pruebas de normalidad demostraron, que los datos de niveles hormonales obtenidos a partir de muestras fecales, tienen una distribución normal. Asimismo se comprobó, que existe homogeneidad de varianzas entre los niveles promedios de cortisol por semana entre cada uno de los grupos ($p \leq 0.05$).

Las figuras 5a y 5b, muestran las gráficas de los niveles promedio de cortisol obtenido a partir de muestras fecales, por grupo evaluado.

La figura 5b.1 muestra los patrones de distribución de los niveles de cortisol en el grupo de felinos. En ella se puede observar que en los felinos

hembras los niveles promedio de cortisol presentaron un aumento progresivo durante las 2 semanas posteriores al traslado al nuevo albergue (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$), seguido por un descenso a partir de la semana 3 (semanas 3 a la 13), pero el descenso observado en la semana 4 no pudo igualar a los niveles que se presentaron en el grupo de felinos hembras antes de que se hiciera el traslado (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$). En el caso de machos se observó que se presentó un aumento significativo en la primer semana posterior al traslado (semana 1) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$), para posteriormente presentarse una disminución en la semana 2 (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$). Esta disminución se mantuvo en las semanas 2 y 3, pero en la semana 4 se presentó nuevamente un pico en los niveles de cortisol, el cual fue mayor en comparación a los niveles iniciales y a las semanas 2 y 3 (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$). En este grupo se observó que los niveles obtenidos 3 meses después al traslado (semana 13) son menores en comparación a los niveles obtenidos antes del traslado (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$).

Así mismo se observaron diferencias significativas en los niveles de cortisol entre sexos en el grupo de felinos, a lo largo de las 6 semanas muestreadas (prueba de igualdad de medias entre grupos $p \leq 0.05$). Estos niveles presentaron cambios entre cada una de las semanas muestreadas, así en el grupo de felinos hembras se observó que los niveles fueron menores en comparación a los machos en las semanas 0, 1, 4, 13 (prueba de igualdad de medias entre grupos $p \leq 0.05$).

Por otro lado este patrón no fue igual en el grupo de caninos en el cual las hembras (figura 5b.2) presentaron niveles de cortisol menores en comparación a los machos (prueba de igualdad de medias entre grupos $p \leq 0.05$), a lo largo de las 6 semanas de muestreo. Al igual que en las hembras del grupo de felinos, las hembras del grupo de caninos presentaron un patrón de distribución similar (prueba de paralelismo $p \geq 0.05$), en donde se observó que una vez hecho el traslado, las hembras presentaron un aumento gradual de los niveles de cortisol

en las dos primeras semanas de muestreo, para posteriormente presentar una disminución de forma gradual en las semanas subsecuentes (semana 3 a la 13) (prueba de igualdad de medias entre grupos $p \leq 0.05$), pero este descenso de niveles de cortisol no igualo ni fue menor al obtenido en la semana anterior al traslado al nuevo albergue (semana 0) (prueba de igualdad de medias entre grupos $p \leq 0.05$).

En el grupo de caninos machos, también se presentó un pico de los niveles promedio de cortisol seguido de una disminución como respuesta al cambio de albergue (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$), pero en las siguientes semanas se observaron aumentos y descensos de estos niveles promedio (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$), sin embargo al finalizar las primeras 4 semanas de muestreo, los niveles que se presentaron en este punto fueron menores en comparación a los obtenidos en la semana anterior al traslado (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$).

Los cuadros 5 y 6 resumen los niveles hormonales obtenidos por semana por unidad observacional y por grupos.

	Semana0	Semana1	Semana2	Semana3	Semana4	Semana13	total	N
FEL M1	189.05±25.76	349.55±287.53	203.18±59.43	213.3±47.99	399.85±96.64	208.17±109.54	260.52±90.22	24
FEL M2	596.99±45.68	839.58±95.22	564.25±26.37	608.21±69.20	594.29±154.96	516.37±35.02	619.95±112.60	24
FEL H1	298.11±56.27	422.54±421.59	447.7±197.15	343.77±143.20	353.41±151.49	143.04±48.26	334.76±108.61	24
FEL H2	416.66±117.86	678.17±410.35	701.68±341.38	775.12±110.22	548.26±142.47	386.22±106.55	584.35±159.77	24
CAN M1	533.96±36.21	612.04±78.17	386.22±49.63	570.89±21.78	332.03±79.49	449.29±81.84	480.74±109.77	24
CAN M2	314.13±142.16	377.8±148.77	320.02±53.52	344.19±77.69	322.95±30.43	292.26±104.33	345.23±46.74	24
CAN M3	109.89±41.15	273.73±156.84	224.84±387.17	189.24±41.06	139.97±71.86	193.11±77.70	188.47±58.55	24
CAN H1	181.88±68.95	346.95±214.07	272.08±157.06	216.2±68.45	212.67±78.27	225.67±76.75	242.57±58.86	24
CAN H2	347.42±18.91	483.84±124.34	468.36±96.92	424.73±89.08	341.05±55.52	311.43±89.22	396.14±72.53	24
CAN H3	103.33±57.61	145.76±85.12	158.67±81.99	146.65±75.18	113.58±37.26	150.36±79.25	136.39±2.34	24

Cuadro 5. Niveles promedio de cortisol por semana por unidad observacional ± DS.

	Semana0	Semana1	Semana2	Semana3	Semana4	Semana13	TOTAL	N
FELINOS MACHOS	393.02±288.45	594±346.50	383.71±255.31	410.76±279.24	497.07±137.48	362.27±217.93	440.23±254.15	2
FELINOS HEMBRAS	357.38±83.82	550.36±180.75	574.68±179.59	559.44±305.01	450.84±137.77	264.63±171.95	459.26±176.48	2
CANINOS MACHOS	319.33±212.07	421.19±173.27	310.36±81.11	368.11±119.94	264.98±108.35	311.55±217.94	388.14±146.26	3
CANINOS HEMBRAS	210.88±124.60	325.52±170.05	299.70±156.68	262.52±144.71	222.43±114.04	229.15±80.59	258.37±130.59	3

Cuadro 6. Niveles promedio de cortisol por semana por grupo ± DS.

3.2. Análisis de la variable respuesta: Conducta

Las pruebas de normalidad para cada variable de conducta evaluada demostraron, que la distribución de las proporciones de tiempo en cada unidad observacional, tienen una distribución normal. Pero el supuesto de homogeneidad de varianzas entre los promedios porcentuales por semanas por grupos, no se cumplió en ninguna de las variables conductuales en estudio. Así que para determinar la igualdad de medias entre grupos por semanas, se tomó la decisión de realizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

a) Conductas de vigilancia

La figura 6a y 6b muestran las graficas de los porcentajes promedio, de las conductas de vigilancia que presentaron los diferentes grupos, a lo largo de las 6 semanas de muestreo.

En ellas se observan, que existen similitudes en el patrón de distribución de los porcentajes promedio, entre cada grupo en estudio. El cuál fue comprobado mediante la prueba de paralelismo, la cual no detecto diferencias significativas entre los grupos en estudio ($p \geq 0.05$).

En las graficas 6a y 6b se puede observar que al momento del cambio (semana 1), tanto en machos como en hembras, se presentó un aumento significativo de la proporción del tiempo en estados de vigilancia en comparación de los valores iniciales (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$), pero los tiempos en los cuales descendieron estos porcentajes fueron diferentes entre sexos (Kuskal Wallis $p \leq 0.05$), así por un lado se observó en el caso de machos un pico en los porcentajes de conductas en vigilancia,

seguido por un descenso que casi igualó a los valores obtenidos en la semana previa al traslado (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$), y por otro lado en el caso de hembras el aumento y la disminución de los porcentaje se dio de manera gradual a lo largo de las semanas de muestreo (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$).

En la grafica 6a se puede observar que el porcentaje en estados de vigilancia en el albergue nuevo (semanas 2 a la 13) fue mayor en hembras en comparación a los machos (Kuskal Wallis $p \leq 0.05$) y que al finalizar el primer mes (semana 4) solo en los caninos machos los valores observados fueron menores al valor obtenido antes del traslado (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$).

b) Conductas de descanso

La figuras 7a y 7b, muestran la graficas de los porcentajes promedio, de los estados en descanso en los diferentes grupos, a lo largo de las 6 semanas de muestreo. No se encontraron similitudes en el patrón de distribución de los porcentajes promedios a lo largo de las 6 semanas de muestreo, entre los 4 grupos (Prueba de paralelismo $p \leq 0.05$).

Después del traslado al nuevo albergue (figura 7b.1 y 7b.2), se observa que las hembras dentro de cada familia, poseen menor porcentaje en estados de descanso a comparación de los machos (Kruskal Wallis $p \leq 0.05$).

Por familias se puede observar (figura 7b.2), en el caso de caninos que al finalizar el primer mes (semana 4) y 3 meses después al traslado (semana 13), los porcentajes en estados de descanso son menores en comparación a los valores iniciales (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$); pero en felinos (figura 7b.1) estos porcentajes (semana 4 y 13), son similares a los valores iniciales (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$).

c) Conducta estereotipada

Las figuras 8a y 8b muestran las graficas de los porcentajes promedio, de los estados en conducta estereotipada en locomoción en los diferentes grupos, a lo largo de las 6 semanas de muestreo.

Se puede observar que por familia (figura 8a), existen similitudes en los patrones de distribución de los porcentajes en conducta estereotipada, a lo largo de las 6 semanas de muestreo. Y esta fue corroborada por medio de la prueba de paralelismo, la cual no encontró diferencias significativas entre los grupos muestreados ($p \geq 0.05$).

Se observa que antes del traslado (semana 0), en las hembras de las 2 familias (figuras 8b.1y 8b.2), las proporciones del tiempo en conductas estereotipadas, son significativamente mayores en comparación a los machos (Kruskal Wallis $p \leq 0.05$). Una vez hecho el cambio (semana 1), en el caso de caninos (figura 8b.2), el porcentaje en conductas estereotipadas en hembras es menor a comparación de machos (Kruskal Wallis $p \leq 0.05$). En felinos tanto hembras como machos (figura 8b.1), se observa que una vez realizado el cambio al albergue nuevo (semana 1) y en las semanas siguientes (semanas 2-13) no se presentaron conductas estereotipadas.

En caninos hembras y machos (figura 8b.2), se observa una disminución de conductas estereotipadas en comparación de los valores iniciales, en la primer semana posterior al traslado (semana 1) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$). Para posteriormente, incrementar gradualmente y al finalizar el primer mes (semana 4), se observa que el porcentaje en conductas estereotipadas es menor a los valores iniciales (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$).

d) Conducta en exploración

Las figuras 9a y 9b muestran las graficas en conductas de exploración en los 4 grupos evaluados. Se observa (figura 9a), que en cada grupo hay un aumento gradual de las conductas en exploración, seguido de un descenso gradual (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$), y no se encontraron diferencias significativas entre los patrones de distribución de los promedios en conductas exploratorias entre familias y sexos (Prueba de paralelismo $p \leq 0.05$).

En la figura 9a, se observa que existen diferencias entre sexos en los porcentajes de exploración del albergue nuevo (Kuskal Wallis $p \leq 0.05$), siendo estos menores en grupo de los machos. $p \leq 0.05$

En los 4 grupos evaluados (figura 9a), se observa un incremento en la proporción del tiempo dedicado a conductas en exploración al momento de la reubicación (semana 1), en comparación a los valores iniciales (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$); este aumento inicial fue seguido por una disminución gradual de la semana 2 a la 13 (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$); pero los caninos machos fueron el único grupo en el que los porcentajes de exploración observados al final del primer mes, fueron menores en comparación a los obtenidos en la semana previa al traslado (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$).

Otro punto importante de resaltar es que el grupo de felinos tuvo mayor porcentaje en conductas de exploración en su albergue nuevo, en comparación a los caninos y que esta diferencia se mantuvo hasta 3 meses después del traslado (Kuskal Wallis $p \leq 0.05$).

e) Conductas en locomoción

Las figuras 10a y 10b muestran las graficas de conductas en locomoción en los 4 grupos evaluados. En donde no se encontraron similitudes en los patrones de distribución, entre cada grupo muestreado (prueba de paralelismo $p \leq 0.05$).

En el albergue viejo (semana 0) se observó (figuras 10b.1 y 10b.2), que el porcentaje en desplazamiento es mayor en machos en comparación a las hembras (Kruskal Wallis $p \leq 0.05$). Pero en el albergue nuevo se observaron diferencias entre familias y sexos por familia; así se puede observar en la figura 10a que los caninos se desplazaron más tiempo en su albergue nuevo en comparación con los felinos (Kruskal Wallis $p \leq 0.05$) y que los caninos hembra tuvieron menos porcentaje de locomoción en el albergue nuevo en comparación a los caninos machos (Kruskal Wallis $p \leq 0.05$) y en el caso de felinos las hembras de este grupo se desplazaron más dentro de su albergue nuevo en comparación a los machos (Kruskal Wallis $p \leq 0.05$).

En todos los grupos se observó un aumento gradual a lo largo de las semanas de muestreo (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$) y que al finalizar el primer mes del traslado (semana 4) y 3 meses después de este (semana 13) no se observó que los porcentajes disminuyeran en comparación al los observados antes del traslado (semana 0) (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$),

En el caso de las hembras en ambas familias (figura 10.4), se observa un aumento gradual en el porcentaje de desplazamiento, hasta la segunda semana posterior al traslado al nuevo albergue (semana 2) y posteriormente no se observan variaciones de los mismos. Finalmente al finalizar el primer mes de muestreo (semana 4) y 3 meses después de la reubicación (semana 13), el

porcentaje en desplazamiento, se mantiene por arriba de los valores iniciales (Prueba de igualdad de medias dentro de grupos $p \leq 0.05$).

3.3. Análisis de la variable respuesta: Relación entre niveles hormonales y conducta

Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre niveles de cortisol y estados de alerta en los 4 grupos evaluados.

En el caso de conductas en descanso se observó que esta variable solo fue significativa para el grupo de felinos machos ($p < 0.05$) y la correlación obtenida fue negativa.

En conducta estereotipada y cortisol, se encontró una correlación negativa en el grupo de caninos machos y hembras ($p < 0.01$). En estados en exploración, se encontró una correlación positiva, estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los grupos de caninos hembras y felinos hembra.

No se encontró relación ente conductas de desplazamiento y cortisol, en ninguno de los grupos evaluados.

El cuadro 7 resume los grados de correlación encontradas en cada una de las variables analizadas.

		FELINOS MACHOS	FELINOS HEMBRAS	CÁNINOS MACHOS	CÁNINOS HEMBRA	n
ALERTA	Correlación de Pearson	.921(**)	.847(*)	.866(*)	0.809(*)	6
	Sig. (2-colas)	0.009	0.033	0.026	0.05	
DESCANSO	Correlación de Pearson	-.828(*)	-0.528	-0.148	-0.356	6
	Sig. (2-colas)	0.042	0.282	0.78	0.489	
ESTEREOTIPIA	Correlación de Pearson	-0.26	-0.396	-0.806(*)	-.939(**)	6
	Sig. (2-colas)	0.618	0.437	0.05	0.006	
EXPLORACIÓN	Correlación de Pearson	0.37	.869(*)	0.622	.897(*)	6
	Sig. (2-colas)	0.47	0.025	0.187	0.015	
LOCOMOCIÓN	Correlación de Pearson	-0.409	0.291	-0.716	0.241	6
	Sig. (2-colas)	0.421	0.576	0.109	0.646	

Cuadro 7. Correlación cortisol vs variables de conducta en los 4 grupos analizados.
 * significancia al 0.05
 ** significancia al 0.01

4. DISCUSIÓN

4.1. Validación

Como se puede observar en los resultados, todos los puntos de la validación entraron dentro de los parámetros aceptables para la misma, aún y cuando varios autores recomienden anticuerpos contra corticosterona, para la determinación de actividad adrenocortical a partir de extractos fecales (Wasser SK, 2000). Por lo tanto es factible la utilización del anticuerpo contra cortisol de laboratrios Chemicon, utilizado en el presente estudio para especies de caninos y felinos silvestres. Ya que este anticuerpo tiene la ventaja de ser policlonal y su especificidad no demostró ser tan rígida hacia un solo antígeno.

Así mismo el protocolo de extracción y medición por medio de RIA utilizado en este trabajo, así como en otras investigaciones relacionadas en determinar niveles hormonales a partir de heces (Brousset D, 2003; Pifarré M, 2004; Ugaz RC, 2004), se puede aplicar en León africano y Coyote de forma confiable.

4.2. Niveles hormonales de cortisol

Los resultados obtenidos mostraron que existen diferencias de los patrones de distribución de los niveles de cortisol entre sexos. Así en el grupo de hembras se observó que en respuesta a un cambio de albergue, los niveles promedio de cortisol sufren un aumento y disminución gradual a lo largo de las semanas de muestreo en comparación de el grupo de machos en el cuales se presenta un pico al momento del cambio seguido de una disminución que casi

igual a los valores iniciales de cortisol. Estos dos patrones son parecidos a los que han postulado Sapolsky y McEwen, en relación a la posible presentación gráfica de glucocorticoides liberados como respuesta a un evento estresante. Sapolsky menciona que la presentación gráfica de la respuesta fisiológica de los niveles de glucocorticoides, ante un evento estresante es una “U” invertida (Greenberg N et al., 2002; Korte MS et al., 2005; McEwen BS and Sapolsky RM, 1995; Sapolsky RM, 1997; Sapolsky RM et al., 2000), así mismo McEwen ha propuesto varios patrones de distribución de los niveles de glucocorticoides, con relación a la capacidad de causar daño a nivel fisiológico (figura 9) (McEwen BS and Wingfield JC, 2003), las diferencias entre estos patrones reside en la amplitud longitudinal de la curva obtenida. El postula que entre más angosta sea la curva de glucocorticoides mejor será la respuesta a estrés ya que no se sobrepasa la demanda energética a largo plazo ante un evento estresante y por lo tanto el organismo no tiene la necesidad de activar otros mecanismos para mantener la homeostasis (McEwen BS and Wingfield JC, 2003), así entre más se expanda en forma longitudinal esta curva los niveles de glucocorticoides se mantienen altos por más tiempo y por lo tanto los sistemas necesarios para mantener una adecuada adaptación al evento estresante (sistema inmune, tasa metabólica, actividad cerebral, etc.) se mantendrán activos por más tiempo y luego entonces se pueden empezar a manifestar problemas. (McEwen BS and Wingfield JC, 2003). Bajo estos supuestos se podría sospechar que las hembras tienen mayor dificultad para afrontar una situación estresante en comparación con los machos, ya que la distribución gráfica de sus niveles de cortisol, fueron mucho más amplias en comparación a los machos. En estos últimos se observó un pico seguido de un descenso, pero en las semanas siguientes también se presentaron otros picos de cortisol promedio, el cuál se puede atribuir a que en esas semanas se presentó conducta sexual y como anteriormente se mencionó, el aumento de niveles de testosterona gonadal está relacionada con aumentos de glucocorticoides en machos (Meikle WA, 1989). Este aumento de niveles de metabolitos de cortisol obtenido de muestras fecales, relacionado a un aumento de niveles de

testosterona se ha reportado también en ocelotes (*Leopardus pardalis*) (Ugaz RC, 2004).

Las diferencias encontradas entre sexos no solo estuvieron relacionadas a su distribución sino también a los niveles; así se encontró que los niveles de cortisol en hembras fueron significativamente mayores en comparación a los machos. En relación a la existencia de diferencias de niveles glucocorticoides entre sexos, no existen consistencias en los estudios dirigidos a este punto. Por un lado algunos investigadores han encontrado diferencias entre sexos sometidos a diferentes estresores. En estos estudios se ha observado que las hembras tuvieron mayores niveles de cortisol en comparación con los machos (Campbell T et al., 2005). Y por otro lado, estudios hechos con niveles de cortisol fecal en lobos, no se encontraron diferencias entre sexos (Pifarré M, 2004).

4.3. Conductas

a) Conductas en vigilancia

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo en que disminuyen los porcentajes promedio en conductas de vigilancia y de los porcentajes promedio entre sexos y familias como respuesta a un cambio de albergue. Luego entonces en las hembras de cada familia se observó que la disminución de estos porcentajes fue más gradual y que estos porcentajes fueron más altos en comparación con los machos y que los felinos exploraron mas su albergue nuevo en comparación con los caninos. Se sabe que los estados de vigilancia, ayudan al organismo a mantener un óptimo nivel de información sensorial y por lo tanto excitación en el SNC (Hughes RN, 1997). Al igual que en el caso de los patrones de estrés, se estipula que los estados de vigilancia tienen una forma de U, que se conoce como “estimulo impacto”, el cual es una combinación de varias variables y de estímulos, que lo pueden estar afectando

(Hughes RN, 1997), como son la falta de predicción del ambiente y la novedad (Haile CN et al., 2001). En consecuencia, los estados de vigilancia son directamente proporcionales al estímulo y. Así al parecer las hembras y los felinos son más sensibles al cambio, ya que los patrones de distribución de los porcentajes son más amplios en hembras y sus niveles son más altos en felinos y en las hembras también.

b) Conductas de descanso

Se observó que en el albergue nuevo en todos los grupos se disminuyó el porcentaje promedio en conductas de descanso. Muy probablemente esto se debió a que al estar en un encierro más complejo, dedicaron más tiempo en exploración del mismo. Esto se ha observado también en otras especies, a las cuales se les ha mejorado la complejidad de los albergues, por medio de programas de enriquecimiento ambiental ((Brousset D, 2003; Carlstead K, 1991; Carlstead K, 1996a; Carlstead K et al., 1993; Gutierrez DM, 2004; Ojeda CJ, 2002)

c) Conducta estereotipada

Con respecto a esta conducta se presentaron dos fenómenos interesantes, por un lado en el albergue nuevo los felinos que presentaban conducta estereotipada de locomoción no la presentaron durante las semanas de muestreo y por el otro en el caso de cánidos, siguieron presentando conducta estereotipada en el albergue nuevo pero los porcentajes fueron menores en comparación al los que presentaban en el albergue anterior. Esta disminución de los porcentajes en conducta esterotipada en el albergue nuevo, muy probablemente se debió, a que el tamaño y la complejidad del mismo es mucho mayor en comparación del albergue que anteriormente habitaban. Se ha estipulado que una de las principales causas en la presentación de conductas estereotipadas de locomoción, es por la motivación frustrada de exploración y

búsqueda de alimento en ambientes poco complejos, como los que se pueden presentar en zoológicos (Carlstead K, 1991; Carlstead K, 1996a; Carlstead K, 1996b; Carlstead K et al., 1993; Carlstead K and Seidensticker J, 1991; Mason GJ, 1991). Por lo tanto al darles la oportunidad de poder explorar y desplazarse en un albergue más amplio, es muy probablemente que pudieron consumir esta motivación y por lo tanto no tuvieron la necesidad de seguir desarrollando conducta estereotipada de locomoción. Este comportamiento se ha visto en otras especies de animales silvestres mantenidos en cautiverio, en donde se observó que la complejidad del albergue, disminuye la presentación de conductas anormales (Brousset D, 2003; Carlstead K, 1991; Carlstead K, 1996a; Carlstead K, 1996b; Carlstead K et al., 1993; Gutierrez DM, 2004)

d) Conductas en exploración

En el presente estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes promedio de conductas en exploración entre sexos y familias, Así las hembras y los felinos ocupan un mayor tiempo en conductas de exploración en su albergue nuevo y también se observó que tres meses después de su traslado, los niveles de exploración en caninos eran menores en comparación a los felinos y aún más, eran menores a lo que presentaban en su albergue anterior. Las conductas de exploración le sirven al individuo para recabar información para el SNC y por lo tanto tienen una acción directa para el aprendizaje y el reconocimiento del medio ambiente y de otros individuos con los que se Interactúa diariamente (Hughes RN, 1997). Así que entre más complejo y novedoso sea un encierro, se estimulan más conductas exploratorias en animales silvestres mantenidos en cautiverio (Carlstead K, 1991; Carlstead K, 1996b; Carlstead K et al., 1993; Zimmermann A et al., 2001). Por lo tanto no solo el hecho de cambiar a un animal a un albergue nuevo y más amplio, nos garantiza que los periodos de exploración se mantengan por un largo tiempo, ya que si no se mantiene continuamente en cambio es muy probable que

le pierda el interés rápidamente y esto muy probablemente explique lo que pasó en el caso de caninos ya que a estos no se les implementó un programa de enriquecimiento ambiental y en el caso de felinos sí se les tenía contemplado un programa de este tipo.

e) Conductas en locomoción

Finalmente el tiempo dedicado a conductas en desplazamiento fue mayor en los albergues nuevos, esto muy probablemente se debió a que el tamaño del albergue nuevo es mucho mayor en comparación del albergue viejo. Y por lo tanto se tienen que desplazar más para poderlo recorrer.

Por otro lado se observó que existieron diferencias entre familias en el tiempo dedicado a conducta en locomoción, aún y cuando en las 4 especies evaluadas es común se observe mayor actividad al anochecer y al amanecer (Bekoff M, 1978; Gomez O, 1994; Servín J, 1991; Stander PE, 1992). Estos cambios pudieron haberse debido a que los periodos de actividad en los felinos fueron principalmente durante las horas de búsqueda de alimento, el cual se les proporcionaba por las mañanas.

4.4. Relación entre niveles hormonales y conducta

Como anteriormente se había mencionado, ante un evento estresante existe un incremento en los estados de vigilancia (conductas de Alerta), relacionado con la activación del eje Hipotalamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), que puede ir acompañado por un incremento en estados de ansiedad y miedo, si el animal no tiene control del evento (Ursin H and Olf M, 1993). En el presente estudio se encontró esta misma relación, ya que se encontró una correlación positiva entre estados de vigilancia y niveles de metabolitos de cortisol, en ambos sexos de las 2 familias en estudio.

Otro punto importante en el presente estudio, es que se halló una relación entre los niveles de cortisol y conductas estereotipadas, en el grupo de caninos de ambos sexos. Esta correlación fue de tipo negativa y este resultado respalda al supuesto de que las estereotipias no sólo son conductas anormales, ya que no son parte del comportamiento natural de los animales (Faser AF and Broom D M, 1990). Sino que también son mecanismos que ayudan al animal, a enfrentar eventos que están fuera de su control, ya que se ha visto que el desarrollo de las mismas, reducen las respuestas fisiológicas asociadas a estrés (Koolhaas JM et al., 1999; Mason GJ, 1991; Rushen J, 1993).

Así animales que desarrollan estereotipias, presentan menos úlceras gástricas ((Wiepkema PR et al., 1987), baja su actividad noradrenergica (Schouten WG and Wiepkema PR, 1991), y reducen estados de ansiedad a nivel de SNC (Mason GJ, 1991), principalmente por medio de la secreción, de péptidos opioides a nivel de SNC (Barchas JD and Altemus M, 2000; Mason GJ, 1991). Pero al mismo tiempo las estereotipias son un mecanismo de auto-evasión, relacionados a una respuesta baja hacia los estímulos externos (Broom DM and Johnson KG, 1993; Faser AF and Broom D M, 1990; Mason GJ, 1991), que a largo plazo causa un detrimento de tipo cognoscitivo en el animal. Y por lo tanto se forma un círculo vicioso, ya que al no estar recibiendo información de forma adecuada del exterior, se reduce su capacidad de aprender y por lo tanto de responder de forma adecuada a otras adversidades (Broom DM and Johnson KG, 1993; Faser AF and Broom D M, 1990; Mason GJ, 1991).

Finalmente aún y cuando en todos los grupos evaluados se encontró una correlación positiva entre conductas de exploración y niveles hormonales, sólo en las hembras fue significativa.

Estudios en animales de laboratorio (ratas) ha demostrado, que existe una prevalencia alta en hembras de iniciar conducta de exploración en presencia de un ambiente nuevo, en comparación con los machos expuestos a pruebas de exploración en campo abierto (Campbell T et al., 2005; Heinsbrock RO et al., 1988). Asimismo las hembras presentan niveles más altos de glucocorticoides,

como respuesta a eventos estresantes, en comparación con los machos (Michaelis T et al., 2000)

Para finalizar, una de las posibles explicaciones de porqué las hembras exploran más, descansan menos, se encuentran en vigilancia más y porqué los niveles de cortisol, se mantienen por más tiempo por arriba de los valores iniciales; es porqué evolutivamente las hembras tiene mayor carga fisiológica, ya que son las responsables de procrear y en la mayoría de los casos, de cuidar solas a la progenie (Korte MS et al., 2005). Por lo tanto, tienen que estar constantemente en la búsqueda de alimento y estar alertas a cualquier predador o peligro. Se ha visto que niveles altos y constantes de glucocorticoides, incrementan CRH a nivel de amígdala e hipotálamo (región paraventricular) (Heinrich SP et al., 1995; Koob GF, 1999). Y estos núcleos a su vez mandan inervación al núcleo azul (*locus coeruleus*), el cual en conjunto con la amígdala se encuentra relacionado a estados de vigilancia y búsqueda (Davidson GL, 2003). Evolutivamente esto es un beneficio, ya que aumenta los estados de alerta para la búsqueda y detección de peligro (Davidson GL, 2003; Korte MS et al., 2005). Pero también tiene un costo y se ha visto que esta respuesta, se encuentra relacionada a mayor vulnerabilidad para desarrollar problemas depresivos y psicóticos (Gold WP et al., 1995). Los estados depresivos provocan que este estado se vuelva un círculo vicioso, ya que constantemente se esta liberando CRH y por lo tanto sigue la retroalimentación positiva para los glucocorticoides. Esto provoca que estas hormonas se sigan liberando constantemente (Gold WP et al., 1995; Sapolsky RM et al., 2000) y a largo plazo comprometen la supervivencia del individuo, como anteriormente se había apuntado.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones generadas en el presente estudio son:

- a) La utilización del anticuerpo (AB916) de laboratorios Chemicon, es una buena opción para ser utilizado en la determinación de niveles de metabolitos de cortisol en León Africano (*Panthera leo*), Ocelote (*Leopardus pardalis*), Coyote (*Canis latrans*) y lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*).
- b) La metodología de extracción fecal, utilizada en este estudio y reportada por otros autores, es adecuada para la determinación de niveles de metabolitos de cortisol a partir de extractos fecales en León Africano (*Panthera leo*) y Coyote (*Canis latrans*).
- c) Si se planean hacer traslados de hembras de las especies utilizadas en este estudio a lugares nuevos, ya sea para reubicación o formación de grupos, se deberá tomar en cuenta que se necesitará de al menos un mes para que los niveles de cortisol fecal y de conductas de vigilancia recuperen su estado inicial.
- d) El cambio a un albergue de mayor tamaño y complejidad, tuvo un efecto positivo en cuanto a la disminución de las conductas estereotipadas y al aumento en las conductas de exploración, lo que se traduce en una mejoría del bienestar de los ejemplares estudiados.
- e) Es necesaria la evaluación conductual y hormonal a largo plazo de factores estresantes en animales silvestres mantenidos en cautiverio, ya que son fuente de información valiosa de los mecanismos que utilizan los animales para poder hacerles frente.

- f) El conocimiento de la relación entre respuestas fisiológicas y de conducta en caninos y felinos silvestres mantenidos en cautiverio, permite la utilización del monitoreo conductual como una herramienta no invasiva para la medición de forma indirecta de las respuestas a un evento estresante como es el cambio a un nuevo albergue.

6. REFERENCIAS

1. Bahr NI PR, Mohle JK, Heistermann M,. 2000. Comparative aspects of the metabolism of cortisol in three individual nonhuman primates. *Gen Comp. Endocrinol* 117:427-438.
2. Baker ML, Gemmell E, Gemmell RT. 1998. Physiological changes in brushtail possums, (*Trichosurus vulpecula*) transferred from the wild to captivity. *Journal of Experimental Zoology* 280(203-12).
3. Baker ML, Gemmell RT. 1999. Physiological changes in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) following relocation from Armidale to Brisbane, Australia. *Journal of Experimental Zoology* 284:42-49.
4. Barchas JD, Altemus M. 2000. Biochemical hypotheses of mood and anxiety disorders. In: Siegel JG AW, Albers RW, Fisher KS, Uhler DM,, editor. *Basic Neurochemistry, Molecular, Celular and Medical Aspects*. Sixth ed. London: Lippincott Williams & Wilkins. p 1074-1093.
5. Bedolla TA, Ulloa AA, Landeros VJ, Peres PG. 1984. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis: Guia para la evaluación de los resultados. *Revista de Investigación Clínica* 36:179-192.

6. Bekoff M. 1978. Coyotes : Biology, behavior, and management. New york: Academia Press.
7. Bokkenheuser VD MN, Ritchie EA, Holdeman VL, Winter J,. 1984. Biosynthesis of androgen from cortisol by a species of *Clostridium*, recovered from human fecal flora. The Journal of Infectious Diseases 149:489-494.
8. Broom D M. 2004. Bienestar animal. In: Galindo MF, Orihuela TA, editors. Etología aplicada. México.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. p 51-77.
9. Broom DM. 1988. The scientific assessment of animal welfare. Applied animal behavior science 20:5-19.
10. Broom DM, Johnson KG. 1993. Stress and animal welfare. London: Chapman and Hill.
11. Brousset D. 2003. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre el bienestar de tres especies de felinos mexicanos en peligro de extinción (ocelote, margay y jaguarundi) mantenidos en cautiverio [Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias Veterinarias)-UNAM]. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
12. Brown JL, Bonnie R, Schwartz R, Evans M, Hoyt R, Volk T, Wildt DE, Graham LH. Development and utility of fecal progesterone analysis to assess reproductive status in felids. Proceeding American Association of Zoo Veterinarians; 1993; USA. p 273-278.
13. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids measured noninvasively in feces. Biology of Reproduction 51:776-786.

14. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH, Montert SL. Fecal analysis for monitoring ovarian species. Proceeding of the first international symposium on physiology and ethology of wild and zoo animal; 1996a; Berlin, Germany. p 27-31.
15. Brown JL, Wildt DE. 1997. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive fecal steroid monitoring. International zoo year book 35:173-191.
16. Brown JL, Wildt DE, Wilebnowski N, Gooddrowe LH, Graham LH, Wells S, Howard JG. 1996b. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx Jubatus*) assessed by fecal steroids. Journal of Reproduction and Fertility 106:337-346.
17. Brownie AC. 1992. The metabolism of adrenal cortical steroids. In: James VHT, editor. The adrenal gland. 2nd ed. New York: Raven Press Ltd. p 209-224.
18. Campbell S. 1980. Is reintroduction a realistic goal? In: Soulé E, Wilcox BA, editors. In Conservation Biology An Evolutionary-Ecological Perspective: Sinauer Associates, Inc. p 263-269.
19. Campbell T, Lin S, DeVries C, Lambert K. 2005. Coping strategies in male and female rts exposed to multiple stressors. Physiology & Behavior 78:495-504.
20. Carlstead K. 1991. Husbandry of the fennec fox, *Fennecus zerda*: Enviromental conditions influencig sereotypic behavior. International zoo year book 30:202-207.

21. Carlstead K. 1996a. Effects of captivity on the behavior of wild mammals. In: Kleiman DG, Allen ME, Thompson KV, Lumpkin S, editors. Wild mammals in captivity: Chicago Press. p 317-333.
22. Carlstead K. 1996b. Effects of captivity on the behavior of wild mammals. In: Kleiman DG, Allen ME, Thompson KV, Lumpkin S, editors. Wild Mammals in Captivity Principles and Techniques. Chicago: The University of Chicago Press. p 317-333.
23. Carlstead K, Brown JL, Seidensticker j. 1993. Behavioural and adrenocortical responses to enviromental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). Zoo Biol 12:321-333.
24. Carlstead K, Seidensticker J. 1991. Seasonal variation in stereotypic pancing in black bear (*Ursus americanus*). Behavioural Processes 25:155-161.
25. Cerone-McLernon AM WJ, Mosbach EH, Bokkenheuser VD,. 1981. Side-chain cleavage of cortisol by fecal flora. Biochemica et Biophysica Acta 666:341-347.
26. Chrousos GP, McCarty R, Pacák K, Cizza G, Stenberg E, Gold WP, Kvetňaský R. 1995. Stress, Basic mechanisms and clinical implications. Annals of the New York academy of sciences 771.
27. Clark JD, Ranger RD, Calpin PJ. 1997. Animal Well-Being, II. Stress and Distress. Laboratory Animal Science 47:571-579.
28. Cuarón AD. 2004. Fuera de lugar, sobre la conservación ex situ. Especies 13:18-23.
29. Daniel W. 2002. Bioestadística : base para el análisis de las ciencias de la salud. 4a ed. Mexico: Limusa.

30. Dantzer R. 1991. Stress, stereotypes and welfare. *Behavioural Proceedings* 25:95-102.
31. Davidson GL. 2003. Darwin and the neural bases of emotion and affective style. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1000:316-336.
32. Dawkins M. 1990. From an animal's point of view: Motivation, fitness, and animal welfare. *Behavioural and Brain Sciences* 13:1-61.
33. Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKensy GI, Raab GM, Robard D, Rodgers RP. 1985. Guidelines for immunoassay data processing. *Clinical Chemistry* 31:1264-1271.
34. FAO. 1984. Laboratory training manual on RIA, in animal reproduction. Viena: National Atomic Energy Agency.
35. Faser AF, Broom D M. 1990. Farm animal behavior and welfare. London: Balliere Tindall.
36. Galindo MF. 2004. Bases sobre la medición del comportamiento. In: Galindo MF, Orihuela TA, editors. *Etología Aplicada*. México: UNAM FMVZ. p 355-375.
37. Gold WP, Licinio J, Wong M, Chrousos GP. 1995. CRH in the pathophysiology of melancholic and atypical depression and the action of antidepressant drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771:716-729.
38. Gomez O. 1994. Neotropical Cats Ecology and Conservation. Brasil: EDUFMA. Press of Universidade Federal do Maranhao.

39. Goyman W, Möstl E, Vant Holf T, East M L, Hofer H. 1999. Non-invasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas, *Crocuta crocuta*. *General compendium of endocrinology* 114:340-348.
40. Graham LH, Brown JL. 1996. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for noninvasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. *Zoo Biol* 15:71-82.
41. Greenberg N, Carr JA, Summers CH. 2002. Causes and consequences of stress. *Integ and Comp Biol* 42:508-516.
42. Gutierrez DM. 2004. Medición del comportamiento y cortisol fecal en oso negro (*Ursus americanus*), bajo diferentes condiciones ambientales. [Tesis Maestría (Maestría en ciencias de la producción animal)-UNAM]. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
43. Haile CN, GrandPre T, Kosten TA. 2001. Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology* 154:213-220.
44. Han A, Marandici A, Monder C. 1983. Metabolism of corticosterone in the mouse, identification of 11 β , 20 α -dihydroxy-3-oxo-4-pregnen-21-oic acid as a major metabolite. *J Biol Chem* 258:13703-13707.
45. Heinrich SP, Menzaghi F, Merlo PE, Britton KT, Koob GF. 1995. The role of CRH in behavioural aspect of stress. In: Chrousos GP, McCarty R, Pacák K, Cizza G, Stenberg E, Gold WP, Kvetňanský R, editors. *Stress Basic mechanisms and clinical implications*. New York: The New York Academy of Sciences.

46. Heinsbrock RO, Van Haaren R, Van de Poll NE. 1988. Sex differences in passive avoidance behavior in rats: sex-dependent susceptibility to shock-induced behavior depression. *Physiol Behav* 43:201-206.
47. Hernández MS. 2002. Determinación de estacionalidad reproductiva en ocelotes (*Leopardus pardalis*) hembras mantenidas en cautiverio por medio de RIA [Tesis de licenciatura]. México: Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia, UNAM.
48. Hill-J Makin. 1984. *Biochemistry of steroids hormones* 2nd ed. Greath Britain: Blackwell Scientist.
49. Hughes RN. 1997. Intrinsic exploration in animals: motives and measurement. *Behavioural Processes* 41:213-226.
50. Hutchins M, Smith B, Allard R. 2003. In defense of zoos and aquariums: the ethical basis for keeping wild animals in captivity. *JAVNA* 223:958-966.
51. INEGI. 1988. Cuaderno Estadístico Delegacional. Gustavo A Madero. México D.F.: INEGI.
52. INEGI. 1998. Cuaderno Estadístico Delegacional. Miguel Hidalgo. México D.F.: INEGI.
53. INEGI. 2003. Anuario Estadístico de Puebla. México: INEGI.
54. Kelley KW. 1985. Immunological consequences of changing environmental stimuli. *Animal stress*:193-223.
55. Kleiman DG. 1980. The sociobiology of captive propagation. In: Soulé E, Wilcox BA, editors. *Conservation Biology An Evolutionary-Ecological Perspective*: Sinauer Associates, Inc. p 243-261.

56. Koob GF. 1999. Corticotropin-releasing factor, norepinephrine and stress. *Biological Psychiatry* 46:1167-1180.
57. Koolhaas JM, Korte MS, De Boer SF, Van Der Vergt BJ, Van Reen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MA, Blokhuis HJ. 1999. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. *Neurosciences and Biobehavioral Review* 23:925-933.
58. Korte MS, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS. 2005. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostasis load and the trade-off in health and disease. *Neurosciences and Behavioral Review* 29:3-38.
59. Kreger MD MJ. 1995. Visitor-animal interactions at the zoo. *Anthrozoös* 8:143-158.
60. Kuehl RO. 2001. *Diseño de experimentos : principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. México: Thomson Learning.
61. Lupien SJ, McEwen BS. 1997. The acute effects of glucocorticoids on cognition: Integration of animal and human model studies. *Brain Research Review* 24:1-27.
62. Martin P, Bateson P. 1993. *Measuring behaviour. Measuring behaviour; an introductory guide* 2nd edition. London: Cambridge University Press. p 56-112.
63. Mason GJ. 1991. Stereotypies: a critical review. *Animal Behavior* 41:1015-1037.
64. McEwen BS. 1999. Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. In: Siegel JG AW, Albers RW, Fisher KS, Uhler DM,, editor. *Basic*

Neurochemistry Molecular, celular, and medical aspect. 6th ed. London: Lippincott Williams & Wilkins. p 1007-1026.

65. McEwen BS. 2002. Sex stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of Aging* 23:921-939.
66. McEwen BS, Albers D, Cameron H. 1995. Stress and the brain: A paradoxical role of adrenal steroids. *Vitam Hormon* 51:371-402.
67. McEwen BS, DeKloet R, Rostene W. 1986. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Phys Rev* 66:1121-1188.
68. McEwen BS, Sapolsky RM. 1995. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5:205-206.
69. McEwen BS, Wingfield JC. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior* 43:2-15.
70. Meikle WA. 1989. Secretion and metabolism of the corticosteroids and adrenal function and testing. In: DeGroot JL, editor. *Endocrinology*. 2nd ed. London: W. B. Saunders Comp. p 1610-1632.
71. Mellen JD. 1989. Reproductive behavior of small captive exotic cats [Doctor of Philosophy (Psychology)]. California: DAVIS.
72. Mellen JD. 1991. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis* spp.): a multiple regression analysis. *Zoo Biology* 10:95-110.
73. Michaelis T, Biurrun G, Walanabe T, Frahm J, Frauke O, Fusch E. 2000. Gender-specific alteration of cerebral metabolites with aging and cortisol treatment. *Journal of Psychiatric Research* 35:231-237.

74. Morais NR, Mucciolo GR, Gomes LFM, Lacerda O, Moraes W, Moreira N, Swanson FW, Brown LJ. Adrenal activity assessed by fecal corticoids and male reproductive traits in tree South American felid species. Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarian; 1997. p 220-223.
75. Morrison DF. 1990. Multivariate statistical methods, 3ed. New York: McGraw-Hill.
76. Ojeda CJ. 2002. Mediciones de conducta y cortisol fecal como indicadores no invasivos de bienestar en jaguares (*Panthera onca*), cautivos y silvestres. [Tesis Maestria (Maestria en ciencias de la producción animal)-UNAM]. México: UNAM.
77. Palme R, Robia C, Baumgartner W, Möstl E. 2000. Transport stress in cattle as reflected by an increase in fecal cortisol metabolites. Veterinary record 146:108-109.
78. Pifarré M. 2004. Efecto del público sobre comportamiento y cortisol fecal en Lobo Mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio. [Tesis Maestria (Maestria en Ciencias Veterinarias)-UNAM]. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
79. Pijlman FT, Herremans AH, Van de Kieft J, Kruse CG, Van Ree JM. 2003. Behavioural changes after different stress paradigms: prepulse inhibition increased after physical, but not emotional stress. Eur Neuropsychopharmacol 13:369-380.
80. Rendon FE. 2003. Determinación de esteroides reproductivos en heces de rinoceronte blanco del sur (*Ceratotherium simum simum*) [Tesis de licenciatura]. México: Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia, UNAM.

81. Rivera RA. 2003. Efecto del estres sobre la calidad del semen del lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio [Tesis Maestria (Maestria en Ciencias Veterinarias)-UNAM]. Mexico: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
82. Rodas MA. 2005. Estacionalidad en la función testicular de monos araña (*Ateles geoffroyi*) en condiciones de cautiverio en Catemaco Veracruz, México. [Tesis Maestria (Maestria en Ciencias Veterinarias)-UNAM]. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
83. Rushen J. 1993. The "coping" hypothesis of stereotypic behaviour. *Animal Behavior* 45:613-615.
84. Sapolsky RM. 1997. McEwen-induced modulation of endocrine history. *Stress* 2:1-11.
85. Sapolsky RM. 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57:925-935.
86. Sapolsky RM, Romero LM, Munk AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55-89.
87. Schatz S PR. 2001. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: A non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications* 25:271-287.
88. Schouten WG, Wiepkema PR. 1991. Coping styles of tethered sows. *Behavioral Proceedings* 25:125-132.

89. Schwasberg F, Möstl E, Palme R, Bamberg E. 1996. Fecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 42:515-526.
90. Senciall IR, Rahal S, Roberts 1992. 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* 41:151-160.
91. Servín J. 1991. Algunos aspectos de la conducta social del lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana* 45:1-43.
92. Shepherdson DJ. 1998. Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In: Shepherdson DJ, Mellen JD, Hutchins M, editors. *Second Nature: Smithsonian Institution Press*. p 1-2.
93. Shielle VM, Hagerty MA, Shaclenton C, Lasley BL. 1990. Metabolites of estradiol in serum bile intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 34:779-794.
94. Stander PE. 1992. Cooperative hunting in lions. The role of the individual Behavior. *Ecological Sociobiology* 29:445-454.
95. Stratakin CA, Chrousos GP. 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Stress, basic mechanism and clinical implications* 771:1-18.
96. Tennessen T. 1989. Coping with Confinement-Features of the Environment that Influence Animals' Ability to Adapt. *Applied Animal Behaviour Science* 22:139-149.

97. Terio KA, Citino SB, Brown JL. 1999. Fecal cortisol metabolite analysis for noninvasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 30(4):484-491.
98. Tizard I. 1992. Tolerancia y regulación del sistema inmunitario. In: Tizard I, editor. *Inmunología Veterinaria*. México: Interamericana McGraw-Hill. p 225-240.
99. Ugaz RC. 2004. Efecto de la suplementación alimenticia sobre la calidad seminal de los ocelotes (*Leopardus pardalis*), en cautiverio [Tesis Maestría (Maestría en Ciencias Veterinarias)-UNAM]. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
100. Ursin H, Olf M. 1993. Psychobiology of coping and defense strategies. *Neuropsychobiology* 28:66-71.
101. Vylitová M, Miksik I, Pácha J. 1998. Metabolism of corticosteron in mammalian and avian intestine. *Gen Comp Endocrinol* 109:315-324.
102. Wasser S K, Bevis K KG, Hanson E. 1997. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. *Conservation Biology* 11:1019-1022.
103. Wasser SK HK, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millsaugh JJ, Larson S, Monfort SL,. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Endocrinol* 120:260-275.
104. Wechsler B. 1995. Coping and coping strategies: a behavioural view. *Applied animal behavior science* 43:123-134.

105. Weinstock M. 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of HPA axis? *Neurosciences and Behavioral Review* 21:1-10.
106. Weinstock M, Poltyrev T, Schorer-Apelbaum D, Men D, McCarty R. 1998. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiol Behav* 64:439-444.
107. Whitten P L, Stavisky R, Aurell F, Russell E. 1998. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American journal of primatology* 44:57-69.
108. Wiepkema PR, Von Hellmond K, Roessing P, Romberg H. 1987. Behavioural abomasal damage in individual veal calves. *Applied animal behavior science* 18:257-268.
109. Wiese R, Hutchins M. 1994. *Species Survival Plans: Strategies for Wildlife Conservation*. Bethesda, Md: American Zoo and Aquarium Association.
110. Zambrano AZ, Díaz SV. 1996. *El radioinmunoanálisis y su control de calidad*. México: Centro nuclear de México Nabor Carrillo e Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.
111. Zanella AJ, Broom DM, Hunter J. Changes in opioid receptors of sows in relation to housing, inactivity and stereotypes. *Proceedings of the international society for veterinary ethology*. In: E SV, editor; 1991; Edinburgh. p 140-141.
112. Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Würbel H. 2001. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behavioural Brain Research* 121:11-20.

Figura 5a. Niveles promedio de cortisol en todos los grupos evaluados

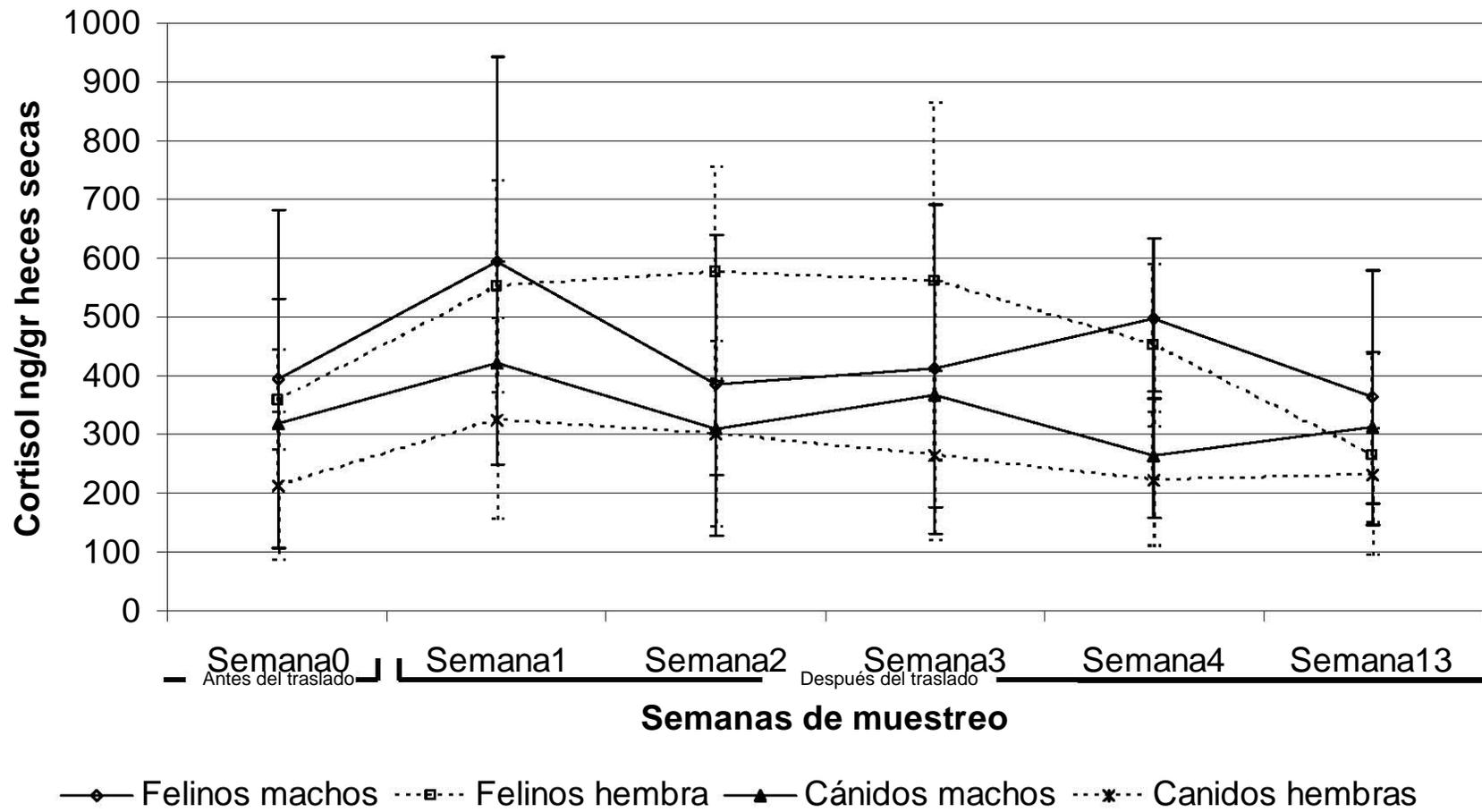


Figura 5b. Niveles de cortisol por grupo evaluado

Figura 5b.1. Niveles promedio de cortisol por grupo de felinos

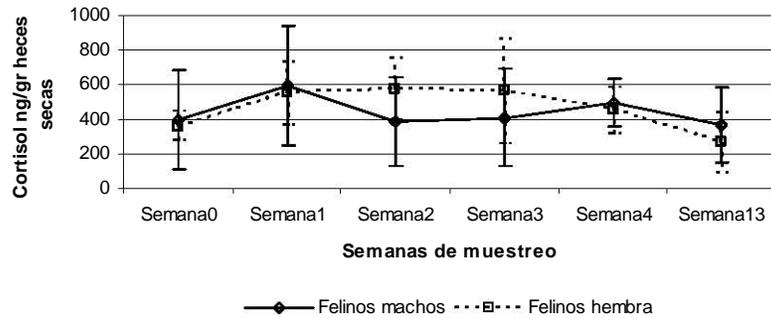


Figura 5b.2. Niveles promedio de cortisol por grupo de cánidos

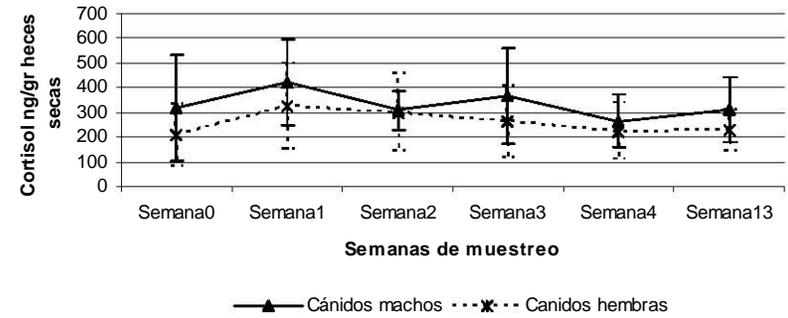


Figura 5b.3. Niveles promedio de cortisol por grupo de machos por familia

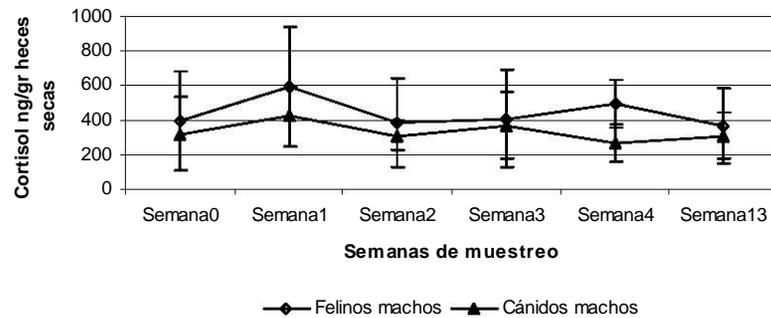


Figura 5b.4. Niveles promedio de cortisol por grupo de hembras por familia

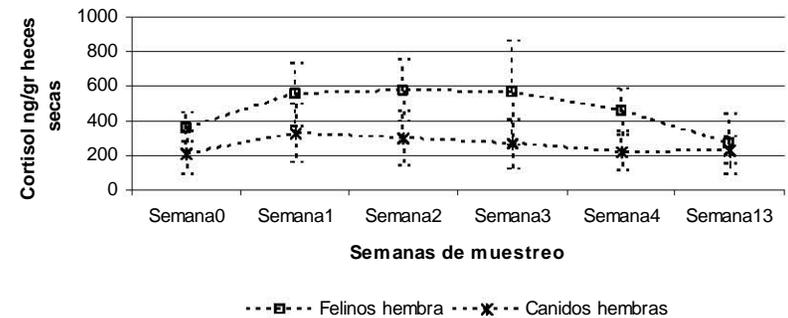


Figura 6a. Porcentaje promedio en vigilancia en todos los grupos evaluados

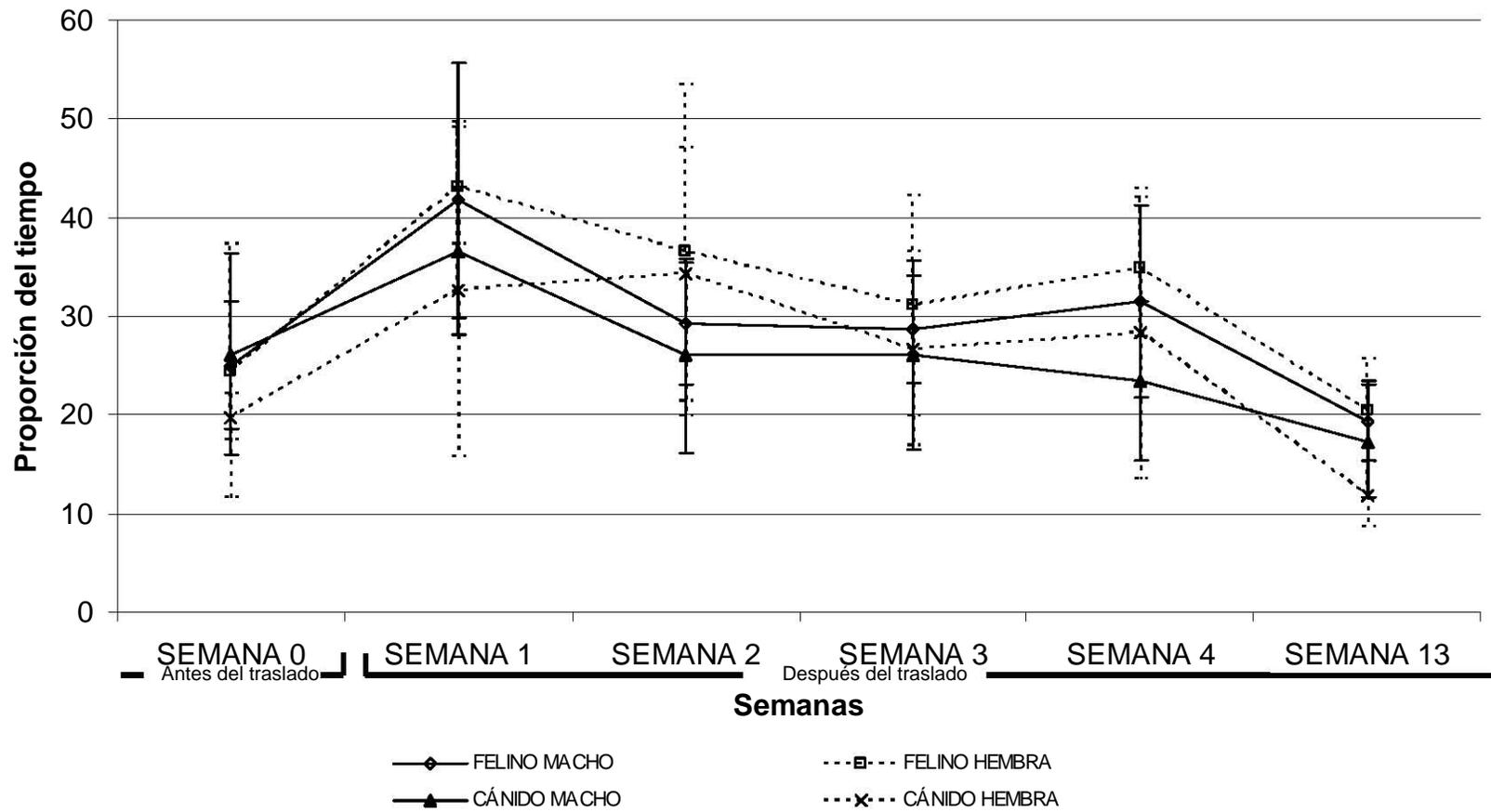


Figura 6b. Porcentaje promedio en vigilancia por grupo evaluado

Figura 6b.1. Porcentaje promedio en vigilancia en el grupo de felinos

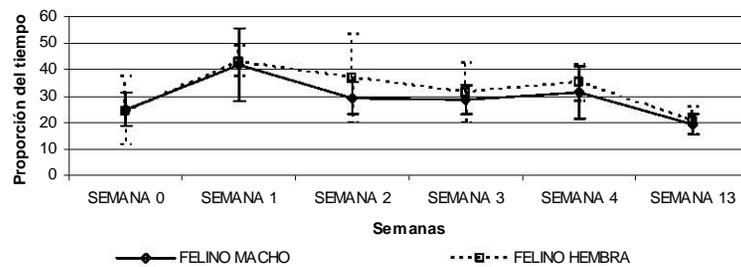


Figura 6.2. Porcentaje promedio en vigilancia en el grupo cánidos

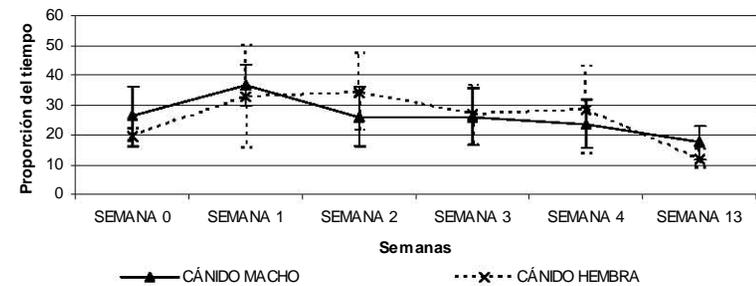


Figura 6.3. Porcentaje promedio en vigilancia en el grupo de machos por familia

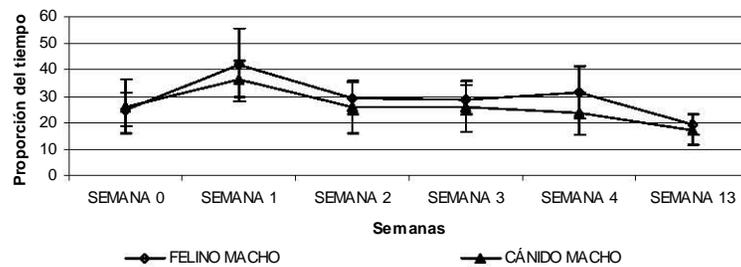


Figura 6.4. Porcentaje promedio en vigilancia en el grupo de hembras por familia

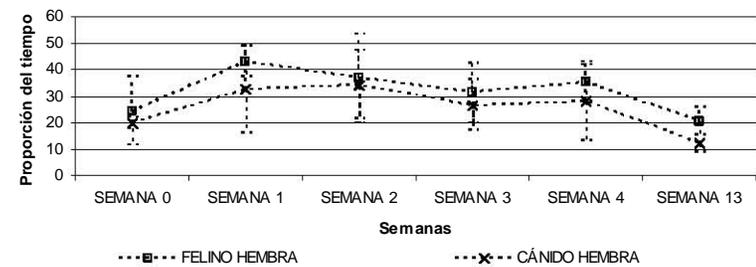


Figura 7a. Porcentaje promedio en descanso en todos los grupos evaluados

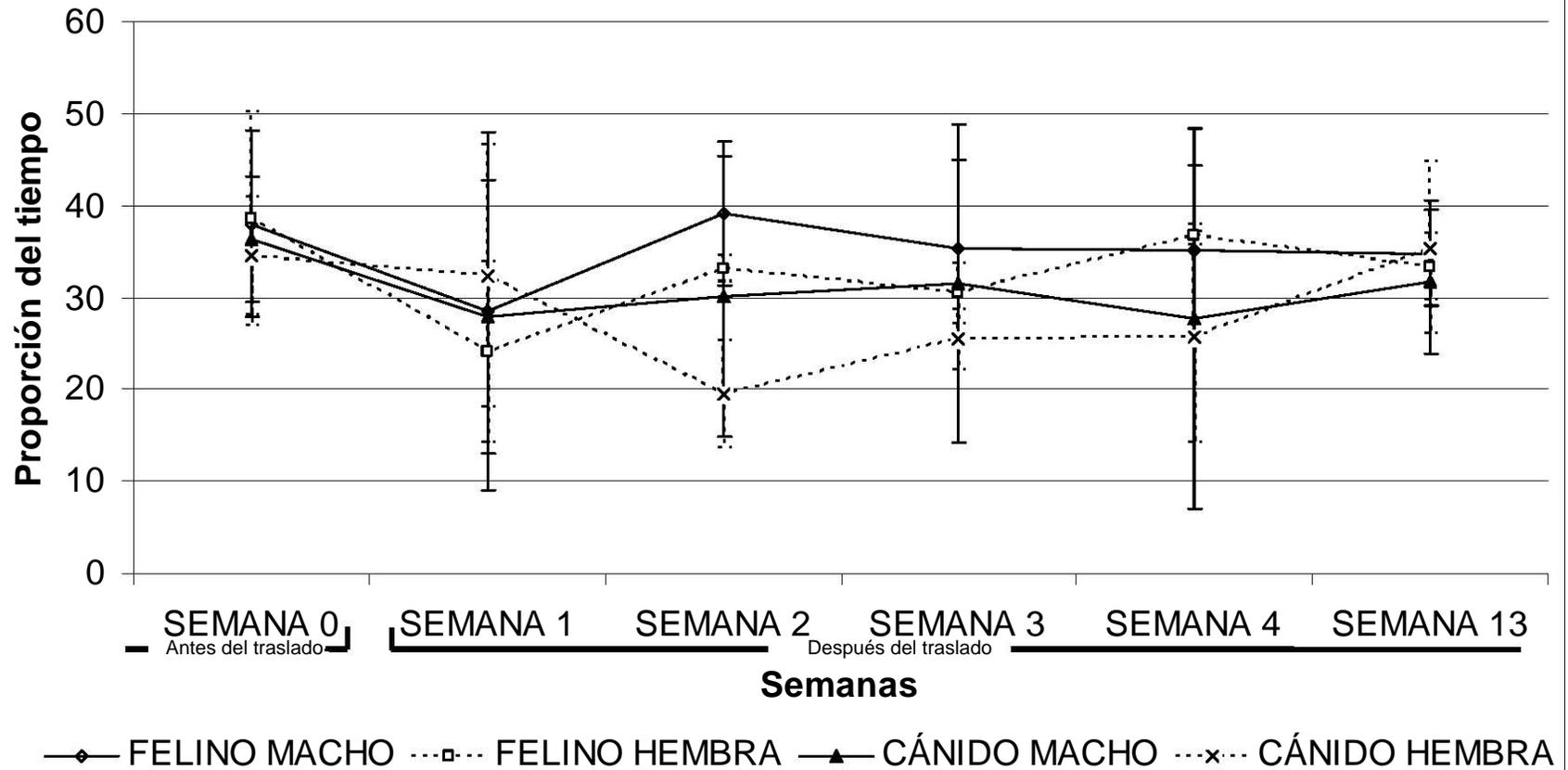


Figura 7b. Porcentaje promedio en descanso por grupo evaluado

Figura 7b.1. Porcentaje promedio en descanso en el grupo de felinos

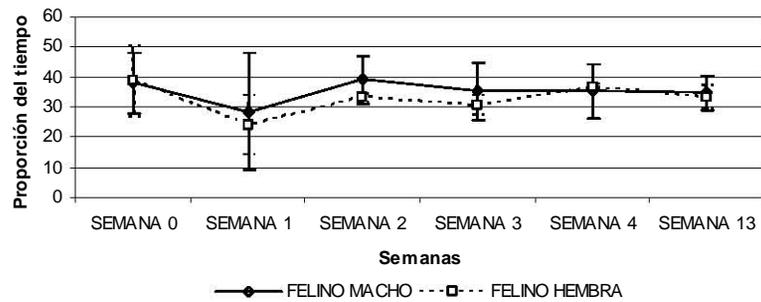


Figura 7b.2. Porcentaje promedio en descanso en el grupo cánidos

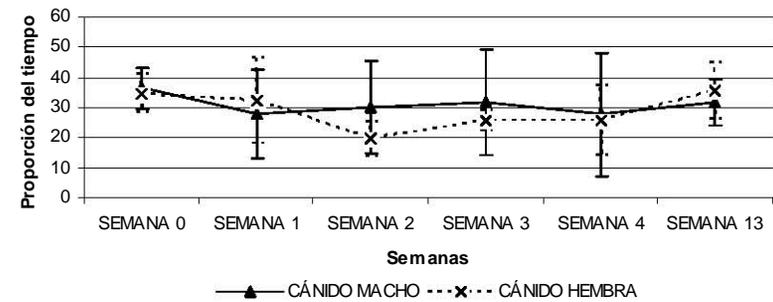


Figura 7b. Porcentaje promedio en descanso en el grupo de machos por familia

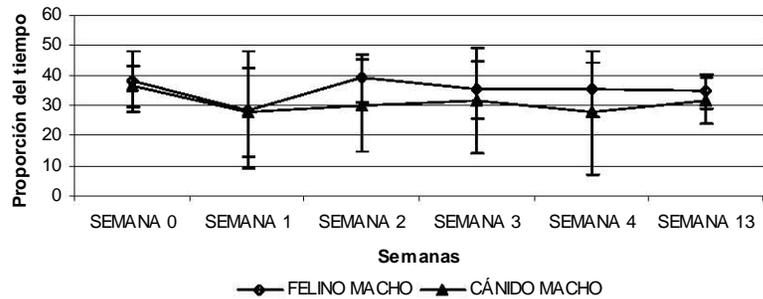


Figura 7b. Porcentaje promedio en descanso en el grupo de hembras por familia

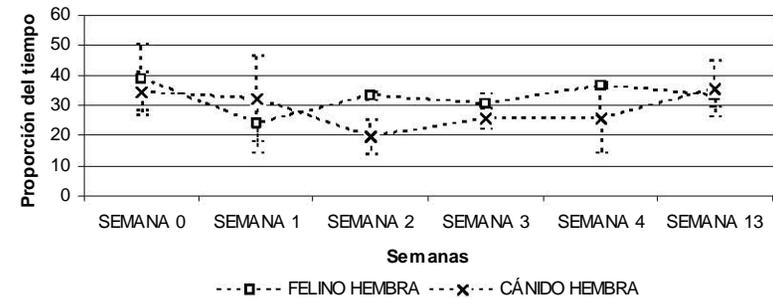


Figura 8a. Porcentaje promedio en locomoción estereotipada en todos los grupos evaluados

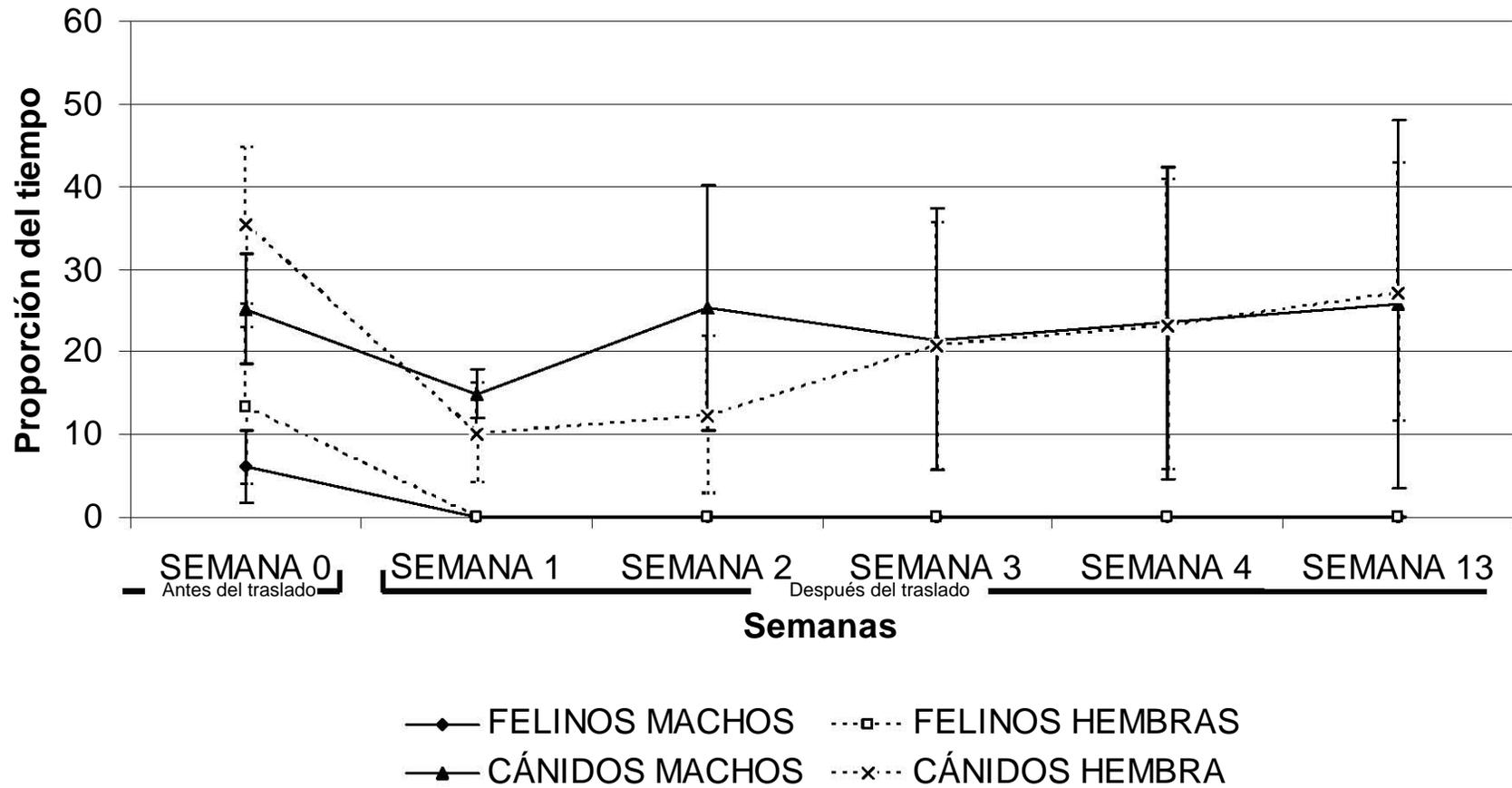


Figura 8b. Porcentaje promedio en locomoción estereotipada por grupo evaluado

Figura 8b.1. Porcentaje promedio en locomoción estereotipada en el grupo de felinos

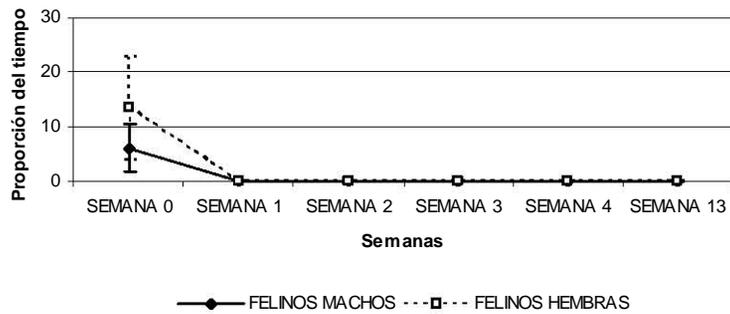


Figura 8b.2. Porcentaje promedio en locomoción estereotipada en el grupo cánidos

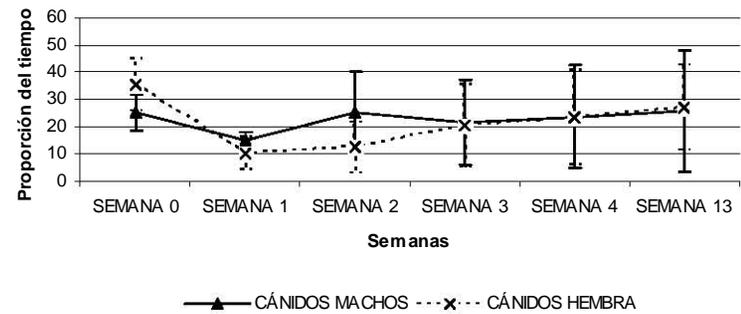


Figura 8b.3. Porcentaje promedio en locomoción estereotipada en el grupo de machos por familia

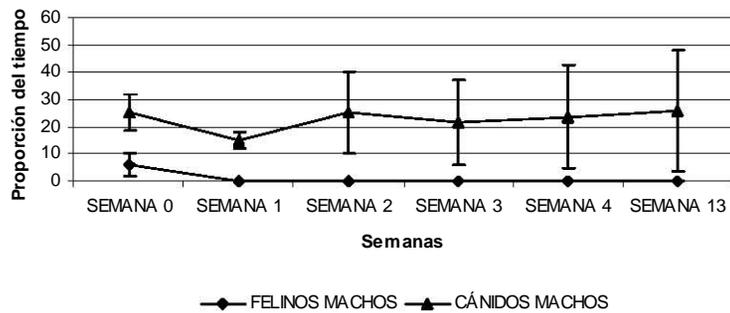


Figura 8b.4. Porcentaje promedio en locomoción estereotipada en el grupo de hembras por familia

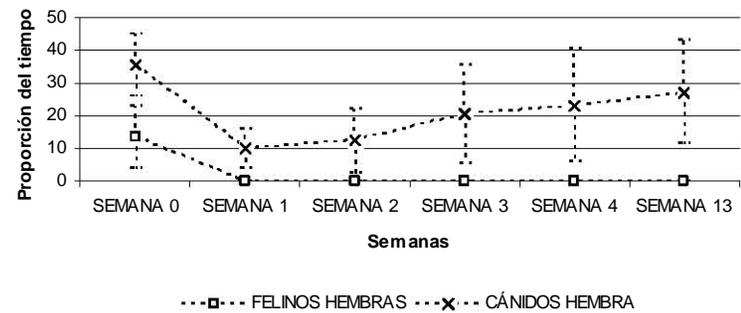


Figura 9a. Porcentaje promedio en exploración en todos los grupos evaluados

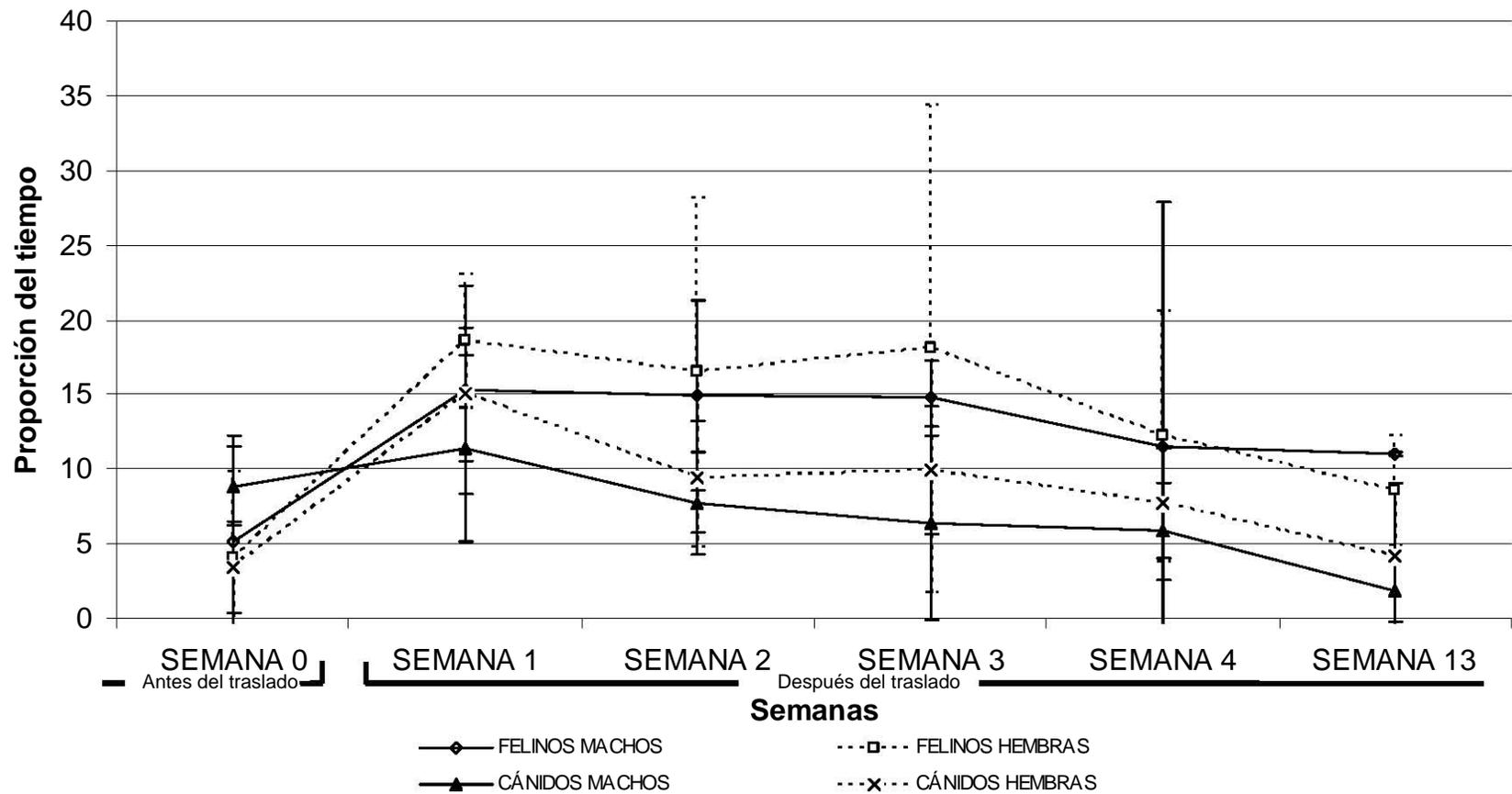


Figura 9b. Porcentaje promedio en exploración por grupo evaluado

Figura 9b.1. Porcentaje promedio en exploración en el grupo de felinos

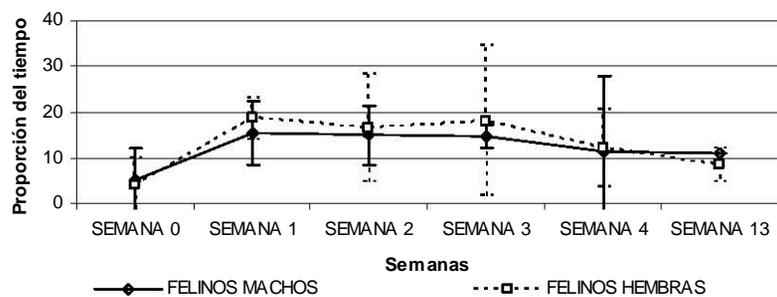


Figura 9b.2. Porcentaje promedio en exploración en el grupo de cánidos

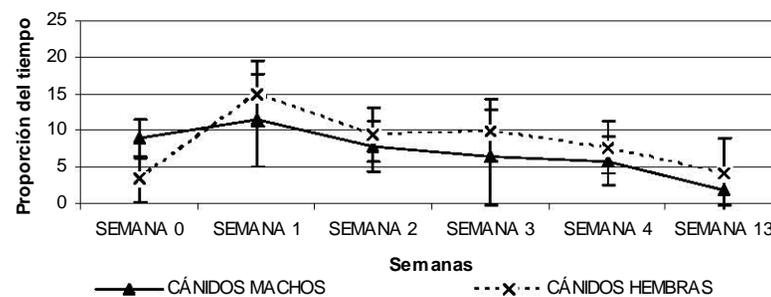


Figura 9b.3. Porcentaje promedio en exploración en el grupo de machos por familia

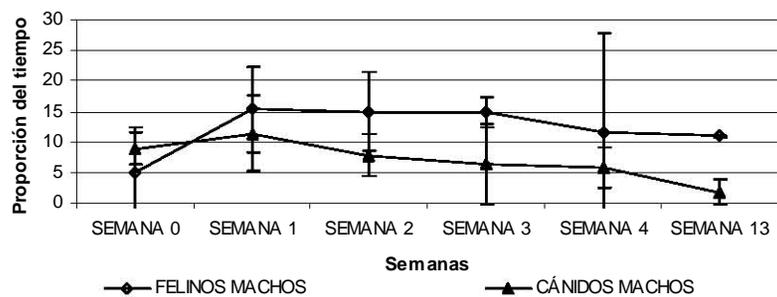


Figura 9b.4. Porcentaje promedio en exploración en el grupo de hembras por familia

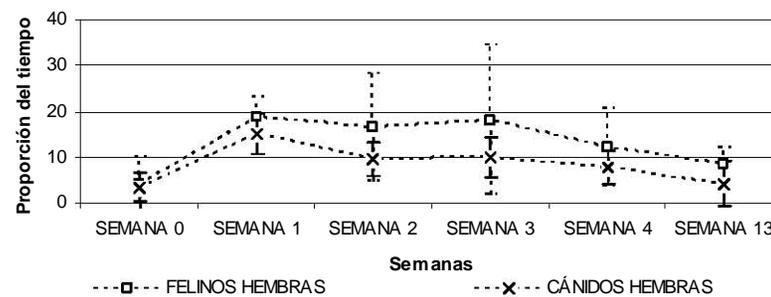


Figura 10a. Porcentaje promedio en locomoción en todos los grupos evaluados

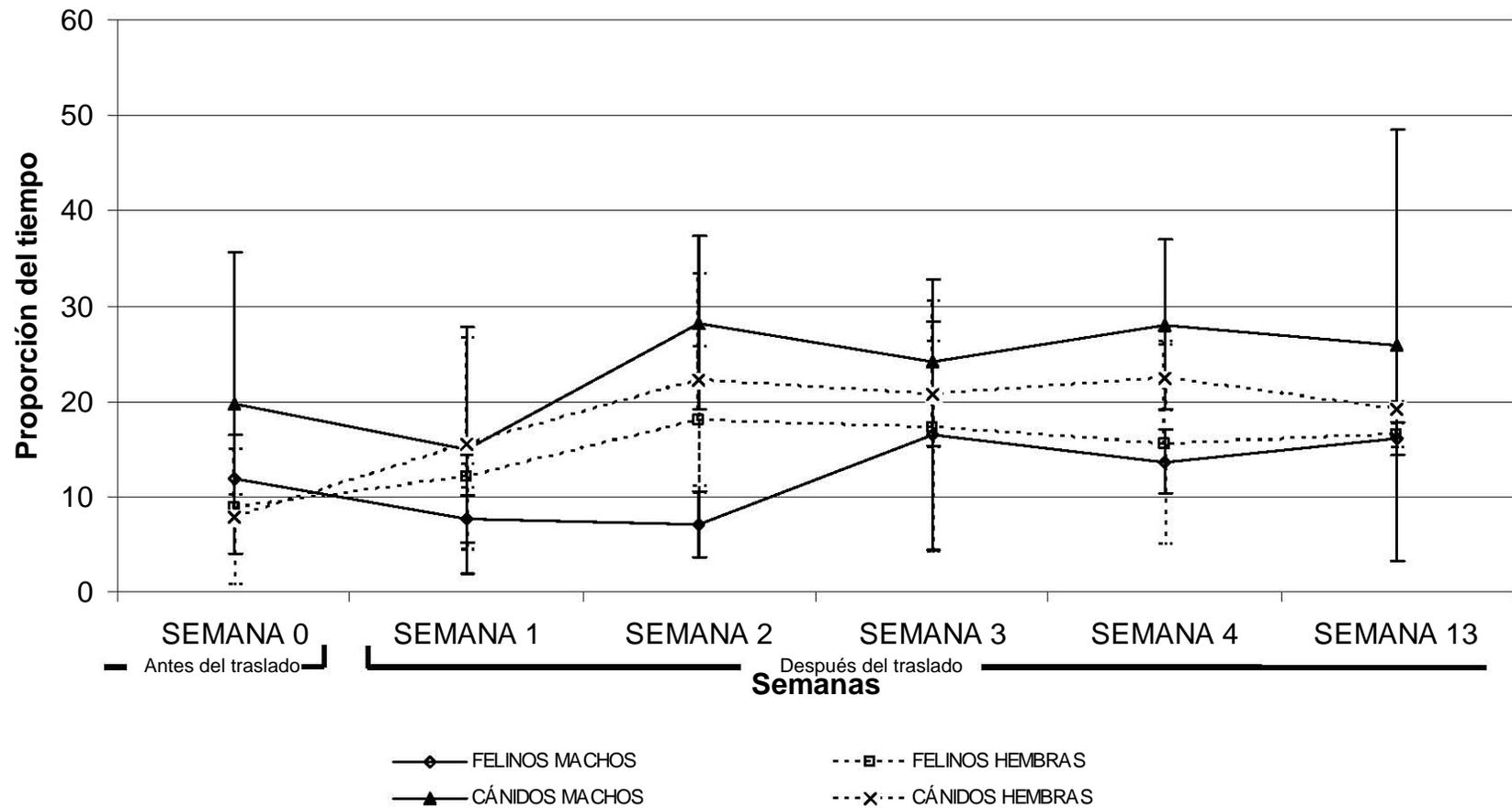


Figura 10b. Porcentaje promedio en locomoción por grupo evaluado

Figura 10b.1. Porcentaje promedio en locomoción en el grupo de felinos

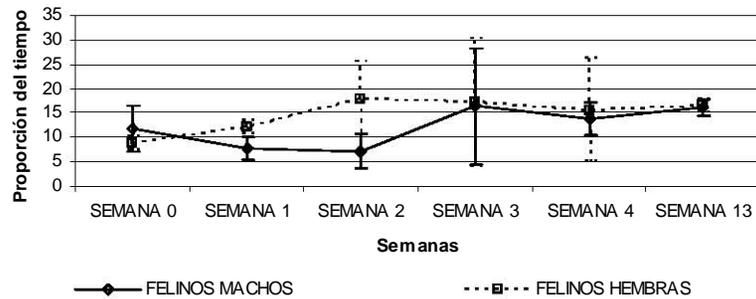


Figura 10b.2. Porcentaje promedio en locomoción en el grupo de cánidos

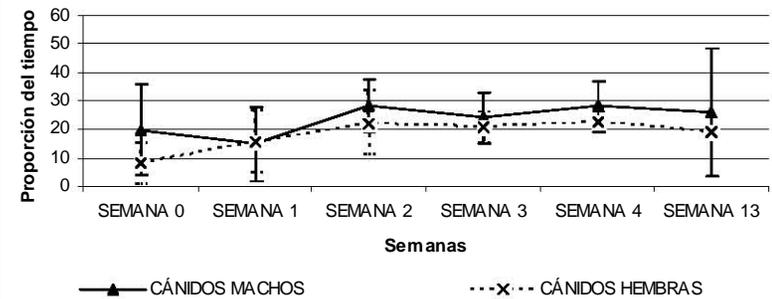


Figura 10b.3. Porcentaje promedio en locomoción en el grupo de machos por familia

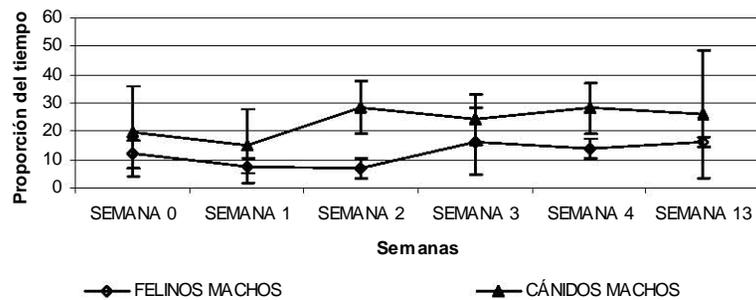
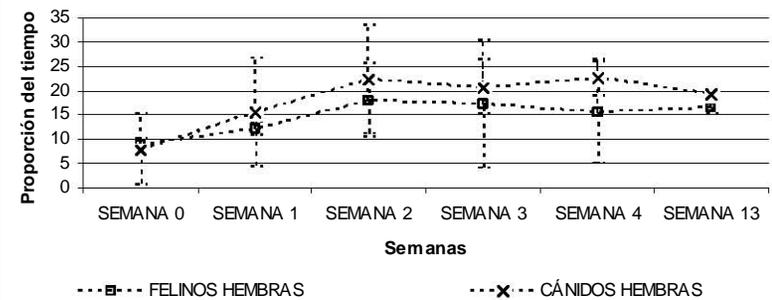


Figura 10b.4. Porcentaje promedio en locomoción en el grupo de hembras por familia



7.2.2. ETOGRAMA CANINOS (Lobos y Coyotes) (modificado de Bekoff M, 1978; Servín J, 1991; Rivera RJ, 2003).

CONDUCTA INDIVIDUAL.

- **LOCOMOCIÓN (LOC):** Cualquier movimiento para desplazarse con un fin determinado, estando el animal alerta. (Correr, Caminar, Trepar a troncos o paredes, Saltar de un lugar a otro, Trotar)
- **ESTEREOTIPIA DE LOCOMOCIÓN (EST):** Las estereotipias son patrones de conducta repetitiva, sin variación y sin una función u objetivo obvio. Corresponde a un recorrido específico en un área determinada.
- **DESCANSO (DSC):** Echado en decúbito lateral o esternal, con los ojos cerrados y sin prestar atención a lo que ocurre a su alrededor.
- **VIGILANCIA (VIG):** Cuando el animal permanece sentado (**VIG-s**), echado (**VIG-e**), parado (**VIG-est**), alerta con los ojos abiertos y prestando atención a lo que ocurre a su alrededor.
- **EXPLORACIÓN (EXP):** Actividades donde el animal muestra interés por lo que ocurre a su alrededor y realiza alguna acción de búsqueda como desplazarse olfateando, pararse o desplazarse atento en un solo punto, acecha o escarba.
- **CONSUMO (CONS):** Comer, beber, morder o masticar el pasto, relamerse con relación al consumo de agua o alimento.
- **CUIDADO CORPORAL (CORP):** Acicalarse con la lengua, rascarse, morder el pelo.
- **VOCALIZACIÓN (VOC):** Aullidos (VOC-au), gruñidos (VOC-gr), gañidos (VOC-gañ) giiigiii, ladridos (en coyotes)
- **CONDUCTA DE ELIMINACIÓN (ELIM):** Orinar, defecar.

7.2.1. ETOGRAMA FELINOS: OCELOTE, JAGUARUNDI Y MARGAY (modificado de Brousset D, 2003; Mellen JD, 1989 ; Stander PE, 1992).

CONDUCTA INDIVIDUAL.

- **LOCOMOCIÓN (LOC):** Cualquier movimiento para desplazarse con un fin determinado, estando el animal alerta. (Correr, Caminar, Trepar a troncos o paredes, Saltar de un lugar a otro, Trotar)
- **ESTEREOTIPIA DE LOCOMOCIÓN (EST):** Las estereotipias son patrones de conducta repetitiva, sin variación y sin una función u objetivo obvio. Corresponde a un recorrido específico en un área determinada.
- **DESCANSO (DSC):** Echado de decúbito lateral o esternal, con los ojos cerrados y sin prestar atención a lo que ocurre a su alrededor.
- **VIGILANCIA (VIG):** Cuando el animal permanece sentado (VIG-s), echado (VIG-e), parado (VIG-est), con los ojos abiertos y prestando atención a lo que ocurre a su alrededor.
- **EXPLORACIÓN (EXP):** Actividades donde el animal muestra interés por lo que ocurre a su alrededor y realiza alguna acción de búsqueda como olfateo, pararse atento, acechar.
- **CONSUMO (CONS):** Comer, beber, morder o masticar el pasto, relamerse con relación al consumo de agua o alimento.
- **CAIDADO CORPORAL (CORP):** Acicalarse con la lengua, afilarse las uñas, rascarse, morder el pelo.
- **VOCALIZACIÓN (VOC):** Gruñidos, maullidos.