



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Evaluación del bienestar del elefante asiático (*Elephas maximus*) y del rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*) en cautividad a través del cortisol salivar

María de la Asunción Menargues Marcilla



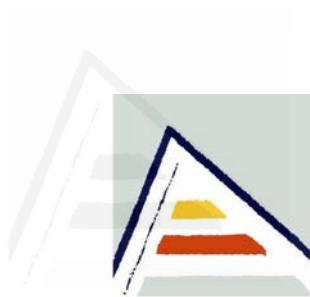
Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE

**Evaluación del bienestar del
elefante asiático (*Elephas maximus*) y del
rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*)
en cautividad a través del cortisol salivar**



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

María de la Asunción Menargues Marcilla
Instituto Universitario de Investigación CIBIO
Universidad de Alicante, 2011

*A mi marido, a mi niña
y muy en especial
a mis padres.*



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

*“Sólo dos legados podemos
dejar a nuestros hijos:
uno, raíces; otro, alas”*

Hodding Carter



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Instituto Universitario de Investigación CIBIO

Universidad de Alicante, 2011

**Evaluación del bienestar del
elefante asiático (*Elephas maximus*) y del
rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*)
en cautividad a través del cortisol salivar**

Tesis presentada por María de la Asunción Menargues Marcilla
para optar al grado de Doctora en Biología

María de la Asunción Menargues Marcilla

Alicante, 2011

Tesis presentada por Dña. MARÍA DE LA ASUNCIÓN MENARGUES
MARCILLA para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de
Alicante.

Fdo.: María de la Asunción Menargues Marcilla

Director: Dr. VICENTE URIOS MOLINER



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Fdo.: Dr. Vicente Urios Moliner

Profesor Contratado Doctor
Universidad de Alicante

ÍNDICE

ÍNICE DE TABLAS Y FIGURAS.	iii
SÍNTESIS GENERAL.	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.	13
MÉTODOLOGÍA GENERAL.	57
SECCIÓN I – VALIDACIÓN DEL MÉTODO Y EVALUACIÓN DEL BIENESTAR EN EL ELEFANTE ASIÁTICO Y EL RINOCERONTE INDIO.	69
<i>Capítulo I. Welfare assessment through salivary cortisol measurement in captive Asian elephants and Indian rhinoceros during zoo opening period.</i>	<i>71</i>
<i>Capítulo II. Assessing the effect of external and internal stressors on captive Asian elephants (Elephas maximus) welfare.</i>	<i>95</i>
SECCIÓN II - ESTUDIO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS Y CIRCANUALES DE SECRECIÓN DE CORTISOL EN ELEFANTE ASIÁTICO Y DEL RINOCERONTE INDIO.	123
<i>Capítulo III. Diurnal salivary cortisol secretion in Asian elephant (Elephas maximus) as an interpretation tool in animal welfare assessment.</i>	<i>125</i>
<i>Capítulo VI Seasonal pattern of salivary cortisol secretion in Greater one- horned rhino (Rhinoceros unicornis).</i>	<i>139</i>
<i>Capítulo V. Seasonal rhythms of salivary cortisol secretion in Asian elephants (Elephas maximus).</i>	<i>159</i>

DISCUSIÓN GENERAL.	179
CONCLUSIONES GENERALES.	197
REFERENCIAS.	201
AGRADECIMIENTOS.	217



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INRODUCCIÓN GENERAL.

Figura 1. Las tres fases del Síndrome de Adaptación General.	20
Tabla 1. Adaptación Comportamental y Física durante Estrés Agudo.	23
Figura 2. Eje hipotalámico-pituitario-adrenal.	27
Tabla 2: Proporción de metabolitos de cortisol eliminados por orina y heces tras la inoculación de cortisol marcado radiactivamente.	33
Figura 3. Elefante asiático en Terra Natura.	46
Figura 4. Distribución actual del elefante asiático.	48
Tabla 3. Estimaciones publicadas de la población de elefante asiático salvaje total.	50
Tabla 4. Estatus de la población del elefante asiático en 2003.	51
Figura 5. Rinoceronte indio en Terra Natura.	52
Figura 6. Distribución actual del rinoceronte indio.	54

METODOLOGÍA GENERAL

Figura 1. Pradera de los elefantes asiáticos en Terra Natura.	60
Figura 2. Pradera de los rinocerontes indios en Terra Natura.	61

CAPÍTULO 1

Figura 1a. Mean salivary cortisol concentration during pre-opening, opening and post-opening period in Asian elephants.	81
Figura 1b. Mean salivary cortisol concentration during pre-opening, opening and post-opening period in Indian rhinoceros.	81

Tabla 1. Means of salivary cortisol of all Asian elephant and Indian rhinoceros individuals during the zoo pre-opening, opening and post-opening periods.	82
Figura 2. Means of cortisol concentration during pre-opening, opening and post-opening period.	83

CAPÍTULO 2

Figura 1. Mean monthly salivary cortisol concentration of two Asian elephants before and after training activities.	107
Tabla 1. Mean monthly salivary cortisol concentration of eight elephants from April to June 2006.	108
Tabla 2. Bonferroni multiple post-hoc comparison tests of salivary cortisol concentration among months.	108
Tabla 3. Differences on mean salivary cortisol concentration between May 2005 and May 2006 for six of the eight elephants which were at zoo in both months.	108
Figura 2. Mean monthly salivary cortisol concentration of eight Asian elephants in April, May and June 2006.	109
Tabla 4. Bonferroni multiple post-hoc comparison tests of salivary cortisol level between elephants during the study period.	110
Figura 3. Mean monthly concentration of salivary cortisol of eight Asian elephants from January to July 2006.	111

CAPÍTULO 3

Figura 1. Differences in mean values of salivary cortisol concentration of three Asian elephant between morning and evening.	132
--	-----

CAPÍTULO 4

Figura 1. Mean monthly salivary cortisol concentration of two Indian rhinoceroses during a whole year.	147
Tabla 1. Mean monthly salivary cortisol concentration of two India rhinos from August 2005 to July 2006.	148
Tabla 2. Games-Howell post-hoc multiple comparison test between months of mean salivary cortisol concentration of two Indian Rhinoceroses.	149

CAPÍTULO 5

Figura 1. Mean monthly concentration of salivary cortisol of eight Asian elephants from August 2005 to July 2006.	167
Tabla 1. Monthly means of salivary cortisol concentration of eight elephants from August 2005 to July 2006.	168
Figura 2. Mean monthly salivary cortisol concentration of eight Asian elephants during a year.	169
Tabla 2. Games-Howell post-hoc multiple comparisons test between months of mean salivary cortisol concentration of two Indian Rhinoceroses.	170



Síntesis general

Síntesis de la Tesis Doctoral:
Evaluación del bienestar del
Elefante Asiático (*Elephas maximus*)
y del Rinoceronte Indio (*Rhinoceros unicornis*)
en cautividad a través del cortisol salivar.

Uno de los objetivos más importantes de los parques zoológicos es mantener el bienestar tanto físico como psicológico de sus animales. Cambios bruscos en el entorno del animal o prácticas de manejo inadecuadas pueden resultarles estresantes. El estrés se define como una variedad de respuestas ante unos estímulos externos o internos que pueden modificar la homeostasis de un individuo. Los seres vivos han desarrollado un sistema fisiológico para poder amortiguar las condiciones ambientales adversas y restablecer la balanza. Tras la exposición de un organismo a un estímulo estresante, el eje hipotálamo-pituitario-adrenal se activa, liberándose glucocorticoides al torrente sanguíneo por parte de la corteza adrenal. La evaluación del nivel de estrés de los animales un componente importante desde que se conoce que los niveles elevados glucocorticoides pueden afectar negativamente tanto al comportamiento como a la función reproductiva. Además, la secreción de cortisol no es continua a lo largo del día y del año. Existen variaciones en la concentración de cortisol que fluctúan diaria y estacionalmente y el conocimiento de estas variaciones es necesario cuando queremos evaluar el significado fisiológico de la concentración hormonal que estamos evaluando en un momento puntual.

El cortisol salivar ha sido empleado para evaluar el bienestar de animales en cautividad en diferentes especies. En el elefante asiático y el rinoceronte indio, el cortisol es el glucocorticoide principal producido por la corteza adrenal

pudiéndose detectar elevaciones rápidas de esta hormona en la saliva de estos animales. La presente tesis estudia la medición del bienestar animal mediante el análisis del cortisol salivar como herramienta en el manejo de elefantes asiáticos y rinocerontes indios en parques zoológicos, para conocer y mejorar las condiciones de cautividad de estos animales con el fin de mejorar su bienestar.

¿Por qué se han escogido estas dos especies? El elefante asiático y el rinoceronte indio están clasificados como especies amenazada y vulnerable (respectivamente) en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) y las poblaciones cautivas en Europa de ambas especies están sujetas al Programa Europeo de Cría en Cautividad (EEP), el cual pretende construir una población autosostenible de elefantes asiáticos y rinocerontes indios en los zoológicos europeos. En la actualidad, se estima que la población total de elefantes asiáticos oscila entre 40.000 y 50.000 comprendidos en Asia occidental a lo largo de la costa iraní adentrándose en India y extendiéndose hacia el Sureste del continente asiático incluyendo Sumatra, Java y Borneo y China hasta el río Yantse-Kiang en una extensión total de nueve millones de kilómetros cuadrados. El rinoceronte indio estuvo al borde de la extinción a principios del siglo XX llegando a contar con tan sólo 200 ejemplares. En la actualidad la especie se está recuperando siendo el número total de ejemplares de entre 2800 y 2850 individuos encontrándose en su mayoría en los parques nacionales de Kaziranga y Manas, en la provincia india de Asma y en el Parque Nacional Real de Chitawan en Nepal.

Esta tesis está dividida en dos secciones en las que cada una aborda diferentes aspectos en lo que se refiere al empleo de esta técnica no invasiva de medición de estrés. La primera sección aborda la puesta a punto de esta metodología validándola para estas dos especies y estudiando cómo afectan diversos estímulos estresantes al bienestar de estos animales, como la apertura de

un parque zoológico en el bienestar de los rinocerontes indios y los elefantes asiáticos, el entrenamiento realizado con una pareja de elefantes destinado a la realización de una demostración biológica a los visitantes del parque zoológico, la introducción de un nuevo grupo de elefantes en una manada ya establecida y el efecto de una parálisis irreversible en la trompa de un elefante sobre el bienestar del individuo que la padece.

La segunda sección de la tesis estudia los patrones circadianos de secreción del cortisol salivar en los elefantes asiáticos del parque zoológico y los ritmos estacionales de secreción de esta hormona en las dos especies ya que hasta la fecha, no había sido descrita.

Objetivo general de la tesis es determinar un medio de análisis objetivo del bienestar del elefante asiático y el rinoceronte indio mediante el análisis de la concentración de cortisol salivar.

Objetivos específicos son:

- Validar el método de análisis de cortisol salivar mediante RIA en el elefante asiático y el rinoceronte indio.
- Establecer el patrón de secreción estacional de cortisol en el elefante asiático y el rinoceronte indio, y el patrón circadiano de secreción de esta hormona del elefante asiático para poder conocer y evaluar el significado fisiológico de las fluctuaciones de esta hormona a lo largo del día y del año con el fin de interpretar los datos de cortisol obtenidos de los individuos en la evaluación de bienestar de esta especie.

-

- Evaluar cómo afectan diferentes estresores externos e internos de distinta naturaleza al bienestar de los elefantes con el fin de determinar el efecto de estos agentes sobre el bienestar de esta especie para tomar decisiones en el manejo de esta especie que mejoren su bienestar.

SECCIÓN I. Validación del método de análisis de cortisol salivar en elefante asiático y efecto de distintos agentes estresantes en el bienestar de estas especies.

Capítulo 1: Menargues A, Urios V, Mauri M 2008 Welfare assessment through salivary cortisol measurement in captive Asian elephants and Indian rhinoceros during zoo opening period. *Animal Welfare* 17, 305-312.

La medida del cortisol salivar permite evaluar de modo no invasivo el bienestar de los animales en cautividad. Se utilizó esta técnica para testar el efecto de la apertura de un parque zoológico en seis elefantes asiáticos y dos rinocerontes indios en el parque zoológico Terra Natura (Alicante, España) durante los periodos de preapertura, apertura y postapertura, validando el método para estas especies en primer lugar. Se encontró una concentración de cortisol salivar significativamente más alta durante el periodo de apertura que durante los periodos de pre- y postapertura en ambas especies. Este método puede resultar una herramienta útil para evaluar el éxito de las decisiones tomadas para proporcionar bienestar a los animales en cautividad.

Capítulo 2: Menargues A, Urios V, Limiñana R. Assessing the effect of external and internal stressors on captive Asian elephants (*Elephas maximus*) welfare. R *Applied Animal Behaviour Science*, en revisión.

Los animales de los parques zoológicos están frecuentemente expuestos a diferentes estímulos externos e internos que pueden afectar a su bienestar. Un estrés psicológico prolongado puede llevar a que los sistemas fisiológicos comprendidos entre el cerebro y el organismo fluctúen ante las demandas externas e internas, las cuales pueden causar una mala adaptación que pueda llevar a un deterioro del organismo. El cortisol salivar ha sido utilizado recientemente para evaluar el bienestar de animales cautivos y en libertad. Esta investigación estudia cómo afectan al nivel de cortisol salivar de unos elefantes asiáticos dos estresores externos (el entrenamiento en una pareja de elefantes destinado a la realización de un espectáculo y la llegada de un nuevo grupo de elefantes a una manada ya establecida) y un estresor interno (la parálisis irreversible en la trompa de un elefante). En el primer caso, el entrenamiento tuvo un efecto en el nivel de cortisol de los dos elefantes estudiados, siendo la concentración de cortisol significativamente más elevada después de entrenar comparada con la que tenían ambos individuos antes de comenzar el entrenamiento. En el segundo caso, la llegada de un nuevo grupo de individuos a una manada de elefantes ya establecida produjo un incremento en la concentración de cortisol en todos los elefantes de la manada comparándola con la que tenían antes de la llegada del grupo. El nivel de cortisol disminuyó durante el mes siguiente al mes de la llegada de los nuevos individuos, probablemente debido a que los animales se habituaron a los nuevos componentes de la manada. En el tercer caso, la parálisis irreversible en trompa del elefante estudiado resultó ser un agente estresante interno crónico y el elefante discapacitado tuvo un nivel de cortisol significativamente más elevado que el resto de los individuos sanos de la manada durante todo el periodo de estudio. Los estresores internos y externos

evaluados en este estudio incrementaron significativamente la concentración de cortisol salivar de los individuos, generando un impacto negativo en el bienestar de los elefantes. Es necesario el conocimiento de cómo pueden afectar diferentes agentes estresantes al nivel de estrés de los animales en cautividad para la toma de decisiones de manejo para mantener su bienestar.

SECCIÓN II - DESCRIPCIÓN DEL PATRÓN DE SECRECIÓN DE CORTISOL SALIVAR CIRCADIANO Y CIRCANUAL DEL ELEFANTE ASIÁTICO Y DEL RINOCERONTE INDIO.

Capítulo 3. Menargues A, Urios V, Limiñana R, Mauri M. Diurnal salivary cortisol secretion in Asian elephant (*Elephas maximus*) as an interpretation tool in animal welfare assessment. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. En revisión.

La concentración de cortisol salivar es un indicador del bienestar de los animales. Es muy importante definir los patrones de secreción de esta hormona para poder interpretar correctamente las medidas de cortisol obtenidas para la evaluación del bienestar de los animales en cautividad a través del cortisol salivar. Para evaluar esto, se tomaron muestras de saliva a primera hora de la mañana y a última hora de la tarde de tres elefantes asiáticos. Las muestras fueron analizadas mediante radioinmunoanálisis para comprobar si había diferencias significativas entre la concentración de cortisol del amanecer y la del anochecer. Se encontraron niveles de cortisol significativamente más altos en las muestras de primera hora de la mañana que en las de última hora de la tarde en todos los individuos. Estos resultados mostraron que el cortisol salivar del elefante asiático sigue un patrón diurno de secreción de cortisol, que ha de ser tenido en cuenta cuando se utilice esta metodología para evaluar el bienestar de los animales en cautividad de esta especie.

Capítulo 4. Menargues A, Urios V, Limiñana R. Seasonal pattern of salivary cortisol secretion in Greater one-horned rhino (*Rhinoceros unicornis*). *Journal of Endocrinology*, en revisión.

El rinoceronte indio está clasificado como especie vulnerable en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN y está sujeta al Programa Europeo de Cría en Captividad desde 1990. Garantizar el bienestar de esta especie en cautividad es necesario para mejorar el éxito de los programas de cría. El cortisol salivar ha sido utilizado recientemente para evaluar el bienestar de animales cautivos y en libertad. Sin embargo, los ritmos de secreción de cortisol pueden fluctuar a lo largo del año y, por ello, es necesario conocer el patrón circanual de secreción de cortisol para evaluar el significado fisiológico de las variaciones estacionales de los niveles de cortisol como indicador de estrés en los animales. Esta investigación analiza las diferencias mensuales en la secreción de cortisol salivar en el rinoceronte indio. Para ello, se tomaron muestras de saliva de dos hembras de esta especie a la misma hora durante un año completo y se analizaron mediante radioinmunoanálisis para determinar la concentración de cortisol. Los resultados obtenidos revelaron un patrón estacional de secreción de cortisol salivar. Los niveles más altos de cortisol se encontraron en Agosto desde donde comenzaron a disminuir hasta alcanzar la concentración más baja en enero (hemisferio norte). Además, los niveles más altos de esta hormona se registraron en los meses con las temperaturas más elevadas, los cuales también coincidían con la mayor afluencia de visitantes al parque zoológico. Sin embargo, no podemos descartar algún mecanismo endógeno que controle la secreción de cortisol estacional observada en este estudio. Estos resultados indican que la variación anual de secreción de cortisol ha de ser tomada en cuenta en el empleo del cortisol como herramienta para evaluar el bienestar animal de los animales en

los parques zoológicos, así como que también abren nuevas preguntas en el análisis de estos patrones.

Capítulo 5. **Menargues A, Urios V, Limiñana R.** Seasonal rhythms of salivary cortisol secretion in Asian elephants (*Elephas maximus*). *General and Comparative Endocrinology*, en revisión

El cortisol salivar ha sido empleado recientemente para evaluar el bienestar de animales en cautividad. Sin embargo, los ritmos de secreción de cortisol pueden variar anualmente y por eso es necesario conocer las fluctuaciones anuales para poder evaluar el significado fisiológico de las variaciones de esta hormona a lo largo del año como indicador de estrés en los animales. En este estudio se analizan las diferencias mensuales de la secreción de cortisol en el elefante asiático. Para ello, se tomaron muestras diarias de saliva de ocho hembras de elefante durante un año completo y se analizaron mediante radioinmunoensayo. Los resultados obtenidos revelaron un patrón estacional de secreción de cortisol salivar y se encontraron diferencias significativas entre los meses en la concentración de esta hormona. El nivel más elevado de cortisol se encontró en octubre, desde donde comenzó a descender hasta llegar a la concentración más baja que tuvo lugar en abril, desde donde comenzó a aumentar de nuevo. La media mensual de concentración de cortisol presentó una correlación positiva con los valores medios mensuales de los individuos en seis de los ocho elefantes estudiados. Estos resultados indicaron que la variación anual de secreción de cortisol ha de tenerse en cuenta cuando se emplee la medición de concentración de cortisol como herramienta para evaluar el bienestar de los animales en cautividad. También quedan en el aire cuestiones de cómo funciona el mecanismo endógeno de regulación de la secreción de cortisol anual en esta especie.

El método de análisis de concentración de cortisol salivar desarrollado en esta tesis doctoral es un método no invasivo, objetivo y fiable en la evaluación del bienestar de los elefantes asiáticos y de los rinocerontes indios que permite conocer el nivel de estrés de estos animales siendo una herramienta necesaria para la toma de decisiones en el manejo de estas especies en un parque zoológico. Este método de detección del bienestar a través del cortisol salivar es una técnica desconocida para la mayoría de los gerentes de parques zoológicos y sería interesante difundirlo para que pudiera ser empleado en la evaluación del nivel de estrés de los animales de estos centros para que, mediante su conocimiento, se pudiera asegurar el bienestar de sus animales.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Introducción general

0 ANTECEDENTES

La relación de la especie humana con los animales se ha dado a lo largo de toda su historia. Las distintas culturas han ido haciendo uso de diversas especies en ganadería, caza, pesca, animales de compañía y en colecciones zoológicas. El interés por el bienestar animal apareció como una preocupación por los animales de granja en países europeos, y en 1965 el Gobierno Británico constituyó el comité Brambell, que revisó el bienestar animal en sistemas de cría intensiva y estableció unos estándares mínimos (Recuerda 2003). En 1977, el texto de la Declaración Universal de los Derechos del Animal fue adoptado por la Liga Internacional de los Derechos del Animal y por las Ligas Nacionales afiliadas. La declaración, proclamada el 15 de octubre de 1978 por la Liga Internacional, las Ligas Nacionales y por las personas físicas que se asocian a ellas, fue aprobada por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) y posteriormente por la Organización de las Naciones Unidas (ONU).

El Convenio para la Conservación de la Diversidad Biológica, firmado en Río de Janeiro el 5 de junio de 1992, es el primer instrumento jurídico internacional que recoge los términos “conservación *in situ* y *ex situ*” como mecanismos de protección de los recursos biológicos y genéticos. A este respecto, en dicho convenio se establecen las medidas *in situ* como la conservación de los ecosistemas y los hábitats naturales y el mantenimiento y la recuperación de poblaciones viables de especies en sus entornos naturales, al tiempo que determina la importante función complementaria de las medidas *ex situ*, orientadas a establecer instalaciones para la conservación y la investigación de plantas, animales y microorganismos, a adoptar medidas para la recuperación, rehabilitación y reintroducción de especies amenazadas en sus hábitats naturales,

a gestionar la recolección de recursos biológicos de los hábitats naturales, y a cooperar, financiera, científica y técnicamente a la conservación *ex situ*. Acciones, todas ellas, en las que los zoológicos pueden y deben ser sujetos activos de gran valor.

Según la Asociación Europea de Zoos y Acuarios (AEZA), la misión que deben cumplir en la actualidad los zoológicos y acuarios de los países miembros de la Unión Europea consta de los siguientes puntos:

- Promover la cooperación para fomentar los planes de conservación de biodiversidad regional y mundial a través de los planes internacionales de cría de animales salvajes, como el Programa Europeo de Especies Amenazadas.
- Promover la educación ambiental.
- Contribuir en reuniones importantes de organizaciones internacionales como Naciones Unidas, la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN), la Unión Europea, la Convención del Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), etc.
- Aconsejar, si es requerido, a la Unión Europea u otros comités representativos como el Parlamento Europeo y el Concilio Europeo.

En España la Ley 31/2003, de 27 de octubre, de conservación de la fauna silvestre en los parques zoológicos establece que el “Consejo de la Unión Europea, con fecha 29 de marzo de 1999, adoptó la Directiva 1999/22/CE, relativa al mantenimiento de animales salvajes en parques zoológicos, con el fin

de establecer una base común a los Estados miembros que propicie la correcta aplicación de la legislación comunitaria en materia de conservación de la fauna silvestre, y que, por otro lado, asegure el desempeño por los parques zoológicos de su importante papel en la educación pública, la investigación científica y la conservación de las especies. Por tanto exige el establecimiento de un régimen de autorización y de inspección de los parques zoológicos, que garantice el cumplimiento de condiciones básicas de sanidad, bienestar y seguridad, para mantener la buena salud física y psíquica de los animales salvajes que habitan en dichos parques. Además, los parques zoológicos deben ser una fuente de conocimientos científicos que esté a disposición de universidades, de instituciones dedicadas a la investigación y de organizaciones comprometidas con la conservación de la naturaleza, a fin de que estas entidades puedan contribuir no sólo a la conservación *ex situ* de las especies silvestres, sino también a su conservación *in situ* a medida que sus hábitats se van reduciendo y su distribución geográfica se va haciendo más fragmentada. Asimismo, los parques zoológicos deben tener como función el fomento de la educación y de la toma de conciencia por el público en lo que respecta a la conservación de la biodiversidad”.

1 CONCEPTO DE BIENESTAR ANIMAL

El bienestar animal es uno de los objetivos más importantes de los parques zoológicos para mantener los animales con un buen estado de salud tanto física como psicológica. El concepto de bienestar animal ha estado asociado durante tiempo al concepto de salud física, eludiendo la importancia que tiene la salud psíquica ya que la ausencia de ésta está directamente asociada con el sufrimiento del animal.

Los seres vivos están adaptados al medio que les rodea y viven en ambientes cambiantes y predecibles. A lo largo de la vida de un animal se pueden dar situaciones adversas que el organismo debe contrarrestar con el fin de mantener la homeostasis. Si esto no se consigue se produce una reacción real o potencial de la eficacia biológica del animal, en cuya situación verá reducido su bienestar (Recuerda 2003).

Los animales que viven en cautividad se encuentran en un medio totalmente alterado por el hombre, en el que existe una organización y un control por parte del ser humano que hacen que el animal no pueda manejar el hábitat y sus recursos, y esto juega un papel fundamental sobre el estrés y el bienestar animal.

En 1993, el Consejo Británico para el bienestar de animales de granja (FAWC) definió las “cinco libertades” de los animales como los estándares mínimos que debían cumplir: 1) que estén libres de sed, hambre y malnutrición; 2) que estén libres de incomodidad; 3) que estén libres de dolor, heridas y enfermedad; 4) que sean libres para expresar su comportamiento normal; y 5) que no sufran miedo ni angustia. Estos aspectos se referían tan sólo a las “necesidades últimas”, en el sentido de que si no se cubriesen podría peligrar la reproducción y supervivencia del animal (Recuerda 2003), pero aunque las necesidades fisiológicas estén cubiertas, el bienestar puede no ser aceptable si no se cubren además las necesidades etológicas del individuo.

2 CONCEPTO DE ESTRÉS

En muchos campos profesionales, desde la etología a la psiquiatría, se utiliza con frecuencia el término “estrés”; sin embargo, cuando preguntamos por una definición concisa de este término, pocos podrían proporcionárnosla.

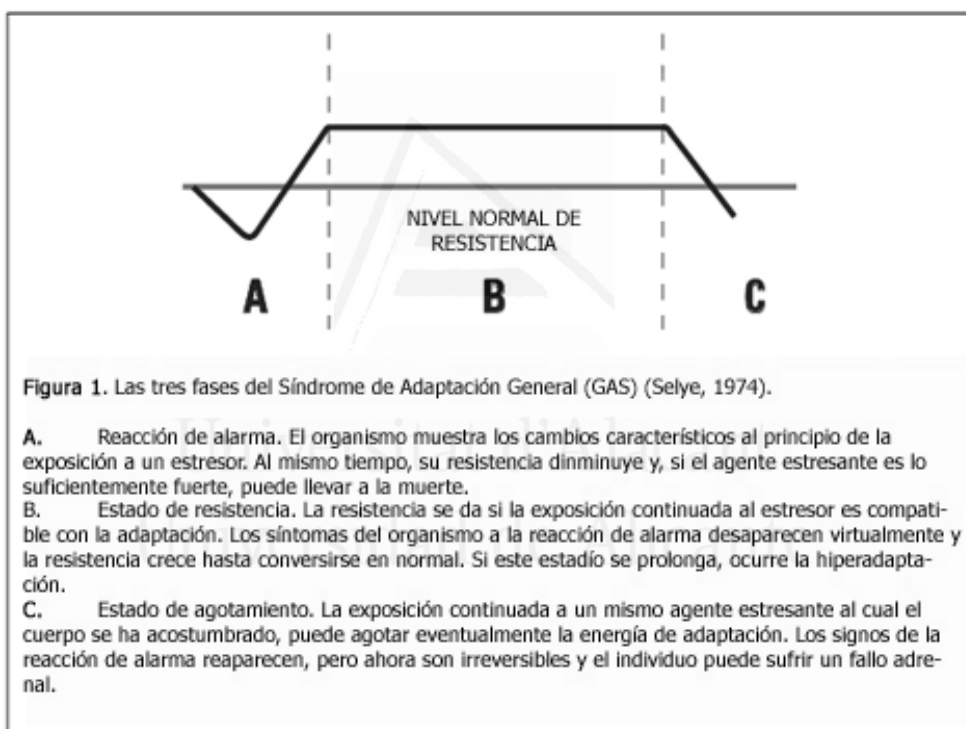
En 1914, Walter Cannon desarrolló la idea por la que los organismos reaccionaban ante situaciones desfavorables en términos de actividad metabólica. El concepto de Cannon sobre el estrés derivó, por simple analogía de la física newtoniana, en la que la aplicación de una fuerza (estrés) produce una deformación (presión) en un objeto, con lo que la presión es proporcional al estrés. Además desarrolló esta analogía mecanicista introduciendo el concepto de “nivel crítico de estrés” en los sistemas biológicos, produciendo una “presión de rotura” en el mecanismo de homeostasis, el cual ya no puede contrarrestar el estrés (Cannon 1929).

La contribución más grande en el estudio del estrés la hizo Selye, quien en su artículo definió el estrés como “un estado de tensión no específico en los organismos vivos”, con lo que se generó el problema actual de cómo identificar su presencia y medir su intensidad (Selye, 1946).

En 1936, tras observar en animales de experimentación sometidos a amplias variedades de agentes nocivos de intensidad biológica elevada, Selye identificó la “triada de estrés”, en la que se daba un aumento de la función adrenocortical, una atrofia del timo y de los tejidos linfáticos y una ulceración del tracto digestivo.

2.1 Síndrome de Adaptación General

Con el fin de desarrollar una teoría que describa la respuesta fisiológica al estrés en humanos y animales, Selye (1974) trabajó en un análisis integrado de los efectos del estrés sobre la función de la glándula adrenal. Él llamó a este modelo de adaptación al estrés “Síndrome de Adaptación General” (GAS). El GAS (figura 1) fue pensado por Selye para esbozar cómo un organismo se adapta fisiológicamente a los estresores en un intento de restablecer su homeostasis.



El GAS está compuesto por tres estadios de la respuesta al estrés: la fase de alarma (estrés agudo), la fase de resistencia (estrés crónico) y la fase de agotamiento.

2.1.1 Fase de alarma (estrés agudo)

La fase de alarma ocurre cuando el organismo percibe un agente estresante y el cuerpo se pone en alerta. Esta alerta, a veces llamada respuesta de lucha o huida, está asociada con la activación del sistema nervioso simpático. Hormonalmente, se puede observar un incremento de la liberación de cortisol desde la corteza adrenal. Esta respuesta es el mecanismo de defensa natural que el organismo desarrolla cuando se ve amenazado, y sirve para estimular al organismo a que responda ante una situación estresante y reaccione frente a dicha amenaza. Una vez que esta fase ha terminado, el cuerpo necesita un periodo de recuperación de entre 24 y 48 horas, durante el cual necesita principalmente descanso.

2.1.2 Fase de resistencia (estrés crónico)

En esta segunda fase del GAS, el organismo sigue reaccionando al estrés percibido. Los niveles de cortisol son elevados y crónicos y tienen efectos nocivos para la salud: como la supresión de la respuesta inmunitaria e inflamatoria, las infecciones oportunistas, la hipertensión, la diabetes y otras enfermedades degenerativas.

2.1.3 Fase de agotamiento

El estrés crónico eventualmente puede llevar a la fase de agotamiento, caracterizada por una producción deficiente de glucocorticoides, y es conocida como el agotamiento adrenal. Este agotamiento está asociado a una disminución de la resistencia al estrés, envejecimiento prematuro y, si no se corrige, puede llevar a la muerte.

Selye (1976) describió el “estado de tensión no específico” como un “estado de estrés”, y creía que un nivel mínimo de estrés era necesario para la existencia cotidiana (“eustress”), y lo distinguió de los niveles potencialmente dañinos de estrés (“distress”) que desencadenaban estados patológicos.

Actualmente, la definición de estrés es muy similar a la descrita por Selye y se refiere a una variedad de respuestas ante estímulos internos o externos, denominados “estresores”, que modifican la homeostasis de un individuo (Dantzer y Mormede 1983; Stratakis y Chrousos 1995). Estos estímulos pueden ser factores físicos, fisiológicos, comportamentales o psicológicos.

2.2 Respuesta al estrés

La respuesta ante el estrés está regulada por el *sistema de estrés* que se localiza en el Sistema Nervioso Central (SNC) y periférico (Chrousos y Gold 1992). Este sistema recibe e integra una gran diversidad de señales neurosensoriales (corticales superiores, límbicas, visuales, auditivas, olfativas, gustativas, somatosensoriales, nociceptivas y viscerales) y señales transmitidas por la sangre (composición de la sangre, hormonas, citocinas, otros mediadores), que llegan a través de distintas vías. La activación del sistema de estrés lleva, en un periodo de tiempo limitado, a cambios comportamentales y físicos que son increíblemente consistentes en su presentación cualitativa (Tabla 1). Estos cambios son normalmente adaptativos y mejoran las oportunidades de la supervivencia de los individuos.

La adaptación comportamental incluye incremento de la excitación, alerta y vigilancia, mejora la cognición, focaliza la atención e incrementa la memoria así como la euforia o la depresión del organismo, dependiendo del agente estresante.

Se genera además un estado de analgesia, se eleva la temperatura corporal y se inhiben funciones vegetativas como el apetito, la búsqueda de alimento, y la reproducción. Además, los cambios de la adaptación física tienen como objetivo optimizar la energía y los recursos disponibles en el organismo. De este modo, el oxígeno y los nutrientes se dirigen hacia el SNC y a los lugares estresados del organismo, donde la mayoría de ellos son necesarios. El incremento del tono cardiovascular (frecuencia cardíaca, fracción de la eyección cardíaca, presión sanguínea arterial), la frecuencia respiratoria y el metabolismo intermedio (gluconeogénesis, lipólisis) todos trabajan todos ellos en concierto para promover la disponibilidad de los sustratos vitales. La función de detoxificación hace que el organismo elimine productos metabólicos innecesarios que se derivan de los cambios metabólicos en la respuesta al estrés, mientras que las funciones digestiva y de crecimiento, así como la de reproducción y la del sistema inmunológico, son inhibidas.

Tabla 1. Adaptación Comportamental y Física durante Estrés Agudo

Adaptación Comportamental	Adaptación Física
Redirección Adaptativa del Comportamiento	Redirección Adaptativa de la Energía
Incremento del estado excitación y de alerta	Oxígeno y nutrientes dirigidos al SNC y a los lugares del organismo estresado
Incremento de la cognición, vigilancia y del centro de atención	Alteración del tono cardiovascular, incremento de la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca.
Euforia o depresión	Incremento del ritmo respiratorio
Supresión del apetito y del comportamiento de alimentación	Incremento de la gluconeogénesis y lipólisis
Contención de la respuesta de estrés	Detoxificación de productos tóxicos endógenos o exógenos
	Inhibición del crecimiento y del sistema reproductivo
	Inhibición de la digestión y estimulación de la motilidad del colon.
	Contención de la respuesta inflamatoria / inmune.
	Contención de la respuesta de estrés

Adaptada de Chorusos y Gold 1992

2.3 Agentes estresantes

Un agente estresante o estresor es aquel que produce una variación del estado interno considerado como óptimo en el animal (Bradshaw 2003). Utilizando esta aproximación podríamos identificar la existencia de estados estresantes en organismos biológicos a través de la reacción a estresores específicos, y de esta forma, medir la intensidad del estrés inducido por medio de la extensión de la reacción fisiológica producida.

Agentes externos: Dantzer y Mormède (1979) dividían en tres grupos los agentes estresantes externos:

- Interacciones con otros animales (estrés social): La entrada de un nuevo individuo en el grupo, la presencia o no de hembras en el grupo social, o el aislamiento de animales gregarios, son situaciones en las que se puede desencadenar la respuesta de estrés.
- Interacciones animales – medio ambiente: Las condiciones ambientales influyen notoriamente en el estado de bienestar del animal, el cual responde frente a situaciones desfavorables de temperatura, humedad, ventilación, ruido, tipo de suelo, higiene medioambiental, altitud, etc.
- Interacciones entre animales y el hombre: En este grupo estarían incluidas todas las situaciones estresantes derivadas del manejo de los animales.

Agentes internos: En ocasiones, los agentes estresantes pueden provenir del propio organismo, como por ejemplo las infecciones (García-Belenguer y Mormède 1993).

3 FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA DE ESTRÉS

Las dos respuestas fisiológicas más importantes ante un agente estresante son: la estimulación del sistema nervioso simpático (que tiene como resultado la liberación de catecolaminas) y la activación del eje hipotalámico – pituitario – adrenal (HPA) que ayuda a restablecer la homeostasis (Sapolsky *et al* 2000; Reeder y Kramer 2005). El resultado final es la secreción de glucocorticoides, que perduran desde unos pocos minutos hasta horas (Sapolsky 1992, Wingfield y Romero 2001). La presencia a corto plazo de concentraciones elevadas de glucocorticoides facilita la huida en situaciones en las que existe una amenaza para la vida del organismo (Wingfield *et al* 1998). Sin embargo, la activación crónica del eje HPA y la concentración elevada de GC puede tener a largo plazo efectos perjudiciales en la salud (Boonstra *et al* 1998, Sheriff *et al* 2009). Estos glucocorticoides que han sido secretados como respuesta al estresor nos pueden proporcionar información en lo que se refiere al bienestar psicológico de los animales (Whitten *et al* 1998).

3.1 El eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA)

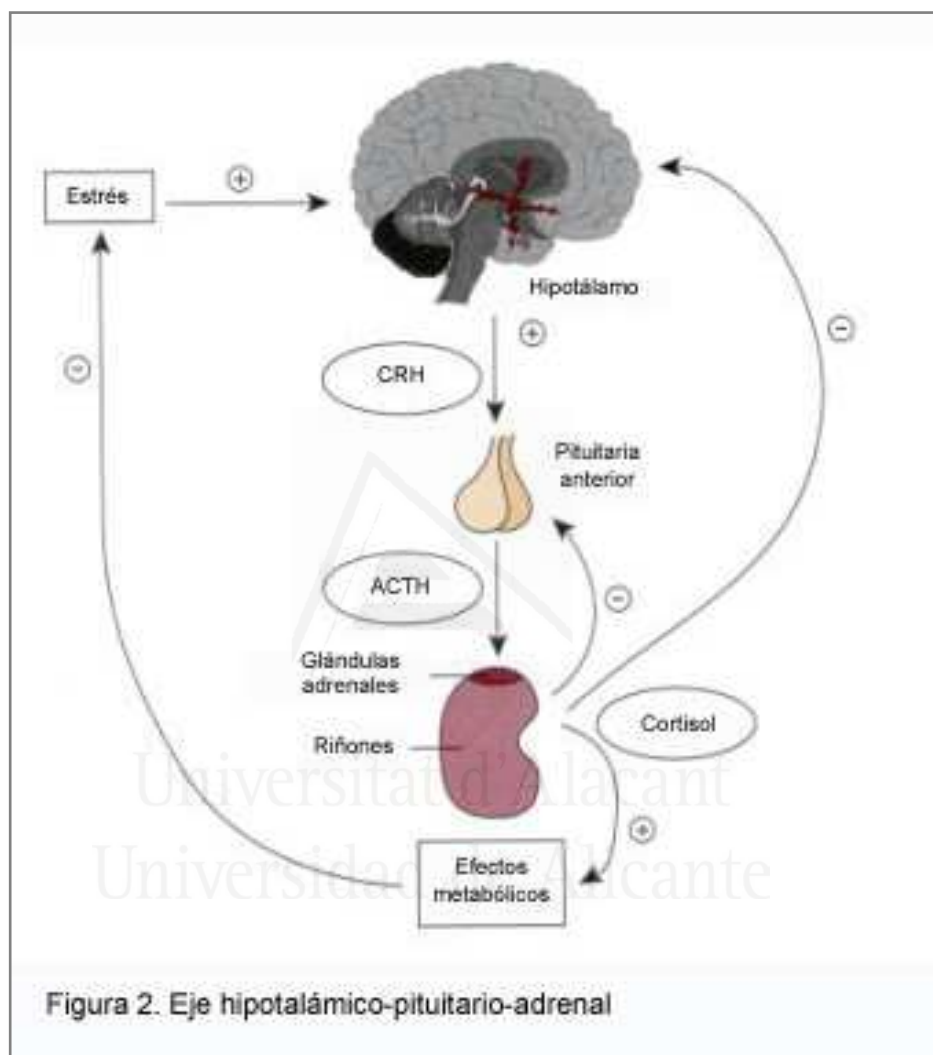
El eje HPA está comprendido entre el núcleo hipotalámico paraventricular (PVN), la glándula pituitaria anterior y la corteza adrenal. Bajo condiciones normales, el hipocampo inhibe el eje HPA; a medida que el nivel de glucocorticoides se incrementa, la hormona en sí misma actúa como señal de retroalimentación negativa. Esta retroalimentación negativa regula el ritmo circadiano de secreción de glucocorticoides (Sheriff *et al* 2011)

Cuando un animal es expuesto ante un agente estresante (cualquier acontecimiento físico o psicológico que perturbe la homeostasis), el núcleo hipotalámico paraventricular es estimulado, induciendo a las neuronas parvocelulares la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP) en el portal hipofisiario que conecta el hipotálamo con la glándula pituitaria anterior. Las hormonas CRH y AVP estimulan la glándula pituitaria anterior a sintetizar adrenocorticotropina (ACTH), que es vertida al torrente sanguíneo y llega a la corteza adrenal, que es su órgano diana, estimulándolo para que secrete glucocorticoides, entre ellos cortisol, que son liberados a la sangre (Figura 2). Esta hormona tarda entre 3 y 5 minutos en liberarse al torrente sanguíneo desde que el individuo ha percibido el agente estresante. Los glucocorticoides generalmente alcanzan el máximo nivel entre los 15 y 30 minutos después de haberse expuesto a la amenaza y vuelve a los niveles basales a los 60 – 90 minutos (De Kloet *et al* 2005).

Sin embargo, el aumento de la concentración de glucocorticoides depende de la severidad del agente estresante. Bajo unas condiciones donde el estresor es agudo y puntual, el mecanismo de retroalimentación negativa funciona eficientemente y el sistema vuelve a su estado normal rápidamente. Bajo unas condiciones donde el agente estresante actúa de una manera crónica, las señales de retroalimentación negativa son débiles y el sistema de respuesta al estrés continúa activado durante largos periodos (Sheriff *et al* 2011).

Además de estimular la secreción hipofisaria de ACTH, la CRH aumenta la actividad del sistema nervioso simpático y la liberación de catecolaminas por la médula suprarrenal. La administración de CRH produce aumento de las catecolaminas plasmáticas, aumento de la presión arterial media, aumento de la frecuencia cardíaca y del gasto cardíaco. Estas acciones de la CRH de estimular, tanto la secreción de ACTH y de los glucocorticoides, como del sistema

simpático-suprarrenal, suponen la respuesta característica al estrés y son esenciales para la supervivencia en las situaciones adversas.



3.2 Control de la respuesta al estrés

La regulación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal es una de las más complejas del sistema endocrino. El hipotálamo provee la señal de estimulación de todo el eje segregando la hormona CRH, que aumenta la secreción hipofisaria de ACTH, la cual, a su vez, estimula la secreción de glucocorticoides por la

corteza suprarrenal. El circuito se cierra con la acción de retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides plasmáticos. La secreción de todas las hormonas del eje no es constante, sino que presenta un ritmo circadiano relacionado con los periodos de sueño-vigilia. La respuesta de todo el eje a una situación estresante se manifiesta por encima de todos estos mecanismos reguladores, es decir, durante el estrés se produce una rápida activación de todo el eje, independientemente de los niveles plasmáticos previos de glucocorticoides y del momento del día en que se produzca. Además de este control humoral por retroalimentación negativa, existe un control nervioso importante, puesto que el hipotálamo recibe numerosos estímulos externos de distinta modalidad e intensidad.

La retroalimentación negativa de los glucocorticoides tiene un efecto inhibitor en la respuesta de secreción de ACTH y limita la duración en el tiempo de la exposición de los tejidos a los glucocorticoides, minimizando así los efectos catabólicos, lipogénicos, antirreproductivos e inmunosupresivos de estas hormonas (Chorusos 1997).

3.3 Ritmos de secreción del cortisol

La concentración de cortisol en sangre no es constante, sino que varía como respuesta a factores fisiológicos o a diversos agentes estresantes, externos o internos, que producen una activación del eje corticotropo como parte de una respuesta de adaptación (García-Belenguer y Mormède 1993).

Durante muchos años se había pensado que el cortisol se secretaba por la corteza suprarrenal de una manera más o menos continua, con un máximo de secreción durante el sueño por la mañana temprano y un mínimo por la noche, justo antes de dormir. También se sabía desde hace tiempo que una

determinación única del cortisol plasmático no era una medida lo suficientemente fiable como para poder discriminar un exceso de secreción ni la disminución de la misma en la insuficiencia suprarrenal, puesto que sujetos normales podían tener niveles plasmáticos de cortisol muy altos o muy bajos. La explicación de esta aparente paradoja es que el cortisol no se segrega de manera continua, sino intermitente durante cortos periodos de tiempo de apenas unos minutos. Entre estos periodos secretores, la corteza suprarrenal puede dejar de secretar cortisol durante minutos, e incluso horas. A este patrón de secreción se le ha llamado secreción episódica. El número y la duración de los picos secretores varía aumentando al máximo durante la madrugada, cuando los niveles de ACTH y de cortisol plasmático son elevados, y disminuyendo al mínimo al anochecer (en los animales diurnos). Estos cambios en la frecuencia y amplitud de la secreción episódica es lo que da lugar al ritmo circadiano de ACTH y cortisol.

3.4 Distribución del cortisol

Tras la exposición de un individuo ante un agente estresante, el eje hipotálamohipofisario es activado y libera ACTH, que llega a las glándulas suprarrenales y provoca la producción de corticosteroides por parte de éstas (Munck *et al* 1984). El cortisol liberado a sangre se transporta principalmente conjugado a proteínas plasmáticas, permaneciendo únicamente el 10% del cortisol total como fracción libre (López-Calderón 1999). Sólo esta fracción libre es capaz de abandonar el compartimento sanguíneo mediante difusión pasiva a través de las membranas celulares (Rijnberk y Mol 1989; López-Calderón 1999). Así se puede encontrar cortisol libre en otros fluidos biológicos como la saliva y la orina (Contreras *et al* 1986, Rijnberk y Mol 1989).

Por otro lado, el cortisol libre es susceptible de ser metabolizado por distintos órganos, principalmente por el hígado. Los metabolitos inactivos del

cortisol son excretados a orina o a heces por medio de la bilis, donde es posible su cuantificación (Taylor 1971, Lidner 1972, López - Calderón 1999).

3.4.1 Cortisol plasmático

La vida media del cortisol plasmático es de 80-120 minutos en humanos. La principal proteína transportadora de cortisol en plasma es la transcortina o CBG (corticosteroid binding globulin). Esta proteína tiene una gran afinidad por el cortisol, el 70% del cortisol total se encuentra ligado a las CBG, sin embargo, su concentración en sangre está limitada (0,4 g/dl en humanos) pudiéndose saturar con concentraciones altas de cortisol (Rijnberk y Mol 1989).

La albúmina tiene mucha menos afinidad por el cortisol, pero se encuentra en concentraciones muy elevadas en plasma (4 g/dl en humanos), por lo que transporta el 20% del cortisol total.

La fracción de cortisol unida a proteínas no tiene acción biológica, ya que no puede abandonar el compartimento sanguíneo y ejerce, por tanto, un efecto tampón, evitando que altas concentraciones de cortisol libre lleguen a los órganos diana protegiéndolo de la desactivación por el hígado y su excreción por los riñones (Chacón 2004).

De esta manera existe una reserva de cortisol que se desplaza fácilmente a cortisol libre cuando disminuye la tasa de excreción por la corteza adrenal, como ocurre por la noche (Rijnberk y Mol 1989). A la hora de valorar el efecto del aumento del cortisol, tiene una gran importancia cuantificar el cortisol libre, ya que es la fracción activa con efecto sobre el organismo.

3.4.2 *Cortisol en saliva*

El cortisol, al ser una sustancia liposoluble, llega a la saliva por difusión pasiva a través de las células acinares. Únicamente se difunde el cortisol no conjugado y libre, es decir, la fracción que no ha sido metabolizada y que no retransporta unida a proteínas plasmáticas (Vining *et al* 1983 a-b; Rinjberk y Mol 1989).

El cortisol libre llega a la glándula salival en la misma concentración en la que se encuentra en plasma (en torno al 10% del cortisol total) sin variar con el flujo salival. La relación de cortisol plasmático/salival es muy alta (1/10) por lo que la concentración de cortisol salival no se ve influenciada por la extravasación de plasma en las encías (Vining *et al* 1983a).

Los metabolitos solubles de los esteroides pasan a saliva mediante la ultrafiltración suponiendo el 1% de su concentración plasmática (Vining *et al* 1983a). Por último, una pequeña porción de cortisol excretado es transformado en las glándulas salivares en cortisona por medio de la 11 beta hidroxisteroide deshidrogenasa (Ferguson *et al* 1975).

Estas posibles variaciones en la concentración de cortisol no son significativas por lo que la concentración de cortisol salival se considera representativa del cortisol libre en plasma que es a su vez la fracción con actividad biológica (Vining *et al* 1983a, Vining *et al* 1983b, Kirschbaum y Hellhammer 1994).

3.4.3 *Cortisol y metabolitos del cortisol en orina y heces*

Los glucocorticoides en sangre son metabolizados principalmente por el hígado y excretados a la orina por medio de los riñones o al intestino por medio de los conductos biliares (Taylor 1971, Palme 2005). No se encuentran glucocorticoides sin metabolizar en heces (Touma y Palme 2005), mientras que si se pueden encontrar sin metabolizar en pequeñas cantidades en la orina (Bahr *et al* 2000). El metabolismo de los glucocorticoides no es sencillo. Algunos de los metabolitos de los glucocorticoides producidos en el primer paso a través del hígado son reabsorbidos por el torrente sanguíneo hasta el intestino y allí se someten a la degradación hepática (Klasing 2005). La flora intestinal además puede alterar la estructura de los metabolitos de los glucocorticoides (Eriksson y Gustafsson 1970). Los metabolitos que se encuentran en las heces representan la fracción libre del total de los glucocorticoides (Touma y Palme 2005).

En mamíferos, la proporción y estructura de los glucocorticoides metabolizados que son excretados en la orina y en las heces difieren entre especies (Tabla 2) y pueden también diferir entre machos y hembras (Touma *et al* 2003, Palme *et al* 2005). La proporción de metabolitos de glucocorticoides excretados en orina y heces puede determinarse inyectando glucocorticoides marcados radiactivamente en el animal y recogiendo todo el material excretado sobre un intervalo de tiempo dado (normalmente, unos pocos días).

El periodo de tiempo que tarda en excretarse en heces el esteroide metabolizado difiere según la especie y está relacionado con la cantidad de tiempo que necesitan los metabolitos del cortisol para pasar a través del intestino (Palme *et al* 1999), sin embargo, normalmente no es menor de 12-24 horas y tiende a un rango de entre 24 a 48 horas a fermentarse en el intestino grueso (Schwarzenberger *et al* 1996). Al igual que en la orina, los metabolitos de los

glucocorticoides excretados en las heces difieren según la especie y necesitan ser caracterizados utilizando un HPLC, seguido de un enzimoimmunoensayo o de un radioinmunoensayo (Palme y Möstl 1997, Bamberg *et al* 2001, Schatz y Palme 2001).

Tabla 2: Proporción de metabolitos de cortisol eliminados por orina y heces tras la inoculación de cortisol marcado radiactivamente (Palme *et al* 1999, Schatz y Palme 2001)

Especie animal	Metabolitos de cortisol en orina	Metabolitos de cortisol en heces
Primates	>80	<20
Ovejas	72	28
Ponis	59	41
Cerdos	93	7
Gatos	18	82
Perros	77	23

En aves y reptiles, la orina y las heces se excretan juntas como excrementos y, en algunas especies, se mezclan en la cloaca antes de salir al exterior (Klasing 2005), de modo que la proporción de glucocorticoides excretados por cada una de estas vías es desconocido.

Cortisol en plumas y pelo

Todavía no se conoce realmente cómo llegan los glucocorticoides al pelo y a las plumas. El pelo crece desde la raíz y se nutre a través de capilares a través de los cuales los glucocorticoides libres se difunden hasta la matriz de las células que en última instancia se vuelven en cabello muerto. Se piensa que el suministro de sangre es la mayor fuente de glucocorticoides, pero el extremo distal del cabello puede también contener glucocorticoides porque se presume que existen glándulas que los pueden absorber (Cone 1996). En humanos, las principales

secreciones son de sudor y de sebo, pero numerosos animales salvajes sólo segregan olores en ciertas áreas del pelo que además varían estacionalmente (Bradley y Stoddart 1993) o dependiendo de la dominancia de los individuos (Shimozuru *et al* 2006). Estas secreciones, así como el cortisol salivar que depositan cuando se acicalan con la lengua, puede contribuir en la variación de los niveles de glucocorticoides. En la actualidad se está tratando de localizar la síntesis de glucocorticoides en los folículos pilosos en humanos (Sharpley *et al* 2009).

Es necesario entender el crecimiento de las plumas puesto que el cortisol se deposita en ellas sólo durante el crecimiento de éstas. El folículo de la pluma es una disposición tubular de las células que está altamente vascularizada durante su crecimiento. La velocidad de crecimiento de la pluma es relativamente uniforme (Bortolotti *et al* 2008) y en todos los puntos a lo largo del raquis, las barbas de ambos lados crecen al mismo tiempo. Por tanto, para determinar la deposición natural de cortisol en las plumas, hay que cortar las barbas que se disponen a lo largo del raquis. Por esto, longitudes iguales desde la parte distal hasta la proximal de las plumas representan, aproximadamente, periodos similares de tiempo (Bortolotti 2009).

3.4.4 Cortisol en leche

El cortisol plasmático pasa al interior de las células mamarias mediante difusión pasiva, desde donde es excretado a la leche (Bremen y Gangwer 1978). El mecanismo de excreción del cortisol a la leche no se conoce totalmente, pero se ha observado que alcanza rápidamente el equilibrio entre las concentraciones de cortisol en sangre y leche. El tiempo que tarda en alcanzar el equilibrio no está todavía claro, aunque existen factores que influyen, como es la vascularización de la zona (Verkerk *et al* 1998). En la leche el cortisol se puede encontrar de forma

libre, unido a proteínas (caseína de la leche) o asociado a la membrana de los glóbulos grasos (Tucker y Schwalm 1977).

3.4.5 Cortisol en agua

En peces, los glucocorticoides libres pasan del torrente sanguíneo al agua mediante difusión pasiva, a través de la agallas (Sorensen *et al*, 2000; Ellis *et al*. 2005, Scott *et al* 2008). El estudio de los glucocorticoides en el agua se encuentra en su primer estadio y se necesita profundizar en su estudio para conocer si la concentración de glucocorticoides que se encuentran en el agua es directamente proporcional a la concentración en plasma. Algunos estudios han encontrado una correlación positiva entre las cantidades de glucocorticoides libres liberados en el agua en un periodo de tiempo determinado y la concentración de glucocorticoides libres en sangre. (Greenwood *et al* 2001, Ellis *et al* 2004; Scott y Ellis, 2007).

3.4.6 Cortisol en huevos

Los huevos de las aves y los reptiles contienen hormonas esteroideas que pueden ser cuantificadas. (Lipar *et al* 1999, Bertin *et al* 2008, Rettenbacher *et al* 2009). Además los glucocorticoides presentes en el huevo han atraído la atención de especialistas en ecología del comportamiento durante la última década, ya que se ha visto que la composición del huevo depende de los factores ambientales y del estatus de la madre. Los glucocorticoides llegan al huevo a través de la sangre; lo que no se conoce todavía es si se transfiere sólo durante la formación de la yema, debido a una posible alteración en la permeabilidad de la célula, o a cambios en la actividad enzimática (las enzimas están saturadas con otros metabolitos en la primera fase del desarrollo folicular) o a la relevancia biológica de pequeñas concentraciones.

3.5 Efectos negativos en el organismo ante un exceso de glucocorticoides

Los glucocorticoides son esenciales para la supervivencia en situaciones de emergencia, como pueden ser el estrés, el ayuno o la hipoglucemia insulínica. Sin ellos, está dificultada la movilización proteica y si las reservas de glucógeno hepático están agotadas, puede producirse la muerte por hipoglucemia (García-Belenguer y Mormède 1983). Sin embargo, ante una situación de estrés crónico, hay una concentración elevada de glucocorticoides en el organismo que perduran en el tiempo y a consecuencia de este hecho, pueden provocarse efectos nocivos en el organismo como debilidad muscular, estrías cutáneas, falta de síntesis de matriz ósea y osteoporosis (Carcagno 1995, Guyton y Hall 2001), hipercolesterolemia (Drazner 1987), acúmulo de grasas con una distribución especial en regiones torácicas y cefálicas del cuerpo en humanos (Smith *et al* 1987, Rijnberk y Mol 1989, Carcagno 1995), úlcera gástrica, hipertensión (López-Calderón 1999), supresión de la función inmunológica, aumento de enfermedades, comportamiento anormal y disminución del éxito reproductivo (Moberg 1990).

4 MEDICIÓN DEL CORTISOL: MÉTODOS INVASIVOS VS MÉTODOS NO INVASIVOS

El bienestar animal es un tema complejo y medirlo con precisión conlleva evaluar un amplio rango de parámetros psicológicos, endocrinos y comportamentales. Aunque el estudio del comportamiento constituye una medida de evaluación de estrés, se puede mejorar enormemente con el conocimiento de la respuesta hormonal que provoca. De hecho, los estímulos estresantes no siempre inducen cambios comportamentales, y en esos casos el

estrés debería evaluarse basándose en datos fisiológicos (Vincent y Michell 1992). La concentración de glucocorticoides se ha estado empleando como índice de bienestar animal en estudios de ecología y conservación (Busch y Hayward 2009). La medición de estas hormonas puede ayudarnos a entender cómo afectan los agentes estresantes a la supervivencia y al éxito reproductivo de animales en libertad y en cautividad y cómo estos están adaptados a los cambios mediambientales (conespecíficos, predadores, tiempo), a los cambios climáticos, traslado y reintroducción o impacto sobre poblaciones de la alteración del hábitat (Wasser *et al* 1997, Creel *et al* 2002, Sheriff *et al* 2009).

4.1 Métodos invasivos

4.1.1 *Medición del cortisol en plasmático*

La sangre ha sido el método convencional para obtener los niveles de glucocorticoides en muchas especies de vertebrados, ya que proporciona una medida inmediata del estado de ese organismo en ese instante. El estado de ese individuo está formado por tres componentes: los ciclos endógenos (ritmos circadianos y estacionales); el estado inmediatamente anterior a la experiencia (la percepción de un agente estresante como un predador o la disposición del individuo a atacar, o cualquier otro evento); y la experiencia a largo plazo (agentes estresantes crónicos inducidos por individuos de la misma especie, nutrición, predadores, etc.).

El glucocorticoide principal varía según los taxones (Bentley 1998). Si se producen cortisol y corticosterona, el cortisol predomina y tiene una actividad biológica mayor que la corticosterona (Vinson *et al* 2007). En tiburones y rayas ocurre algo poco corriente y es que el glucocorticoide que prevalece es la 1-alfa-hidroxycorticosterona. En el 95% de las especies de peces (Atinopterygii) el

cortisol predomina pero la corticosterona también está presente; en el resto de peces el glucocorticoide varía. En reptiles, anfibios y aves el glucocorticoide dominante es la corticosterona. En la mayoría de los mamíferos, placentarios y marsupiales, se secreta principalmente cortisol. Sin embargo, en algunos (equidnas, conejos, ratas, ratones caseros y ratones de campo) secretan principalmente sólo corticosterona, mientras que otras especies cercanas (ornitorrincos, liebres, ratones espinosos y otros muchos roedores) secretan fundamentalmente cortisol (Sheriff *et al* 2011).

La captura, el manejo y la obtención de una muestra sanguínea representa en sí misma un agente estresante y causa un incremento en los niveles de cortisol plasmático (Dawson y Howe 1983, Romero y Romero 2002, Sabatino *et al* 1991, Schoech *et al* 1999, Whitten *et al* 1998), por tanto, pueden alterar los niveles hormonales, como ha sido demostrado en cercopitecos (Bentson *et al* 2000) y en ratas (Cook *et al* 1973). Además, el acto de tomar la muestra de sangre induce un incremento de los glucocorticoides en plasma en un tiempo de alrededor de 2 minutos, por lo que la sangre hay que extraerla rápidamente (Broom y Johnson 1993).

Por todo esto, podemos considerar que los niveles de cortisol en sangre no son un buen indicador, en especial si va a ser utilizado para evaluar largos periodos de estrés (Queiras y Carosi 2004). De hecho, la autorregulación del sistema trabaja para reducir los niveles de las hormonas de estrés: elevados niveles de glucocorticoides tienden a disminuir la producción de glucocorticoides por la acción de la glándula pituitaria e inhibiendo la producción de ACTH. Generalmente, elevados niveles de glucocorticoides en sangre no permanecen un tiempo mayor de 90 minutos (Manser 1992, Van der Kar *et al* 1991).

4.2 Métodos no invasivos

Las técnicas no invasivas de recogida de muestras permiten un seguimiento más preciso del estrés sin el error del incremento del nivel de cortisol inducido por la molestia o captura del animal (Hamilton y Weeks 1985, Harper y Austad, 2000, Millspaugh *et al* 2001; Washburn y Millspaugh, 2002). Como alternativa a analizar la sangre, en varios animales el estrés ha sido evaluado midiendo niveles de glucocorticoides en saliva, orina, heces, plumas, pelo y leche, cuyas muestras pueden ser tomadas utilizando métodos no invasivos libres de estrés. El análisis de estos materiales biológicos permite medir, en los casos de cortisol salivar, cortisol urinario y cortisol en leche, periodos puntuales de estrés, mientras que los metabolitos del cortisol excretados en las heces y en la orina, pelo y plumas permiten hacer un seguimiento del estrés en periodos más largos de tiempo.

Mientras que en casi todas las especies el cortisol libre ha sido detectado y medido en saliva, los metabolitos de esta hormona excretados en la orina y las heces pueden diferir dependiendo de la especie, y pueden tener distintas preferencias por una u otra vía de excreción. De hecho, a diversas especies domésticas y no domésticas les han sido administrados corticosteroides marcados radiactivamente para seguir la ruta de excreción (heces u orina), el tiempo que tarda en excretarse (el intervalo) y el tipo de metabolitos excretados en orina y heces.

4.2.1 Medición del cortisol en saliva

El uso del cortisol salivar como medida para evaluar el estrés fue validado primero en humanos (Kirchbaum y Hellhammer 1994) y en otras especies como en perros (*Canis familiaris*) (Beerda *et al* 1996, Vincent y Michell 1992) en macacos Rhesus (*Macacus rhesus*) (Boyce *et al* 1995), en monos ardilla (*Saimiri sciureus*) (Lutz

et al 2000, Fuchs *et al* 1997) o en elefantes asiáticos y en rinocerontes indios (Menargues *et al* 2008).

Los niveles de cortisol salivar son especialmente apropiados para evaluar los niveles de cortisol plasmático porque reflejan con precisión el nivel de la actividad biológica de la fracción libre de la hormona en sangre (Haeckel 1989). Estudios en cerdos (*Sus scrofa domesticus*) han demostrado que el cortisol presente en saliva está relacionado con el cortisol sanguíneo y representa aproximadamente el 10% del que hay en plasma (Parrot *et al* 1989, Haeckel, 1989). El periodo de tiempo que tarda en pasar el cortisol a la saliva después de la exposición del individuo ante un agente estresante es de, aproximadamente, 20 - 30 minutos

Las muestras de saliva son fáciles de obtener en animales habituados al manejo en cautividad en parque zoológicos, granjas o laboratorios. Además, el muestreo se puede realizar frecuentemente, lo que es especialmente importante ya que permite realizar un seguimiento del estrés en cortos periodos de tiempo con precisión (Queyras y Carosi 2004).

4.2.2 Medición del cortisol y metabolitos del cortisol en orina

A pesar de que en orina se encuentren los metabolitos del cortisol en concentraciones más elevadas que el cortisol libre, se suele utilizar la determinación de este último ya que es más fiable (Contreras *et al* 1986). Se ha demostrado que es un buen reflejo de la concentración en plasma, tanto la fracción libre (Beisel *et al* 1964, Carlstead *et al* 1993) como del cortisol total (Brandenberger y Follenius 1973, Miller *et al* 1991). La determinación del cortisol urinario refleja la actividad del eje HPA durante un periodo de tiempo más

extenso que el cortisol plasmático o salivar, sin estar influenciado por las fluctuaciones diurnas (Morineau 1997, Kong *et al* 1999).

Al diferir los metabolitos excretados en orina y heces entre especies, la elección del análisis debe ser tomada en cuenta según las especies que estén siendo estudiadas (ver tabla 2). Por otra parte, los niveles de hormonas en orina deben ser comparados con los niveles de creatinina. De hecho, las muestras de orina pueden diferir en términos de volumen y concentración. La creatinina, que es un producto del metabolismo de la actividad muscular, y por lo tanto, depende de la amplitud de la locomoción y de la masa corporal, es excretada a un ritmo relativamente constante cuando se comparan animales que viven en el mismo medio. Expresando los niveles de la hormona en orina como el ratio entre hormonas y creatinina (H/C), es posible realizar un control de las diferencias de concentración en orina (entre individuos y dentro de un mismo individuo), atribuibles a las diferencias del peso corporal, volumen de orina expulsada y volumen de agua consumida (Broom y Johnson 1993, Crockett *et al* 1993).

Al contrario que la saliva, la orina es evacuada de manera espontánea, por lo que la recogida no invasiva hay que realizarla de forma oportunista. Es preferible tomar la orina que es evacuada a primera hora de la mañana porque está más concentrada debido a la acumulación nocturna. No obstante, a diferencia de la saliva, la cantidad de orina en una sola muestra es suficiente para medir múltiples hormonas. Esto es especialmente útil cuando estudiamos el impacto del eventos estresantes en el ciclo ovárico, por lo que, además de las hormonas de estrés estudiadas, todas las hormonas reproductivas pueden ser medidas para realizar un seguimiento del ciclo ovárico de una forma no invasiva (Todd *et al* 1999).

4.2.3 Medición de metabolitos del cortisol en heces

Se han validado análisis para medir el estrés mediante metabolitos del cortisol en heces en varias especies (p.e: perros: Graham y Brown 1996; gatos: Schatz y Palme 2001; guepardos: Jurke *et al* 1997; hienas: Goymann *et al* 1999; licaones: Monfort *et al* 1998; primates: Stavinsky *et al* 1992). Como en la orina, hay muchos estudios que han descrito el periodo de tiempo que tarda el metabolito en excretarse en las heces. Transcurre un largo periodo de tiempo entre la secreción en sangre y la secreción en heces. Los niveles de hormona en heces son relativamente inalterables en la recolecta de las muestras de heces y es en los excrementos donde se encuentran los indicadores hormonales ideales para el estudio del estrés crónico. Ningún material animal es tan fácil de coger como las heces. Para animales que evacuan la orina rociándola (por ejemplo, los felinos), las muestras fecales representan una práctica alternativa.

4.2.4 Medición del cortisol en pelo

El lento crecimiento del pelo significa que la escala de tiempo sobre la que podemos medir los niveles de cortisol de un animal hace que sea de semanas o meses en lugar de horas o días. La característica principal que hace atractivo el análisis de cortisol en pelo es que proporciona un perfil endocrino a largo plazo y se puede medir la actividad hormonal comprendida en el periodo escogido (Accorsi *et al* 2008). Esto hace que el pelo sea un medio de estudio muy útil para examinar los efectos de los estresores crónicos, sin embargo, debido al lento crecimiento del pelo, este método no permite estudiar cortos periodos de tiempo como las fluctuaciones diarias de la circulación hormonal (Koren *et al* 2002).

La toma de muestras de pelo es relativamente sencilla y no implica peligro para la integridad física a la hora de tomarlas. Además, el pelo es muy fácil de

conservar y no se ve afectado por las variaciones de contenido en agua. Sin embargo, para analizar el contenido de la hormona hay que proceder a su extracción. Dos puntos de muestreo son suficientes para determinar la tendencia del comportamiento endocrino, y consisten en afeitar una zona del cuerpo en el momento en el que comienza el estudio y volverla a afeitar y recoger la muestra de pelo cuando el periodo de tiempo de estudio ha concluido. Este método está limitado por el momento ya que ha de ser validado, y la ruta que siguen los glucocorticoides hasta ser incorporados y metabolizados en el pelo necesita ser comprendida en profundidad.

4.2.5 Medición del cortisol en plumas

Las plumas son también registros a largo plazo de los niveles de glucocorticoides, pero la naturaleza de su crecimiento puede ofrecer más flexibilidad que el pelo. Algunas plumas tienen bandas que corresponden a los ciclos de crecimiento diarios (Grubb 1989) que pueden ser utilizadas para proporcionar una cronología más detallada de la exposición a los glucocorticoides. Recortando la pluma por las bandas específicas de crecimiento y midiendo el nivel de glucocorticoides en varios puntos a lo largo de la longitud de la pluma, podemos determinar la historia de glucocorticoides a la que ha sido expuesta (Bortolotti *et al* 2009). Al igual que en el pelo, para determinar el contenido de cortisol en plumas hay que proceder a su extracción.

El estudio de los glucocorticoides en pelo y plumas se encuentra en su primer estadio. Hay muy pocos estudios (con un número muy bajo de muestras) que han empleado estos elementos y, además, muy pocos han hecho algún intento para establecer si los niveles de glucocorticoides que hay en plumas y en pelo reflejan con exactitud a largo plazo los niveles plasmáticos de esta hormona (Sherif *et al* 2011).

4.2.6 Medición del cortisol en leche

La concentración del cortisol en leche refleja el nivel plasmático, lo cual se ha comprobado mediante pruebas dinámicas de estimulación del eje corticotropo tras la administración de ACTH (Bremen y Gangwer 1978, Fox *et al* 1980, Shutt y Fell 1985). La concentración de cortisol en leche no depende de la dilución o del volumen de leche producido (Fox *et al* 1981) por lo que no es necesario aplicar factores de corrección, como ocurre con el cortisol en orina.

A diferencia del cortisol en orina o los metabolitos del cortisol en heces, el cortisol en leche refleja el nivel de cortisol plasmático durante un periodo de tiempo corto. Cambios de nivel de cortisol durante el ordeño o previo a él e incrementos prolongados o crónicos, debidos a estrés u otros factores son detectados al determinar el cortisol en leche. Sin embargo, los cambios del nivel de cortisol que ocurran 4 horas antes del momento del ordeño no son detectados pues este es el tiempo que el cortisol vuelve a reestablecer el equilibrio (Verkerk *et al* 1998).

4.2.7 Medición del cortisol en agua

Existen otros métodos de medición del cortisol, como medir los niveles de glucocorticoides en el agua, como método no invasivo de la evaluación del estrés en peces. Los glucocorticoides libres se filtran al agua a través de las agallas de los peces y tras un complejo proceso para concentrar esta hormona hasta un nivel detectable, puede ser medida. Esta técnica requiere que los peces estén aislados en tanques independientes, por lo que hace difícil su aplicación en peces que vivan en libertad (Scott *et al* 2008).

4.2.8 *Medición del cortisol en huevos*

Otra técnica que tiene una relevancia particular en el estudio del nivel de estrés de las hembras de especies ovíparas es el análisis de glucocorticoides en huevos. Durante la puesta los glucocorticoides son depositados en el huevo por la madre y éstos reflejan el nivel de estrés de ella. Se ha observado que en aves, la yema del huevo es producida en capas las cuales contienen diferentes cantidades de esteroides, que con los gestágenos que aparecen en elevadas concentraciones, pueden interferir en la medida de concentraciones bajas de glucocorticoides (Rettenbacher *et al* 2009). La capacidad de medir y manipular las concentraciones de glucocorticoides en huevos ha permitido a los investigadores estudiar el efecto de los glucocorticoides embrionarios exponiéndolos a numerosas medidas de desarrollo, comportamiento, fisiología y salud, como por ejemplo la proporción de sexos en dos especies de lagartos (Warner *et al* 2009), sensibilidad al estrés en peces (Auperin y Geslin 2008) supervivencia y simetría en peces (Gagliano y McCormick 2009) y a la eficiencia de vuelo en aves (Chin *et al* 2009).

5 DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

5.1 Elefante asiático (*Elephas maximus*)

Los elefantes son posiblemente los animales mejor conocidos del reino animal. El enorme tamaño, la peculiar anatomía y la longevidad de los elefantes han fascinado a los humanos desde hace miles de años. Hoy en día, su inteligencia, sus fuertes lazos familiares y el atractivo de sus crías siguen atrayéndonos a muchos de nosotros. Los elefantes han servido a los humanos como mero medio de transporte, como vehículo para llevar a los soldados a la guerra y como trabajadores en la industria maderera. Pero, a pesar de la larga asociación de los elefantes con el hombre, nunca han sido realmente domesticados. Los elefantes evocan fuertes emociones y opiniones. Dependiendo



Figura 3. Elefante asiático en Terra Natura

de las circunstancias, los elefantes pueden ser considerados como objetos de culto, bestias de carga, alimento para una aldea, especies en peligro de extinción dignas de los esfuerzos de conservación más elevados o como asesinos de cosechas (Fowler y Mikota 2006).

Los elefantes en cautividad fueron originalmente tenidos en colecciones de animales salvajes que pertenecían a la realeza desde hace al menos 3500 años (Croke V 1997). Los elefantes persistieron en las montañas del norte de Mesopotamia en tiempos remotos. Existen datos de que la ciudad sumeria de Ur (2000 a.C) tenía elefantes cautivos en jardines zoológicos (Gröing y Saller 1998). También estuvieron presentes en colecciones en Asiria, durante los reinados de Tiglath-Pileser I (1100 a.C) y Ashurnasirpal II (884-858 a.C). Thutmose III (1504-1450 a.C) no sólo cazaba elefantes sino que se llevaba especímenes vivos a su colección de plantas y animales en Tebas (Sukumar 2003a). La popularidad de las colecciones de animales pertenecientes a la realeza menguó durante la Edad Media, pero el interés por este tipo de colecciones y la exposición de animales exóticos resurgió con los exploradores del siglo XVI y la expansión europea. La colección de animales salvajes de Versalles mantuvo elefantes africanos desde 1665 hasta 1681 (Gröing 1998) y en el palacio de Schönbrunn en Viena se incluyeron elefantes en 1752 (Croke 1997).

A mediados del siglo XIX emergieron los zoológicos tal y como hoy los conocemos. El elefante sigue siendo uno de los animales más populares y buscados en los parques zoológicos. Se estima que la mayoría de los 1000 elefantes africanos cautivos viven en zoológicos occidentales (Sukumar 2003a). Un número similar de elefantes asiáticos se encuentran en zoológicos y circos de todo el mundo. Aunque los zoológicos sostienen que los elefantes proporcionan una oportunidad para educar al público en relación a la conservación de los

elefantes, otros sugieren que el confinamiento de estas especies en espacios pequeños plantea problemas comportamentales, veterinarios y éticos.

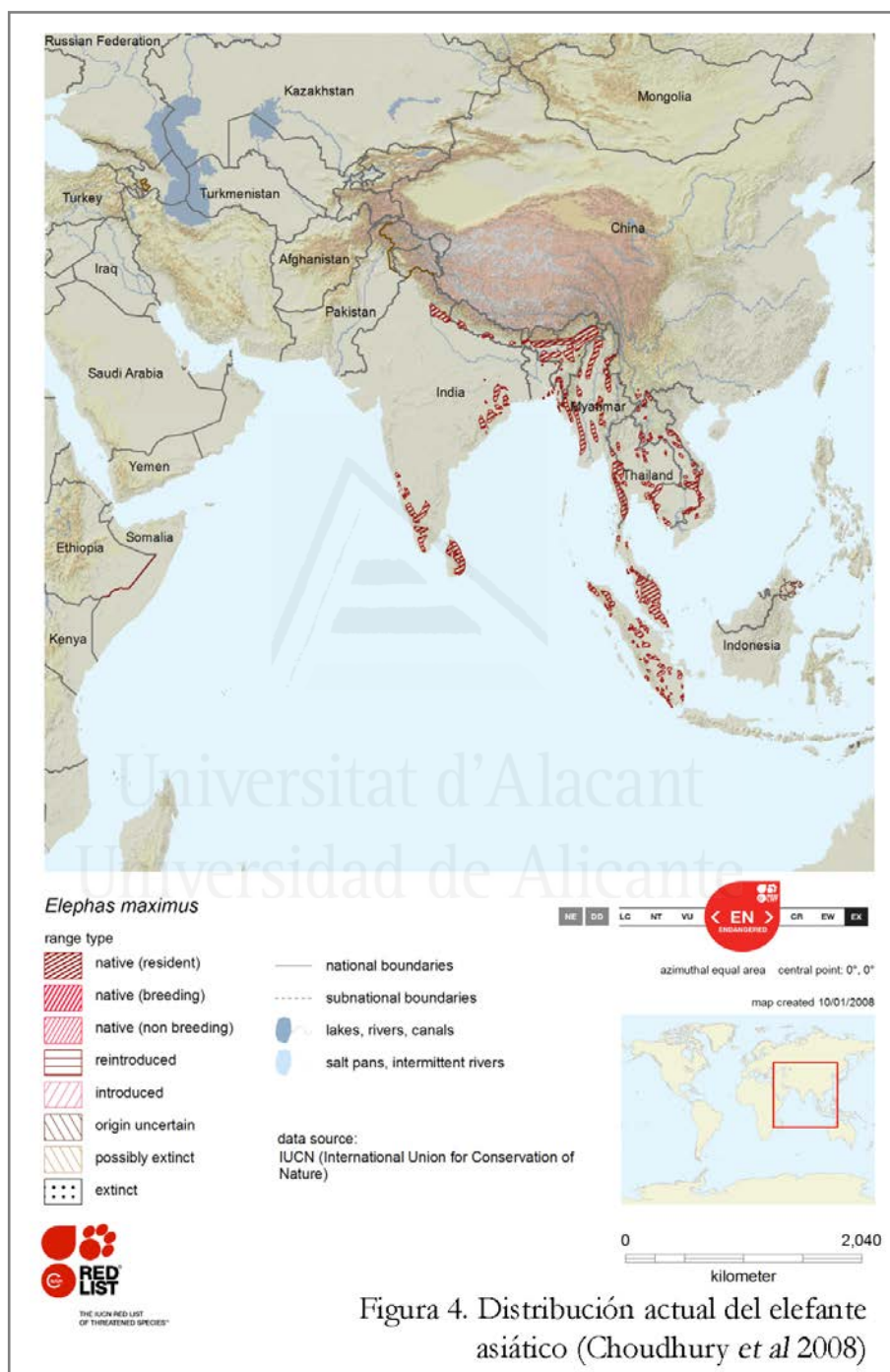


Figura 4. Distribución actual del elefante asiático (Choudhury *et al* 2008)

Hay alrededor de unos 15000 elefantes asiáticos en cautividad y quizás entre 30000 y 50000 en libertad (Sukumar 2003b). El futuro de los elefantes en cautividad no es prometedor. Los elefantes de zoológicos y circos no crían al ritmo necesario para auto mantener sus poblaciones. Los esfuerzos enfocados a revertir el declive de la población cautiva se han visto restringidos por las necesidades sociales de los elefantes. Taylor y Poole (1998) sugirieron que la clave está en los grandes grupos de manadas y el acceso continuado entre machos y hembras, pero esto es difícilmente alcanzable debido a los requerimientos espaciales de los elefantes y el bajo promedio del número de elefantes por zoo. El elevado número de elefantes asiáticos que han sido capturados para la guerra y el trabajo en el pasado han menguado las poblaciones silvestres. Además, el crecimiento de la población humana en el siglo pasado ha llevado a una fragmentación del hábitat de los elefantes salvajes sin precedentes. En Europa, la población de elefantes asiáticos en cautividad está sujeta al Programa Europeo de Cría en Cautividad (EEP), el cual pretende construir una población autosostenible de elefantes asiáticos en los zoológicos europeos.

El elefante asiático está clasificado como especie amenazada en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) y en 1975, fue incluido en el Apéndice I del CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres).

Se estima que la población total de elefantes asiáticos oscila entre 40.000 y 50.000 ejemplares (Tabla 3). La distribución del elefante asiático comprende Asia occidental a lo largo de la costa iraní adentrándose en India y extendiéndose hacia el Sureste del continente asiático incluyendo Sumatra, Java y Borneo y China

hasta el río Yantse-Kiang en una extensión total de nueve millones de kilómetros cuadrados (Figura 3) (Sukumar 2003b).

El elefante asiático está actualmente extinto en el Oeste de Asia, Java y en la mayor parte de China (Blake y Hedges 2004, Olivier 1978, Sukumar 2003b) y se encuentran en poblaciones aisladas en 13 estados con una extensión total de 486.800 kilómetros cuadrados (Blake y Hedges 2004, Sukumar 2003b) (Tabla 4).

Tabla 3. Estimaciones publicadas de la población de elefante asiático salvaje total (Fowler y Mikota 2006)

Población estimada			Superficie total (Km ²)	Año	Fuente
Mínimo	Probable	Máximo			
28.000	-	42.000	-	1978	Olivier 1978
23.000	-	41.000	-	1982	Shoshani y Eisenberg 1982
34.470	-	53.710	-	1990	Santiapillai y Jackson 1990
34.390	-	56.045	436.230	1992	Sukumar 1992
35.000	-	50.000	-	1995	WWF 2002*
34.594	42.705	50.998	-	2000	Kemf and Santiapillai 2000
34.594	-	50.998	-	2000	WWF 2002b
41.410	-	52.345	486.800	2003	Sukumar 2003b

La mayoría de las poblaciones se ven amenazadas por la caza furtiva, la pérdida de hábitat y los conflictos con humanos (especialmente los asaltos de elefantes a los cultivos) y la pérdida de la viabilidad genética como resultado del pequeño tamaño de la población y el aislamiento (Blake y Hedges 2004, Duckworth y Hedges 1998, Hedges *et al* 2005, Leimgruber 2003, Sukumar 2003b, WWF 2002a).

Tabla 4 Estatus de la población del elefante asiático en 2003 (Fowler y Mikota 2006).

País	Estatus
India	Distribución bien conocida. Algunas estimaciones son fiables, pero la mayoría de las estimaciones de la población son menos rigurosas.
Nepal	Distribución moderadamente bien conocida. Probablemente haya tres poblaciones principales. No hay estimaciones de población disponibles.
Bután	Distribución pobremente conocida o publicada. Existen poblaciones residentes pero la mayoría de los elefantes son compartidos con India. No existen estimaciones de población disponibles.
Bangla Desh	No hay estudios recientes de distribución. No existen estimaciones de población disponibles.
China	Distribución moderadamente bien conocida. Información poco precisa de abundancia relativa. No existen estimaciones de población.
Myanmar	Distribución moderadamente bien conocida. Información poco precisa de abundancia relativa; no hay estimaciones de población.
Tailandia	Distribución bien conocida. Información poco precisa de abundancia relativa; no hay estimaciones de población.
Laos	Distribución bien conocida. Información poco precisa de abundancia relativa; no hay estimaciones de población disponibles.
Camboya	Distribución moderadamente bien conocida. Alguna información poco precisa de abundancia relativa, no hay estimaciones de población.
Vietnam	Distribución de poblaciones relictas generalmente bien conocidas. Información poco precisa de abundancia relativa; no hay estimaciones de población pero cálculos recientes sugieren que quedan menos de 150 elefantes.
Malasia	Distribución moderadamente bien conocida en la península y bien conocida en el estado de Sabah. Hay poca información de la población peninsular, pero hay datos más precisos para Sabah. Los elefantes de Sabah son compartidos con el Borneo Indonesio. Hay pocos datos de calidad disponibles.
Indonesia	A mediados de los 80, Se conocían 44 poblaciones de elefante distribuidas por ocho provincias de Sumatra, de las que 12 se encontraban en la provincia de Lampung. En 2003, sólo quedan 3 de las 12 poblaciones de Lampung. Queda un número desconocido de otras poblaciones en Sumatra. La distribución es moderadamente bien conocida en Kalimantan. Hay estimaciones robustas para dos lugares en Sumatra (Bukit Barisan Selatan y el Parque Nacional de Way Kambas). Hay poca información sobre de abundancia relativa en otros sitios.
Sri Lanka	Distribución bien conocida. Hay información poco precisa de abundancia relativa. No hay estimaciones de población disponibles.

5.2 Rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*)

El rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*) es una de las tres especies de rinocerontes que existen actualmente en Asia. Las otras dos son el rinoceronte de Java, del que sólo quedan unos 80 ejemplares (WWF 2002a), con la que el rinoceronte indio está estrechamente emparentada, y el rinoceronte de Sumatra, del que quedan apenas 300 ejemplares (WWF 2002a). Históricamente, el rinoceronte indio se extendía por toda la parte norte del sub-continente Indio, a lo largo de la cuenca de los ríos Indo, Ganges y Brahmaputra, desde Pakistán hasta la frontera Indo-Birmana, incluyendo partes de Nepal, Bangla Desh y Bután, pudiendo haber existido en Myanmar, sudeste de China e Indochina, aunque no se sabe con certeza.

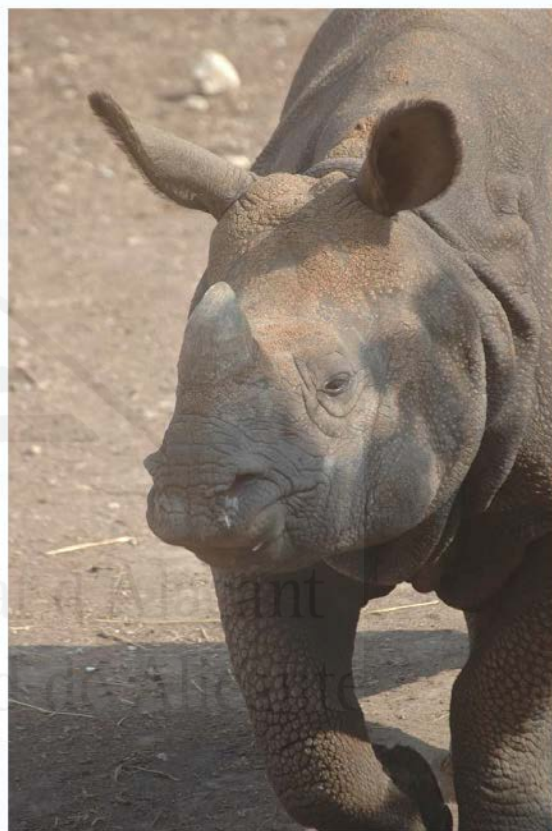


Figura 5. Rinoceronte indio en Terra Natura

La especie fue muy común en el noroeste de India y Pakistán hasta el año 1600, pero entre 1600 y 1900 desapareció de esta región bruscamente de forma que la especie llegó a estar al borde de la extinción, alcanzando tan solo 200 ejemplares a principios del siglo XX. Actualmente el rinoceronte indio se encuentra clasificado como “Vulnerable” por la Lista Roja de la UICN. Existen unas pocas y pequeñas subpoblaciones en Nepal e India (al oeste de Bengala,

Uttar Pradesh y Asma), y el número total de ejemplares oscila entre 2800 y 2850 (Grupo Especialista en Rinoceronte Asiático). A esta especie se le puede encontrar en los parques nacionales de Kaziranga y Manas, en la provincia india de Assam, y en el Parque Nacional Real de Chitawan en Nepal (Figura 4).

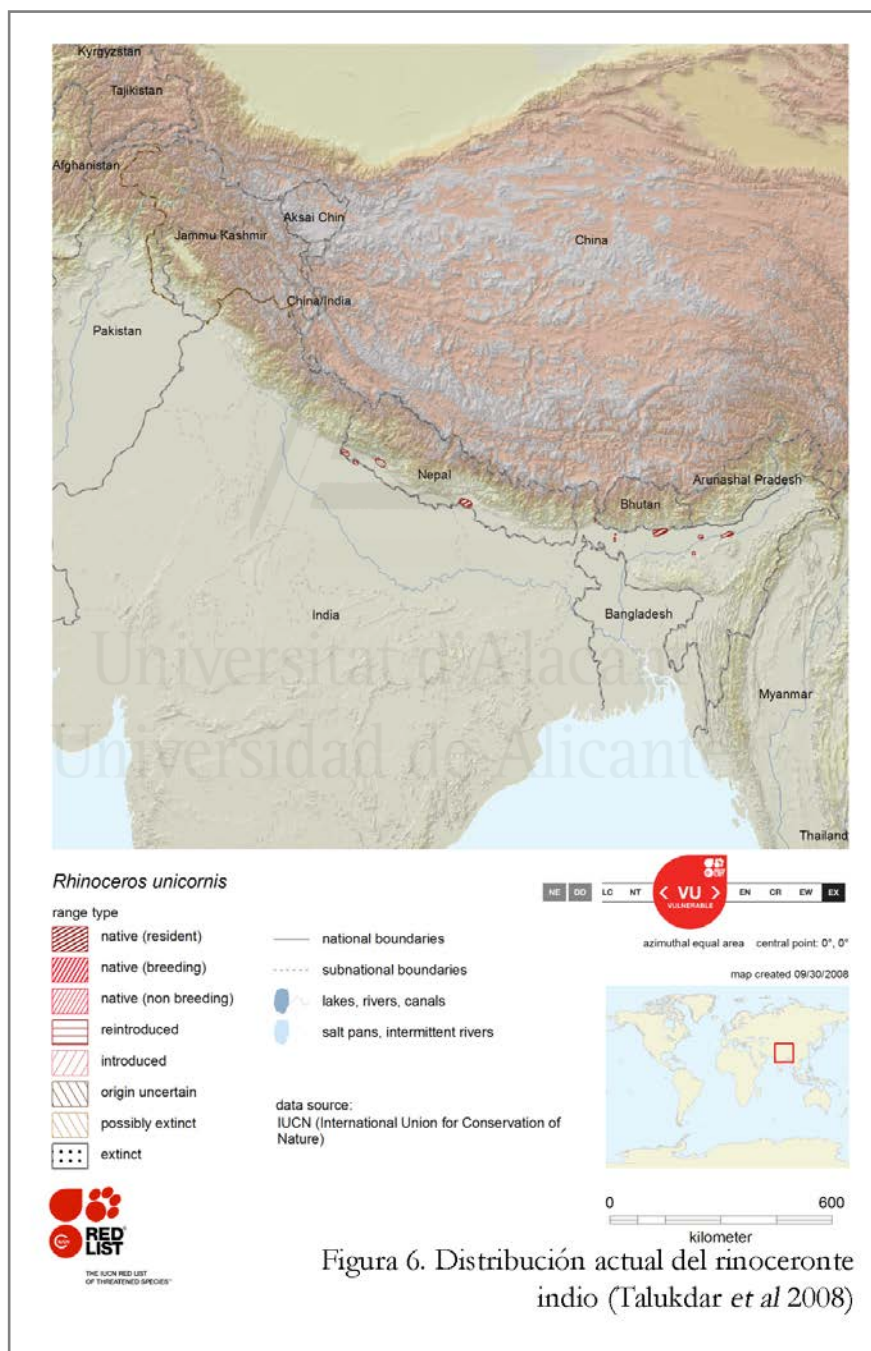
El rinoceronte indio habita en las praderas del Terai de la ribera del río Brahmaputra. La especie prefiere estas praderas aluviales, aunque también se la ha visto en pantanos y bosques adyacentes. Las poblaciones están actualmente confinadas en hábitats rodeados por paisajes dominados por el hombre, por lo que estos rinocerontes aparecen con frecuencia en áreas adyacentes cultivadas y en pastos. Su dieta está compuesta mayoritariamente por hierbas, ocasionalmente frutas, hojas, arbustos, ramas de árboles y cosechas (Talukdar *et al* 2008), y también chupan minerales regularmente.

La altura de los hombros está comprendida entre los 1.75 y los 2 metros, y su peso oscila entre los 1800 y los 2700 Kg. Pueden alcanzar velocidades de hasta 55 kilómetros por hora en tramos cortos. También son excelentes nadadores y pasan más tiempo semisumergidos en charcas y lagos que otros rinocerontes, mientras se alimentan de plantas de ribera. Otras características típicas de esta especie son la piel dividida en placas a modo de coraza y la presencia de un sólo cuerno corto, sobre la nariz, de entre 20 y 61 centímetros de longitud. Éste es más largo en los machos que en las hembras, las cuales son de menor tamaño y peso que los machos.

Las hembras tienen su primera cría después de cumplir 6 años, mientras que los machos alcanzan la madurez sexual a los 9. Son animales poco sociables y en general solitarios, aunque toleran la presencia de otros rinocerontes en su territorio. A veces se mueven en parejas e incluso en grupos familiares, pero lo normal es que los machos sólo se relacionen con las hembras cuando éstas les hacen saber que desean reproducirse. Después del apareamiento, las hembras

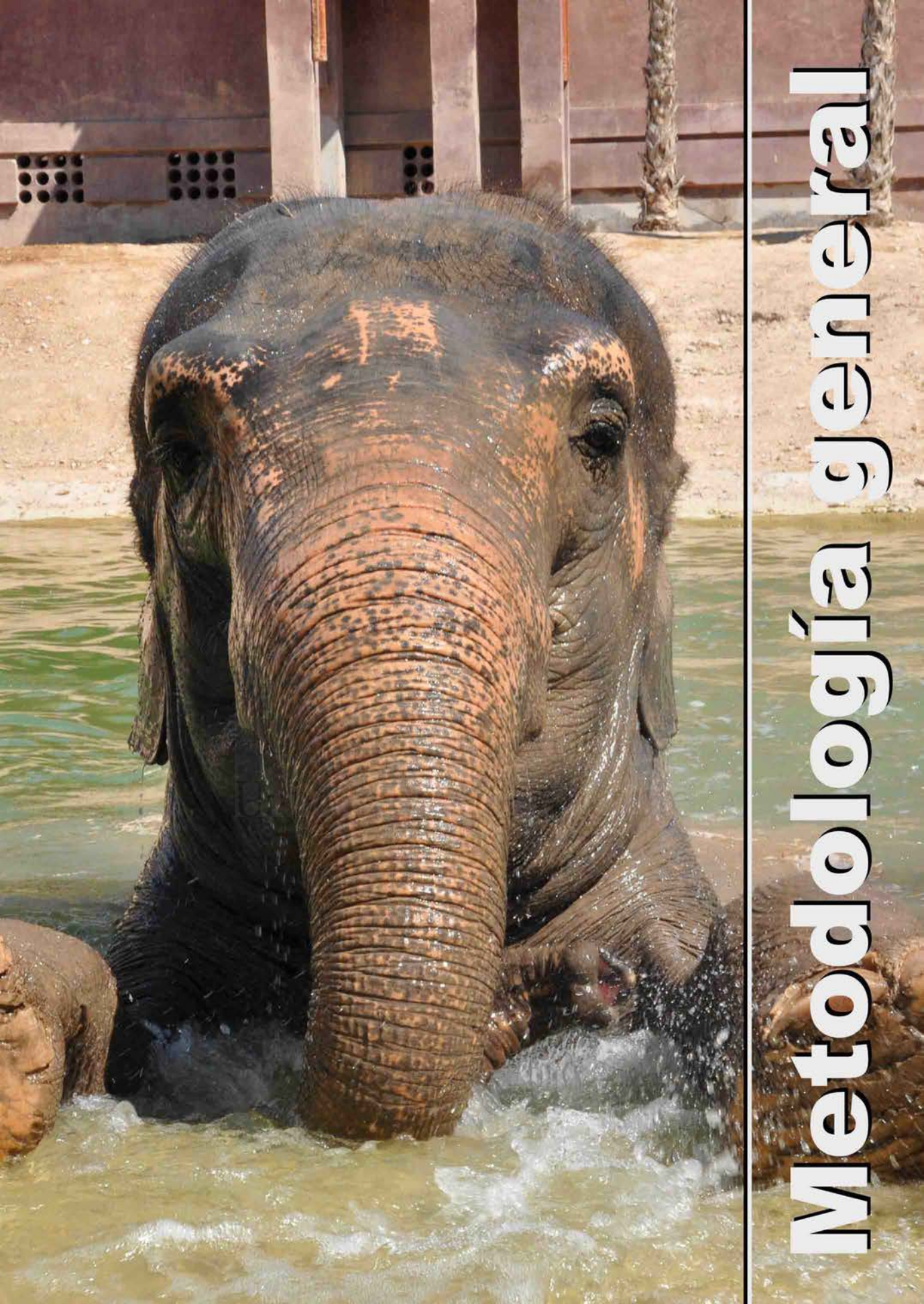
INTRODUCCIÓN GENERAL

paren una sola cría tras 16 meses de gestación. El intervalo entre un parto y otro es de unos 3 años. Debido a su tamaño, los rinocerontes adultos son invulnerables a los depredadores, pero las crías desatendidas pueden ser presas fáciles para el tigre.



Esta especie disminuyó en su número casi hasta su extinción a principio del siglo XX, debido principalmente a la conversión indiscriminada de las praderas aluviales en campos de cultivo, lo cual hizo que los rinocerontes y los hombres entraran en conflicto y haciendo que esta especie fuera más accesible para los cazadores. El deporte de la caza se puso de moda a finales del siglo XIX y a principios del siglo XX. Un cambio completo y rápido en la política del gobierno llevó a proteger la mayoría de las poblaciones de rinoceronte que quedaban. Sin embargo, la caza furtiva de rinocerontes para utilizar el cuerno en la Medicina Tradicional China ha sido un gran obstáculo para lograr el éxito en la protección de esta especie, por lo que India y Nepal han tenido que incrementar los esfuerzos para mantener y preservar la protección de esta especie (Talukdar *et al* 2008).

En la actualidad la especie se encuentra catalogada como “Vulnerable” y, al igual que el elefante asiático, la población cautiva de Europa está sujeta al Programa Europeo de Cría en Cautividad (EEP).



Metodología general

1. METODOLOGÍA GENERAL

1.1. Emplazamiento.

Los estudios que componen esta tesis se realizaron en el parque zoológico Terra Natura, de Benidorm, Alicante, España (38°32'N, 0°08'O). Terra Natura es un parque de animales denominado de “Zooinmersión”, en el que el diseño de hábitats permite tomar contacto con animales existiendo barreras de protección que pasan desapercibidas a los ojos de los visitantes. Dispone de una extensión total de 320.000 metros cuadrados, distribuidos en distintas áreas, que corresponden a diferentes continentes en los que se encuentran algunas especies características.

1.1.1. *Instalaciones de los elefantes*

Cuadras: Las cuadras de los elefantes son unos recintos cubiertos, compuestos por varios habitáculos en los que los animales pernoctan. Los habitáculos o jaulas son espacios separados por barrotes metálicos entre los que pueden pasar personas, pero la distancia entre barrotes impide el paso de los elefantes. Estos recintos permiten el contacto visual entre los individuos y el contacto físico entre ellos si se acercan lo suficiente a los barrotes. El número total de jaulas es de once, y sus dimensiones oscilan entre los 40 y los 70 metros cuadrados. La altura de los barrotes de las jaulas es de 3,50 metros, siendo la altura de la cubierta del recinto de 6 metros.

Praderas: Durante el día (de 9 de la mañana a 7 de la tarde) los elefantes salen al aire libre a tres praderas de 3000, 5000 y 8000 metros cuadrados de

superficie. Estas praderas están dotadas de lagos artificiales, cascadas, laderas, vegetación, arbustiva y arbórea, estructuras bajo las que pueden encontrar sombras, piedras dispuestas a modo de pequeños montículos y troncos tumbados sobre el suelo.



Figura 1. Pradera de los elefantes en Terra Natura

1.1.2. Instalaciones de los rinocerontes.

Cuadras: Las cuadras de los rinocerontes son recintos cubiertos compartimentados en dos habitáculos en los que pernoctan los animales. Las jaulas de los rinocerontes están dispuestas correlativamente una al lado de la otra y están separadas entre sí mediante muros de hormigón, permitiendo el contacto visual entre individuos a través de una puerta de barrotes que las conecta. Los animales tienen acceso visual al pasillo que une las dos cuadras. El lado de la jaula que da al pasillo está cerrado por unos barrotes y tiene una puerta de barrotes también por lo que los animales pueden observar el trasiego de sus cuidadores.

Praderas: Durante el día (de 9 de la mañana a 7 de la tarde) los rinocerontes salen a una pradera de 2000 metros cuadrados de superficie, equipada con un lago artificial, vegetación arbustiva y arbórea, sombras bajo las que cobijarse, piedras que conforman pequeños montículos y troncos caídos en el terreno.



Figura 2. Pradera de los rinocerontes indios en Terra Natura

1.2. Animales.

1.2.1. Elefantes asiáticos.

Los individuos que forman parte de los estudios que componen esta tesis son 8 hembras de elefante asiático, con edades comprendidas entre los 21 y 46 años de edad (Momo: 21, Grande: 24, Kaisoso: 24, Tania 31, Petita 34, Motki 37, Jasmin 40 y Baby, 46 años). Tres de los elefantes (Tania, Jasmin y Motki) llegaron al parque zoológico Terra Natura en el mes de agosto de 2004 provenientes del Safari Park de Gäsendorf (Austria); otros tres elefantes (Petita, Baby y Kaisoso) llegaron en diciembre del mismo año desde el Safari Park de Vergel, Alicante (España), mientras que las otras dos (Grande y Momo) llegaron en el mes de

mayo de 2005, también desde el Safari Park de Gäsendorf (Austria). Uno de los elefantes (Baby) dormía sola en una de las jaulas de la cuadra debido a que tenía conflictos con otras elefantes, cuatro de ellas dormían por pares (Kaisoso con Petita y Momo con Grande) y las tres restantes lo hacían conjuntamente (Tania, Modki y Jasmin).

1.2.2. Rinocerontes indios.

Los rinocerontes indios que forman parte de los estudios que se han realizado en esta tesis son dos hembras de 3 y 4 años de edad (Shiwa y Nisha), respectivamente, que llegaron al parque zoológico Terra Natura en marzo del año 2003, provenientes del Zoo de Munich (Alemania). Estas rinocerontes dormían en jaulas separadas.

La dieta de ambas especies consistía en avena, ramas, frutas y vegetales, y se les proporcionaba agua *ad libitum*. Todos los animales fueron entrenados y mantenían un contacto directo con sus cuidadores, a los que estaban habituados.

1.3. Toma de muestras.

Las muestras de saliva se tomaron empleando el kit Salivette® (Sarstedt, AG & Co, Numbrecht, Alemania), que consiste en un cilindro de algodón que, tras absorber la saliva, es depositado en un tubo perforado en su base, el cuál, se introduce en de otro tubo cerrado. Estos tubos son sometidos a un centrifugado a 2000 rpm durante dos minutos, y de este modo se obtiene saliva eluída, que es almacenada a -20°C hasta su análisis.

1.4. Análisis hormonal.

El cortisol salivar se midió por duplicado empleando el radiomnunoanálisis (RIA) Coat-A-Count® (Siemens Medical Solutions Diagnostics). El procedimiento Coat-A-Count es un radioinmunoanálisis en fase sólida, en el cual el cortisol marcado radiactivamente con I¹²⁵ compite, durante un periodo de tiempo determinado, con el cortisol de la muestra por las zonas de unión de los anticuerpos. Debido a que el anticuerpo está unido a la pared de un tubo de polipropileno, la decantación del sobrenadante es suficiente para determinar la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo del cortisol marcado. La descomposición radiactiva de los isótopos de I¹²⁵ que contiene el tubo se mide en un contador gamma y da un número que, mediante una curva de calibración, se convierte en una medida del cortisol presente en la muestra analizada. La lectura de tubos se realizó con el modelo Packard Cobra (Auto-Gamma® 5000 series, Cobra 5005, Packard Instruments Company). Se necesitó un mínimo de 0,4 ml de saliva para realizar el análisis por duplicado de cada muestra (Menargues 2008). Se introdujo un punto más en la curva estándar del kit de análisis, realizando una dilución de 1:10 en los estándares de la curva y aumentando el periodo de incubación hasta 24 horas para incrementar la sensibilidad del análisis (López-Mondéjar 2006).

OBJETO DE LA TESIS “Evaluación del bienestar del elefante asiático (*Elephas maximus*) y del rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornis*) en cautividad a través del cortisol salivar”.

La presente tesis estudia la medición del bienestar animal mediante el análisis del cortisol salivar como herramienta en el manejo de elefantes asiáticos y rinocerontes indios en parques zoológicos, para conocer y mejorar las condiciones de cautividad de estos animales con el fin de mejorar su bienestar. Estas dos especies se encuentran catalogadas en el Libro Rojo de la UICN como amenazada y vulnerable (elefante asiático y rinoceronte indio, respectivamente) y en el apéndice I del CITES, estando sujetas al Programa Europeo de Cría en Cautividad (EEP), por lo que el estudio y seguimiento de su bienestar son de elevada importancia para garantizar el éxito reproductivo de éstas.

En España, existen varias tesis que estudian el estrés de algunas especies mediante glucocorticoides, como, por ejemplo, a través de metabolitos del cortisol en heces, en el corzo (*Capreolus capreolus*), y en el mono aullador de manto (*Alouatta palliata mexicana*), y mediante el cortisol salivar en el rebeco pirenaico (*Rupicapra pyrenaica*).

En la tesis “Valoración del estrés de captura, transporte y manejo en el corzo (*Capreolus capreolus*). Efecto de la acepromacina y de la cautividad” (Montané 2002), el objetivo del estudio fue: evaluar la respuesta de estrés de captura, manejo y transporte en el corzo y sus posibles consecuencias; valorar el efecto de la acepromacina sobre dicha respuesta; establecer posibles diferencias en la respuesta de estrés agudo entre corzos salvajes y cautivos; y evaluar la idoneidad de la determinación de metabolitos del cortisol en heces como método no agresivo para medir la actividad adrenocortical en el corzo.

Otra tesis relacionada con el estrés animal es “Capture, restraint and transport stress in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*). Modulation with acepromazine and evaluation using physiological parameters” (López 2005), cuyos objetivos fueron valorar el estrés de captura, manejo y transporte en el rebeco pirenaico capturado mediante redes verticales, y determinar la viabilidad de técnicas no invasivas (frecuencia cardíaca, temperatura rectal y cortisol salival) para medir la respuesta de estrés.

La tesis titulada “Efectos de la transformación del hábitat en la conducta y niveles de estrés de *Alouatta palliata mexicana*” (Vegas 2008) tenía como objetivo general evaluar si las poblaciones de mono aullador de manto en la zona de Los Tuxtlas (México) se veían negativamente afectadas por los efectos de la fragmentación de su hábitat, en particular por aquellos relacionados con el estrés, así como la posible influencia de tales efectos sobre la competencia intragrupo por el alimento, y distintos aspectos de su reproducción. Se midieron diversos parámetros fisiológicos (glucocorticoides fecales) y conductuales de tres grupos de aulladores, cada uno en un fragmento de selva con características socio-ecológicas distintas, reflejo de un gradiente en la calidad de hábitat entre tales fragmentos.

A diferencia de estos trabajos, en la presente tesis doctoral se estudia el bienestar del elefante asiático y del rinoceronte indio a través del cortisol salivar. La importancia de este estudio reside en que es un método objetivo y fiable de detección de niveles de estrés en estas especies y puede ser una herramienta útil a la hora de tomar decisiones de manejo de estos animales en parques zoológicos de todo el mundo. Además, los datos publicados en el presente estudio pueden servir como referente a la hora de evaluar el bienestar de estas especies en otros

lugares y poder comparar el estado de estrés de las distintas poblaciones cautivas de estos animales.

Esta tesis se divide en dos secciones, en las que cada una aborda diferentes aspectos en lo que se refiere al empleo de esta técnica no invasiva de medición de estrés. En la primera sección se valida la técnica de la medición del cortisol salivar en el elefante asiático y el rinoceronte indio y se estudia y discute el efecto que provoca en estas especies la apertura de un parque zoológico. También se estudia cómo afectan al bienestar de los elefantes diferentes estresores externos e internos de distinta naturaleza como: el entrenamiento dirigido a la realización de un espectáculo; la llegada de un nuevo grupo de elefantes a una manada establecida; y una discapacidad en la trompa de un elefante. En la segunda sección, se estudian los patrones de secreción de cortisol salivar circanuales del elefante asiático y del rinoceronte indio, y circadianos del elefante.

El objetivo general de la presente tesis es determinar un medio de análisis objetivo del bienestar del elefante asiático y del rinoceronte indio mediante el análisis de la concentración de cortisol salivar.

Los objetivos específicos de la presente tesis son:

- Validar el método de análisis de cortisol salivar mediante RIA en el elefante asiático y el rinoceronte indio.
- Establecer el patrón de secreción estacional de cortisol en el elefante asiático y el rinoceronte indio, y el patrón circadiano de secreción de esta hormona del elefante asiático para poder conocer y evaluar el significado fisiológico de las fluctuaciones de dicha hormona a lo largo del día y del año, con el fin de interpretar los

datos de cortisol obtenidos de los individuos en la evaluación de bienestar de esta especie.

- Evaluar cómo afectan diferentes estresores externos e internos de distinta naturaleza al bienestar de los elefantes con el fin de determinar el efecto de estos agentes sobre el bienestar de esta especie para tomar decisiones en el manejo de la misma especie que mejoren su bienestar.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

SECCIÓN I



**VALIDACIÓN DEL MÉTODO Y EVALUACIÓN
DEL BIENESTAR EN EL ELEFANTE ASIÁTICO
Y EL RINOCERONTE INDIO**

**Welfare assessment through
salivary cortisol measurement
in captive Asian elephants and
Indian rhinoceros during
zoo opening period.**

Capítulo I

**Menargues A, Urios V, Mauri M 2008
Animal Welfare 17, 305-312.**

ABSTRACT

The measurement of salivary cortisol allows non-invasive assessment of welfare in captive animals. We utilised this technique to test the effect of zoo opening on six Asian elephants and two Indian rhinoceros at the Terra Natura Zoological Park, Alicante, Spain, during pre-opening, opening and post-opening periods. Salivary cortisol concentrations were found to be significantly higher during the opening period than during pre- and post-opening periods for both species. This method could prove a useful tool in monitoring the success of decisions taken to improve the welfare of captive animals.

Keywords: Animal welfare, Asian elephant, Indian rhinoceros, salivary cortisol, stress.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. INTRODUCTION

One of the most important objectives of zoological parks is maintaining the psychological and physiological wellbeing of animals in their care. Changes in the animals' life such as acute environmental or social upheaval (eg introduction to novel environments and new group formation) can be extremely stressful (Soltis *et al* 2003). Although no widely-held definition exists, stress generally refers to a variety of responses to internal or external stimuli (stressors) that modify the homeostasis of an individual. These stimuli can be physical, physiological, behavioural or psychological factors (Dantzer & Mormede 1983, Stratakin & Chrousos 1995). Immediately following exposure to a stressor, activation of the hypothalamicpituitary- adrenal axis occurs and glucocorticoids are released from the adrenal cortex (Munck *et al* 1984). Thus, corticosteroids and glucocorticoids are secreted in response to stress and these can provide information regarding the physiological well-being of animals (Whitten *et al* 1998).

Plasma cortisol has been used to evaluate animal stress responses to capture and translocation (Morton *et al* 1995, Denhard *et al* 2001), disturbances within their environment (Zoldag *et al* 1983, Powell *et al* 2006) or psychogenic stress (Haemisch 1990) but capture and handling, along with blood sample collection via venipuncture, can be stressors themselves, leading to increased plasma cortisol concentration (Cook *et al* 1973, Dawson & Howe 1983, Sabatino *et al* 1991, Whitten *et al* 1998, Schoech *et al* 1999, Romero & Romero 2002).

Non-invasive glucocorticoid collection techniques allow accurate monitoring of stress without the bias of capture induced or disturbance-induced increases in cortisol levels (Hamilton & Weeks 1985, Harper & Austad 2000, Millspaugh *et al* 2001, Washburn & Millspaugh 2002). Measurement of

glucocorticoids via analysis of faecal samples has been used to monitor stress responses in different species (Wasser *et al* 2000, Von der Ohe & Servheen 2002, Shepherdson *et al* 2004, McKenzie & Deane 2005, Lane 2006). Another such method is saliva collection which can be used with habituated or laboratory-housed animals. The use of salivary cortisol levels to monitor stress has been validated in humans (see Kirchbaum & Hellhammer 1994 for a review) and other species such as dogs (*Canis familiaris*) (Vincent & Michell 1992, Beerda *et al* 1996, rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) (Boyce *et al* 1995), squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) (Fuchs *et al* 1997), and tree shrews (*Tupaia belangeri*) (Ohl *et al* 1999). This technique has also been used in Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) (Kuckelkorn & Dathe 1990) and in Asian elephants (*Elephas maximus*) (Dathe *et al* 1992). Studies in pigs (*Sus scrofa*) have revealed that salivary cortisol is related to free plasma cortisol and represents approximately 10% of the concentration in plasma (Haeckel 1989; Parrot *et al* 1989). Saliva samples are easy to collect and store and sampling can be performed frequently, which is of particular importance as it allows acute stress to be monitored by measuring short-term changes in cortisol levels (Queyras & Carossi 2004).

In this study we used salivary cortisol. Non-invasive techniques of glucocorticoid collection allow an accurate monitoring of stress without the bias of capture-induced or disturbance-induced increases in cortisol levels (Hamilton & Weeks 1985, Harper & Austad 2000, Millspaugh *et al* 2001, Washburn & Millspaugh 2002). Measurement of glucocorticoids via analysis of faecal samples has been used to monitor stress responses in different species (Mc Kenzie and Deane 2005, Wasser *et al* 2000, Lane 2006, Von der Ohe and Servheen 2002, Shepherdson *et al* 2004). Another such method is saliva collection, which can be used with habituated or laboratory-housed animals. The use of salivary cortisol levels to monitoring the stress has been validated in humans (see Kirchbaum & Hellhammer 1994 for a review) and such as dogs (*Canis familiaris*) (Beerda *et al* 1996, Vincent & Michell 1992), rhesus monkey (*Macaca mulatta*) (Boyce *et al* 1995),

squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) (Fuchs *et al* 1997), and tree shrew (*Tupaia belangeri*) (Ohl *et al* 1999). This technique has also been used in Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) (Kuckelkorn & Dathe 1990) and in Asian elephants (*Elephas maximus*) (Dathe *et al* 1992). Studies on pigs (*Sus scrofa*) have demonstrated that cortisol present in saliva is related to free plasma cortisol and represents approximately 10% of the concentration in plasma (Haeckel 1989, Parrot *et al* 1989). Saliva samples are easy to collect and store and sampling can be performed frequently, which is particularly important as it allows acute stress to be monitored by measuring short-term changes in cortisol levels (Queyras & Carossi 2004).

In this study we used salivary cortisol to assess the degree to which zoo opening affected stress levels of Asian elephants and Indian rhinoceros and also sought to assess the viability of this method in terms of monitoring animal welfare in captivity and providing a tool for testing the success of management decisions designed specifically to improve or maintain welfare.

2. METHODS

2.1 Location

The study was conducted at Terra Natura Zoological Park, Alicante, Spain. Salivary cortisol concentrations were recorded from Asian elephants and Indian rhinoceros for three separate timeperiods: (1) pre-opening, ie during the month prior to opening (15th February–14th March 2005), at which time animals were confined to their cages and internal courtyards; (2) opening, ie when the zoo opened its doors for the very first time and throughout the month that followed (15th March–14th April 2005), during which time the animals spent their days in dry meadows and had direct visual contact with not only zoo visitors but also the final remnants of the construction work which had yet to be completed and (3)

post-opening, ie the following month (15th April–14th May 2005), during which time animals were found in their prairies and were in direct visual contact with visitors. By this point the construction work, which had consisted of excavation, meadow and artificial lake construction, tree planting, power line, water and sewage line installation and the construction of ancillary buildings (eg stables, offices, restaurants, shops, etc), was completed.

2.2 Animals

Six adult female Asian elephants, ranging from 23 to 45 years of age and two juvenile female Indian rhinoceros aged three and five years, were studied. Three of the elephants (Tania, Jasmin and Motki) arrived at Terra Natura Zoological Park in August 2004 from Austria (Gänserndorf Safari Park) whilst the others (Petita, Baby and Kaisoso) arrived in December 2004, having previously resided at the Vergel Safari Park (Vergel, Alicante, Spain). The rhinoceros arrived in March 2003: Nisha from Stuttgart Zoo and Shiwa from Munich Zoo. At night, each rhinoceros was housed in an individual cage measuring $4 \times 5 \times 2.50$ m (length $\times$ width $\times$ height) and during the day (09:00 to 18:00h), they ranged freely in a 2,000 m² meadow. One of the elephants (Baby) was housed individually in a cage measuring $5 \times 6 \times 3.50$ m during the night due to conflict with other elephants, while the rest of the herd was housed in two cages measuring $5 \times 8 \times 3.50$ m; one with a group of two individuals (Kaisoso and Petita) and the other with a group of three (Tania, Modki and Jasmin). During the day time was spent in three different 3,000 m² dry meadows. The opening period represented the first time these animals had encountered the meadows as they had been confined to the internal courtyards since arriving. Animals were fed on a diet of oats, branches, fruit and vegetables with ad libitum water. All the animals were trained and managed using free-contact by keepers with whom they became familiar. This made it possible to use saliva sampling as a non-invasive method for assessing animal welfare.

2.3. Sample collection

Saliva samples were taken on a daily basis at 07:30h during February, March, April and May 2005. Samples were always collected at this time to avoid variations in saliva cortisol concentration because at early morning there could be quite large variations within relatively small time intervals. Furthermore, animals were still in their cages and keepers got into the stables to feed the animals. Samples were collected using the Salivette® kit (Sarstedt, AG & Co, Nümbrecht, Germany) and centrifuged at 2000 rpm for two minutes at 15°C. The eluted saliva was stored at -20°C until assaying.

2.4. Hormone analyses

Salivary cortisol was measured in duplicate, using a modification of the solid-phase RIA (Coat-A-Count®; Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA) and the tubes were counted on a Packard Cobra Auto Gamma Counter. A minimum of 0.4 millilitres of saliva were needed for duplicate assay. We made modifications by increasing the analyte volume to 200 µl, in the standard curve through dilutions 1:10 of the standards calibrators in duplicate, and increasing the incubation period until 24 h to increase the assay sensitivity (López-Mondejar *et al* 2006).

2.5. Assay validation

The saliva cortisol assays of the Asian elephants and Indian Rhinoceros were validated through demonstration of the correlation between serial dilutions of pooled saliva and the standard curve (Meyer *et al* 2004). Analytical sensitivity, or minimum detection limit, was calculated by interpolation of the mean minus two standard deviations of ten replicates of the zero calibrator. Assay precision was assessed by calculating intra- and inter-assay coefficients of variation (CVs) of the

percentage bound of the internal controls. Specificity was extracted from the information supplied by the manufacturer's kit.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA), using the data of cortisol concentration obtained for each individual in order to test for differences among individual elephants and periods. The same procedure was done for rhinos. The Huynh and Feldt correction was used in Mauchly's Test of Sphericity in *E. maximus* analysis. Bonferroni multiple comparison test was used to test for pairwise differences in mean cortisol values among pre-opening, opening and post-opening periods in both species. Statistical analyses were conducted in SPSS, version 13.0 for Windows.

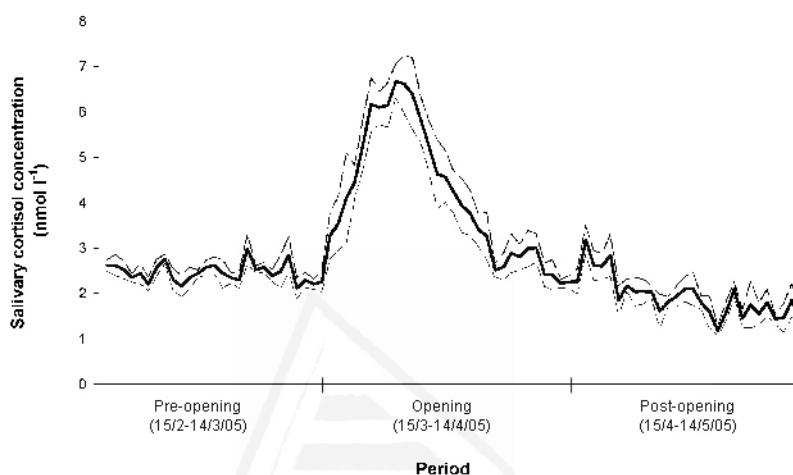
3. RESULTS

3.1. Assay validation

The dilution curve for the pooled saliva of the Indian rhinos was positively related to that the Asian elephants ($r = 0.997$, $df = 6$, $P < 0.001$). The dilution curve for the pooled saliva was positively correlated to the standard curve for the rhinos ($r = 0.962$, $df = 6$, $P < 0.001$), and the elephants ($r = 0.946$, $df = 6$, $P < 0.001$).

Figure 1

Mean salivary cortisol concentration during pre-opening, opening and postopening period in (a) Asian elephants.



Mean salivary cortisol concentration during pre-opening, opening and postopening period in (b) Indian rhinoceros.

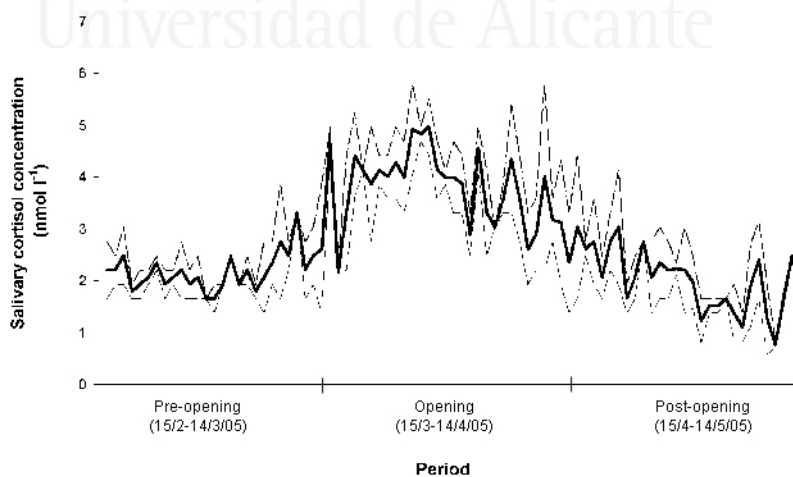
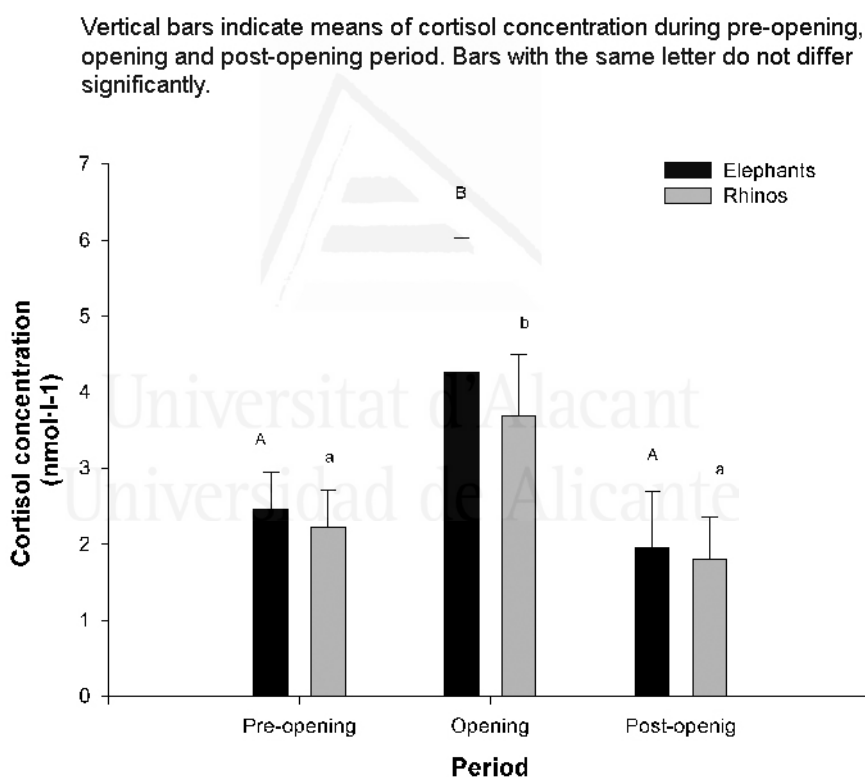


Table 1: Means of salivary cortisol of all individuals of Asian elephants and Indian rhinos during the zoo pre-opening, opening and post-opening periods.

Species	Animal	Period	Mean (nmol l ⁻¹)	SD	n
<i>Elephas maximus</i>	Baby	Pre-opening	2.49	0.39	27
		Opening	4.59	1.78	29
		Post-opening	1.97	0.87	29
		Total	3.03	1.64	85
	Jasmin	Pre-opening	2.36	0.50	27
		Opening	3.75	1.57	29
		Post-opening	1.78	0.64	29
		Total	2.64	1.32	85
	Kaisoso	Pre-opening	2.68	0.65	27
		Opening	4.95	1.90	29
		Post-opening	1.73	0.92	29
		Total	3.13	1.87	85
	Modki	Pre-opening	2.33	0.37	27
		Opening	4.17	2.15	29
		Post-opening	1.85	0.62	29
		Total	2.80	1.65	85
	Petita	Pre-opening	2.71	0.57	27
		Opening	4.35	1.76	29
		Post-opening	2.08	0.68	29
		Total	3.06	1.49	85
	Tania	Pre-opening	2.17	0.39	27
		Opening	3.32	1.38	29
		Post-opening	2.26	0.80	29
		Total	2.59	1.08	85
	Elephants	Pre-opening	2.46	0.49	189
		Opening	4.26	1.77	196
		Post-opening	1.96	0.73	210
		Total	2.87	1.51	595
<i>Rhinoceros unicornis</i>	Nisha	Pre-opening	2.15	0.59	27
		Opening	4.18	1.02	29
		Post-opening	2.36	0.99	29
		Total	2.91	1.28	85
	Shiwa	Pre-opening	2.24	0.59	27
		Opening	3.47	0.89	29
		Post-opening	1.71	0.45	29
		Total	2.48	1.00	85
	Rhinos	Pre-opening	2.22	0.49	54
		Opening	3.69	0.80	56
		Post-opening	1.89	0.56	60
		Total	2.59	1.00	170

Sensitivity was 0.82 nmol l^{-1} of cortisol, intra- and interassay coefficients of variation were 8% ($n = 10$) for Asian elephants and 5.8% ($n = 10$) for Indian rhinos. The cortisol antibody crossreactivity was: 100% with cortisol, 11.4% with 11-deoxycortisol, 2.3% with prednisone, 1% with corticosterone and cortisone, <1% with aldosterone, 11-deoxycorticosterone, dexamethasone, estriol, estrone, flumethasone, methotrexate, pregnenolone, progesterone, tetrahydrocortisol and triamcinolone.

Figure 2



3.2. Hormone analysis

The mean concentration of salivary cortisol in both elephants and rhinoceros was increased during the opening period, compared to pre- and post-

opening periods (Figure 1). Table 1 shows that for both species the lowest concentration of salivary cortisol was obtained during the post-opening period.

Repeated measures ANOVA revealed that there were significant changes in the cortisol concentration in Asian elephants ($F_{9,203, 377.341} = 5.964, P < 0.001$) and Indian rhinoceros ($F_{2, 82} = 4.694, P = 0.012$) between the pre-opening, opening and post-opening periods. Bonferroni multiple comparison tests (Figure 2) revealed that cortisol concentrations during the opening period were significantly higher than during pre- and post-opening periods for both species, but no significant differences were seen between pre- and post-opening periods' cortisol concentration for both species.

4. DISCUSSION

Glucocorticoids reflect physical and behavioural stress situations and their concentration in blood plasma is quantitatively related to the degree of stress (Dathe *et al* 1992). Saliva sampling is a preferred non-invasive means of assessing free cortisol concentration (Boyce *et al* 1995, Tiefenbacher *et al* 2003) because, depending on the collection method used, it causes less stress to the animals than collecting blood samples (Cross *et al* 2004). Salivary cortisol concentration can be used for assessing plasma cortisol concentration because it accurately reflects the concentration of the biologically active free fraction of the hormone in plasma (Haeckel 1989) and represents approximately 10% of the concentration in plasma (Haeckel 1989, Parrot *et al* 1989).

Our aim in this study was to assess a potential tool for indicating the welfare of animals during zoo openings. This was carried out through measurement of salivary cortisol concentrations in Asian elephants and Indian rhinoceros. This

non-invasive method of examining stress responses in these species was selected because these animals were familiarised with their keepers and trained and managed using free-contact.

One question that needed to be addressed was the amount of cortisol concentration that could be attributed to stress-induction in the animal. The term 'stress' is generally considered to be a reference to the negative consequences of an animal's failure to cope with factors in its environment (Wielebnowski *et al* 2002) and increases in cortisol concentration are normally established as a negative experience (Norcross & Newman 1999, Cross *et al* 2004, Dehnhard 2007). That said, not all stressors have negative impacts on animal health (Moodie & Chamove 1990) and, in certain circumstances, stress is a necessity in ensuring survival and allowing adaptation to environmental change (Wielebnowski *et al* 2002).

So-called 'negative stress' can be identified when animals appear to incur biological costs such as impaired reproduction (Swaigood 2007) or immune function (Siegel *et al* 1987, Herbert & Cohen 1993) from responding to stressors (Moberg 2000). Due to the limitations imposed by a study only lasting three months, we were unable to confirm whether or not the cortisol concentrations obtained in these three periods could have biological costs. Thus, in order to determine which concentration represented 'negative stress', it was necessary to assess the normal range of cortisol concentration for these species; not only to establish a baseline range of salivary cortisol to detect deviations which we could attribute to stressful situations, but to also monitor their evolution in individuals and in groups (Dathe *et al* 1992). Furthermore, in mammals, the production of basal cortisol generally peaks at the beginning of daily activity, which can be explained by a circadian rhythmicity that has evolved to help the organism predict daily environmental changes, such as food seeking and consumption (Moore-Ede

& Sulzman 1977). To ensure results were not influenced by this circadian rhythmicity, samples were always collected at the same time (07:30h).

Once the normal cortisol concentration range of both species had been established, we observed that during the opening period, salivary cortisol concentrations of both species increased significantly, compared to pre- and postopening periods. We considered these higher values to be 'negative stress' and they may have been attributable to the continuation of building work, causing increased disturbance during this period. Some studies have documented negative responses of giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) to construction noise (Powell *et al* 2006). In addition, during this opening period, the animals were introduced into their dry meadows for the first time whereas previously they had been confined to their cages and internal courtyards. Furthermore, during the opening period, animals had their first direct visual contact with visitors that year. Several studies have shown correlations between increased cortisol concentration in animals and zoo visitors (Glatston *et al* 1984, Thompson 1989, Carlstead *et al* 1999) as well as with changes in animals' enclosures (Ohl *et al* 1999, Cross *et al* 2004).

After the opening period, salivary cortisol values decreased, due to possible habituation to their new meadows and visitors, during the month following the opening. Furthermore, Bonferroni multiple comparison tests reveal that cortisol levels were slightly lower during the post-opening period than during the pre-opening period. This suggests animal installation conditions improved after the zoo opening.

Moreover, we found high inter-individual variation in salivary cortisol concentrations which reflects an individual's ability to cope with the captive situation (Zayan 1991, Carlstead & Shepherdson 2000). An intra-specific metabolic variation has been noted in other species, such as cattle and other ruminants (Palme *et al* 1999, 2000, Morrow *et al* 2002), elephants (Stead *et al*

2000), rhinoceros (Brown et al 2001), clouded leopard (Wielebnowski et al 2002) and other mammals and avian species (Wasser et al 2000). In spite of these inter-individual differences, it was observed in all individuals that higher cortisol concentration values were found in the opening period; this time being particularly stressful for all animals concerned.

Some studies have documented positive responses to environmental enrichment (Wells & Hepper 2000, Wells 2004, 2005, Graham *et al* 2005, Mallapur *et al* 2005, Wells *et al* 2007) and cortisol concentration could be used to test the success of these enrichment techniques (Schapiro *et al* 1993, Carlstead & Shepherdson 2000, de Groot *et al* 2000; Ernst *et al* 2006). We propose that this non-invasive method of measuring salivary cortisol in Asian elephants and Indian rhinoceros could be a useful tool for zoo management and an objective measure to test environmental enrichment techniques and improve animal welfare. This method could be equally applicable to other captive animals which are trained for this technique and have direct contact with keepers.

5. CONCLUSIONS

The findings of this study indicate that measurement of salivary cortisol concentrations could be a useful tool for assessing animal welfare and for testing the suitability of the captive environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are extremely grateful to Terra Natura Foundation that has financed this study, to the zoo's veterinarians Manuel Lopez and Rocio Canales for their collaboration and to animal keepers of Terra Natura Zoo for their assistance in taking animal samples. We want to thank greatly to the University General Hospital of Alicante for letting us analyse saliva samples in its hormone laboratory and to Rocio Alfayate and Mara Gozálvez. Finally we want to thank Alvaro Soutullo, Luis Cadahia, Ruben Limiñana, Miguel Gallardo and Ramon Garcia Navarro for the assessment in the statistical analysis and revision of the translation.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

REFERENCES

- Beerda B, Schilder MBH, Janssen NSCRM, Mol JA** 1996 The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behaviour* 30, 272-279.
- Boyce WT, Champoux M, Suomi SJ, Gunnar MR** 1995 Salivary cortisol in nursery-reared rhesus monkeys: reactivity to peer interactions and altered circadian activity. *Developmental Psychobiology* 28, 257-267.
- Brown JL, Bellem AC, Fouraker M, Wildt DE, Roth TL** 2001 Comparative analysis of gonadal and adrenal activity in the black and white rhinoceros in North America by non-invasive endocrine monitoring. *Zoo Biology* 20, 463 - 486.
- Carlstead K, Mellen J, Kleiman DG** 1999 Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in U.S. Zoos: I. Individual behaviour profiles and their relationship to breeding success. *Zoo Biology* 18, 17-34.
- Carlstead K, Shepherdson D** 2000 Alleviating stress in zoo animals with environmental enrichment. In: *The biology of animal stress* Mooberg GP and Mench JA (eds). CABI Publishing: New York. pp 337-354.
- Cook DM, Kendall JW, Greer MA, Kramer RM** 1973 The effect of acute or chronic ether stress on plasma ACTH concentration in the rat. *Endocrinology* 93, 1019-1024.
- Cross N, Pines MK, Rogers LJ** 2004 Saliva sampling to assess cortisol levels in unrestrained common marmosets and the effect of behavioural stress. *American Journal of Primatology* 62, 107-114.
- Dantzer R, Mormede P** 1983 Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal of Animal Science* 57, 6-18.
- Dathe HH, Kuckelkorn B, Minnemann D** 1992 Salivary cortisol assessment for stress detection in the Asian Elephant (*Elephas maximus*): a pilot study. *Zoo Biology* 11, 285-289.
- Dawson A, Howe PD** 1983 Plasma corticosterone in wild starling (*Sturnus vulgaris*) immediately following capture and relation to body weight during the annual cycle. *General and Comparative Endocrinology* 51, 303-308.
- de Groot J, de Jong IC, Prelle IT, Colas JM** 2000 Immunity in barren and enriched housed pigs differing in baseline cortisol concentration. *Physiology & Behavior* 71, 217-223.
- Dehnhard M** 2007 Characterisation of the sympathetic nervous system of Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants based on urinary catecholamine analices. *General and Comparative Endocrinology* 151, 274-284.
- Ernst K, Tuchscherer M, Kanitz E, Puppe B, Manteuffel G** 2006

- Effects of attention and rewarded activity on immune parameters and wound healing in pigs. *Physiology & Behavior* 89, 448-456
- Fuchs E, Kirschbaum C, Benisch D, Bieser A** 1997 Salivary cortisol: a non-invasive measure of hipotalamo-pituitary-adrenocortical activity in the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *Laboratory Animals* 31, 306-311.
- Glatston AR, Geilvoet-Soetman E, Hora-Peck E, van Hoff J** 1984 The influence of the zoo environment on social behaviour of groups of cotton-top tamarind, *Sanguinus oedipus oedipus*. *Zoo biology* 3, 241-253.
- Graham L, Wells DL, Hepper PG** 2005 The influence of olfactory stimulation on the behaviour of dogs housed in a rescue shelter. *Applied Animal Behaviour Science* 91, 143-153.
- Haeckel R** 1989 Application of saliva in laboratory medicine. Report on the workshop conference. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 27, 233-252.
- Haemisch A** 1990 Coping with social conflict, and short term changes of plasma cortisol titers in familiar and unfamiliar environments. *Physiology & Behaviour* 47, 1265-1270.
- Hamilton GD, Weeks Jr HP** 1985 Cortisol and aldosterone comparisons of cottontail rabbits collected by shooting, trapping, and falconry. *Journal of Wildlife Diseases* 31, 40-42.
- Harper JM, Austad SN** 2000 Fecal glucocorticoids: a non-invasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Physiological and Biochemical Zoology* 73, 12-22.
- Herbert TB, Cohen S** 1993 Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosomatic Medicine* 55, 364-379.
- Kirschbaum C, Hellhammer DH** 1994 Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 19, 313-333.
- Kuckelkorn B, Dathe HH** 1990 Trächtigkeits-diagnose beim Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*) anhand von Progesteronbestimmungen im Speichel. *Der Zoologische Garten N.F.* 60, 333-340.
- Lane** 2006 Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals. *Animal Welfare* 15, 331-342.
- López-Mondejar P, Fuentes MA, Mauri M, Mora A, Pérez Soto M, Vargas F, Martín Hidalgo A** 2006 Determinación de cortisol salivar en el diagnóstico de la enfermedad de Cushing pediátrico. *Anales de Pediatría* 64, 270-272.
- Mallapur A, Sinha A, Waran N** 2005 Influence of visitor presence on the behaviour of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*) housed in Indian zoos. *Applied Animal Behaviour Science* 94, 341-352.
- McKenzie S, Deane EM** 2005 Faecal corticosteroid levels as an indicator of well-being in the

- tammar wallaby, *Macropus eugenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140, 81–87.
- Meyer JM, Walker SL, Freeman EW, Steinetz BG, Brown JL** 2004 Species and fetal gender effects on the endocrinology of pregnancy in elephants. *General and Comparative Endocrinology* 138, 263–270.
- Millsaugh JJ, Woods RJ, Hunt KE, Raedeke KJ, Brundige GC, Washburn BE, Wasser SK** 2001 Using fecal glucocorticoid assays to study the physiological stress response of elk. *Wildlife Society Bulletin* 29, 899–907.
- Moberg GP** 2000 Biological response to stress: implications for animal welfare. In: *The biology of animal stress* Moberg GP and Mench JA (eds). CABI Publishing: New York. pp 1–22.
- Moodie EM, Chamove AS** 1990 Brief threatening events are beneficial for captive tamarins. *Zoo Biology* 9, 275–286.
- Moore-Ede MC, Sulzman FM** 1977 The physiological basis of circadian time-keeping in primates. *Physiologist* 20, 17–25.
- Morton DJ, Anderson E, Foggin CM, Kock MD, Tiran EP** 1995 Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Veterinary Record* 136, 60–63.
- Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews L** 2002 Fecal glucocorticoid metabolites of adrenal activity in dairy cattle. *General and Comparative endocrinology*. 126, 229–241.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ** 1984 Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological effects. *Endocrine Reviews* 5, 25–44.
- Norcross JL, Newman JD** 1999 Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callitrix jacchus*) *American Journal of Primatology* 47, 209–222.
- Ohl F, Kirschbaum C, Fuchs E** 1999 Evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) via salivary cortisol measurement. *Laboratory Animals* 33, 269–274.
- Palme R, Robia C, Baumgartner W, Mostl E** 2000 Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolite concentrations. *The Veterinary Record* 146, 108–109.
- Palme R, Robia C, Messmann S, Hofer J, Mostl E** 1999 Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 86, 237–241.
- Parrot RF, Misson BH, Baldwin BA** 1989 Salivary cortisol in pigs following adrenocortrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *British Veterinary Journal* 145, 362–366.
- Powell DM, Carlstead K, Tarou LR, Brown JL, Monfort SL** 2006 Effects of construction noise on behaviour and cortisol levels in a pair of captive Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Zoo Biology* 25, 391–408.

- Queyras A, Carossi M** 2004 Non-invasive techniques for analysing hormonal indicators of stress. *Ann Ist Super Sanità* 40, 211-221.
- Romero LM, Romero RC** 2002 Corticosterone responses in birds: the importance of rapid initial sampling. *Condor* 104, 129-135.
- Sabatino F, Masoro EJ, McMahan A, Kuhn RW** 1991 Assessment of the role of glucocorticoid system in aging process and in the action of food restriction. *Journal of Gerontology* 46, 171-179.
- Schapiro S, Bloomsmith MA, Kessel AL, Shively CA** 1993 Effects of enrichment and housing on cortisol response in juvenile rhesus monkeys. *Applied Animal Behaviour Science* 37, 251-263.
- Schoech SJ, Kttersen ED, Nolan JrV** 1999 Exogenous testosterone and the adrenocortical response in dark-eyed juncos. *Auk* 116, 64-72.
- Shepherdson DJ, Carlstead KC, Wielebnowski** 2004 Cross-institutional assessment of stress responses in zoo animals using longitudinal monitoring of faecal corticoids. *Animal Welfare* 13, 105-115.
- Siegel RA, Ducker EM, Pahnke U, Wuttke W** 1987 Stress-induced changes in cholecystokinin and substance P concentrations in discrete regions of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 46, 75-81.
- Soltis J, Wegner FH, Newman JD** 2003 Adult cortisol response to immature offspring play in captive squirrel monkeys. *Physiology & Behaviour* 80, 217-223.
- Stead SK, Meltzer DGA, Palme R** 2000 The measurement of glucocorticoid concentrations in the serum and faeces of captive African elephants (*Loxodonta africana*) after ACTH stimulation. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*. 71, 192-196.
- Stratakin CA, Chrousos GP** 1995 Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. In Stress, basic mechanism and clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771, 1-18.
- Swaigood R** 2007 Current status and future directions of applied behavioural research for animal welfare conservation. *Applied Animal Behaviour Science* 102, 139-162.
- Thompson VD** 1989 Behavioural response of 12 ungulate species in captivity to the presence of humans. *Zoo biology* 8, 275-297.
- Tiefenbacher S, Lee B, Meyer JS, Spealman RD** 2003 Noninvasive technique for repeated sampling of salivary free cortisol in awake, unrestrained squirrel monkeys. *American Journal of Primatology* 60:69-75.
- Vincent IC, Michell AR** 1992 Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science* 53, 342-345.
- Von der Ohe CG, Servheen C** 2002 Measuring stress in mammals using faecal glucocorticoids: opportunities and challenges. *Wildlife Society Bulletin* 30, 1215-1225.

- Washburn BE, Millspaugh JJ** 2002 Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. *General and Comparative Endocrinology* 127, 217-222.
- Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millspaugh JJ, Larson S, Monfort SL** 2000 A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of non domestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology*. 120, 260-275.
- Wells DL** 2004 A review of environmental enrichment for kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Applied Animal Behaviour Science* 85, 307-317.
- Wells DL** 2005 A note on the influence of visitors on the behaviour and welfare of zoo-housed gorillas. *Applied Animal Behaviour Science* 93, 13 – 17.
- Wells DL, Hepper PG** 2000 The influence of environmental change on the behaviour of sheltered dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 68, 151-162.
- Wells DL, Hepper PG, Coleman D, Challis MG** 2007 A note on the effect of olfactory stimulation on the behaviour and welfare of zoo-housed gorillas. *Applied Animal Behaviour Science* 106, 155-160.
- Whitten PL, Brockman DK, Stavisky RC** 1998 Recent advances in non-invasive techniques to monitor hormone-behaviour interactions. *Yearbook of Physical Anthropology* 41, 1-23.
- Wielebnowski NC, Fletchall N, Carlstead K, Busso JM and Brown JL** 2002 Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioural factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biology* 21, 77-98.
- Zayan R** 1991. The specificity of social stress. *Behavioural Process* 25, 81-93.
- Zoldag L, Heuwiesser W, Grunert E, Stephan E** 1983 Steroid hormone profile in pregnant cows after exposure to noise stress, with particular reference to corticosteroids. *Zentrall Veterinärmed* 30, 737-748.

A photograph of an Asian elephant in a zoo enclosure. The elephant is standing on a patch of grass and dirt, facing away from the camera and slightly to the right. Its trunk is extended upwards, reaching towards the fronds of a palm tree. In the background, there are several palm trees and a metal fence. The sky is not visible.

**Assessing the effect of external
and internal stressors on
captive Asian elephants
(*Elephas maximus*) welfare.**

Capítulo II

**Menargues A, Urios V, Limiñana, R.
Animal Welfare, en revisión.**

ABSTRACT

Zoo animals are frequently exposed to different external and internal stimuli that could affect their well-being. Prolonged physiological stress may lead to physiological systems within the brain and body fluctuating to fulfil internal or external demands, which may cause deterioration and maladaptation. Salivary cortisol has been recently used to assess welfare of captive and free-ranging animals. This research studies how two external stressors (performance training and arrival of a new group of elephants at an established herd) and one internal stressor (irreversible paralysis of elephant's trunk) affect cortisol levels of individuals of a group of Asian elephants. In the first case, training performance had an effect on stress level of the two elephants studied, being cortisol significantly higher after than before the training sessions. In the second case, the arrival of a group of three new individuals to an established herd produced a significant increase of cortisol concentration in all elephants of the herd compared to those before the arrival. Cortisol level decreased in the next month, probably due to animals habituating to the new herd components. In the third case, a disability as irreversible trunk paralysis in a studied elephant was a chronic internal stressor, and the disabled elephant had a significant higher cortisol level than the rest of the healthy individuals during the whole study period. External and internal stressors evaluated here significantly increased salivary cortisol concentration, generating a negative impact on elephants' well-being. Knowledge on how different stressors affect stress levels in captive animals is essential in management decisions to keep their welfare.

Key words: cortisol; elephant's trunk paralysis; social stress; elephant training; chronic stress.

1. INTRODUCTION

Animal welfare is one of the most important objectives to be fulfilled by zoos. Nevertheless, in zoos, animals may be usually exposed to several stressor agents. When this happens, the hypothalamic pituitary- adrenal axis is activated, inducing cortisol secretion by the adrenal cortex (Munck *et al* 1984, Sheriff *et al* 2011). Stressed individuals show a significant deviation of the *milieu intérieur* from whatever state is considered to be optimal, and this change is accompanied by a maximal activation of regulatory responses that have been surpassed (Bradshaw 2003). Chronic stress may have several consequences like suppressed immune function, increased disease susceptibility, abnormal behaviour or poor reproduction (Moberg 1985, 1990). There are internal and external stressors, which may be physical, physiological, behavioural or psychological factors (Dantzer & Mormède 1983, Stratakin & Chrousos 1995).

Cortisol is an indicator of animal well-being, and its levels increase during times of distress (Menargues *et al* 2008, Powell *et al* 2006). There is a high correlation between salivary glucocorticoids levels and free-unbound serum glucocorticoids levels (Sheriff *et al* 2011). Consequently, salivary cortisol concentration has been used to assess animal welfare in different species (Fuchs *et al* 1997, Ohl *et al* 1999, Pedernera-Romano *et al* 2006), since it is a non-invasive procedure that reflects free glucocorticoids concentration in blood (Gröschl 2007, Kirschbaum & Hellhammer 1994). Knowing the effect of possible stressors is necessary to avoid negative impacts of these on captive animals' welfare.

1.1 External stressors

1.1.1 Elephants training

Strength and intelligence of Asian elephants has been harnessed by man for hundreds of years. Captive elephant management is a highly controversial issue. Elephants are difficult species to be maintained in zoos (Schwammer & Karapanou 1997) owing to their space and social needs make very difficult their breeding success (Taylor & Poole 1998). Training has become an increasingly common component of zoo elephants' management in recent years (Dineley 1984, Mellen & Ellis 1996), which is primarily used to facilitate husbandry, maintenance and health care, as for example, chaining the individuals to allow their foot care, washing and routine veterinary procedures (e.g. to take blood samples) (Mellen & Ellis 1996). Training techniques based on reward (positive reinforcement) may enhance health and reproductive potential of captive animals, and is recognised by zoo managers as a useful tool to improve handling of captive individuals (Desmond & Laule 1994). However, training is also used to teach other behaviours for people entertainment, that zoos name "Biological demonstration", which includes headstands, hind-leg stands and sitting (Mellen & Ellis 1996). These have been called "power behaviours" due to the great effort required by the elephants to do that.

1.1.2 Arrival of new elephants to an established herd

In animals, social rank of an individual is reflected in its neuroendocrine system, and changes in the rank order generally involve changes of glucocorticoids and testosterone levels in plasma (Sapolsky 1990). Zelena *et al* (1999) studied that changes in social environments may have pronounced effects on the physiology and behaviour of animals. In zoos, the introduction of new individuals into an

established herd is common. Introducing one animal or a group of animals into an established herd or making a new herd affects the already established social relationships (Keeling & Gonyou 2001, Veissier *et al* 2001, Bøe & Færevik 2003). Therefore, this process involves establishing new social relationships, which may affect the social organisation of the herd (Neisen *et al* 2009) and thus, this event may potentially affect animals' well being.

1.2 Internal stressors: an irreversible trunk paralysis

The trunk is a multifunctional organ used for manipulating, lifting, eating, breathing, vocalizing, social disciplining and determining scent (Rasmussen 2006). This organ evolved from an elongated combination of the upper lip and nose. For basic muscle masses (the radial, the longitudinal and two oblique layers) and the size and attachment points of tendon masses allow the shortening, extension, bending and twisting movements accounting for the ability to hold and manipulate loads up to 300 kg (Rasmussen 2006). Trunk injuries are reasonably common and a flaccid, irreversible trunk paralysis has been described in free-ranging African elephants (Kock *et al* 1994). Elephants develop remarkable adaptive responses to cope with their impaired feeding and drinking abilities (Kock *et al* 1994).

Although these topics have been studied in several farm or other captive animals, to our knowledge, the effect of the three abovementioned stressors in elephants' welfare has not been studied to date. The aim of this study is to test how different external (training for a performance and arrival of a new group of elephants to the herd) and internal stressors (irreversible trunk paralysis) affect welfare in captive Asian elephants, using salivary cortisol as assessment tool (Menargues *et al* 2008).

2. METHODS

2.1 Location and animals

The study was conducted at Terra Natura Zoological Park, Alicante, Spain. Daily salivary cortisol concentration was recorded from a total of eight non-pregnant female Asian elephants (*Elephas maximus*), ranging from 21 to 46 years old (Momo: 21, Grande: 24, Kaisoso: 24, Tania 31, Petita 34, Motki 37, Jasmin 40 and Baby 46 years old). Three of the elephants (Tania, Jasmin and Motki) arrived at Terra Natura Zoological Park in August 2004 from Austria (Gänserndorf Safari Park), three other ones (Petita, Baby and Kaisoso) arrived in December 2004, having previously resided at the Safari Park Vergel (Vergel, Alicante, Spain), and the other two (Grande and Momo) arrived in May 2005 from Austria (Gänserndorf Safari Park). One of the elephants (Baby) was housed individually in a cage measuring 5 x 6 x 3.50 m during the night due to conflicts with other elephants, while the rest of the herd was housed in three cages measuring 5 x 8 x 3.50 m: one with a group of two individuals (Kaisoso and Petita), another one with a group of three elephants (Tania, Modki and Jasmin) and other group of two elephants (Momo and Grande). During the day, elephants were released to three different dry meadows of 3000, 5000 and 8000 m² area respectively, equipped with artificial lakes and waterfalls. Animals were fed on a diet of oats, branches, fruit and vegetables, and provided with *ad libitum* water. All the animals were trained and handled using free-contact by keepers with whom they became familiar.

2.2. Sample collection

To assess the effect of each considered stressor in cortisol levels of elephants, specific studies were carried out. Overall, the period for which saliva samples were collected on a daily basis was from 1st January 2006 to 31st July 2006. Within every study, saliva samples were always collected at the same hour (see below) to avoid variations in salivary cortisol concentration, given that significantly large variation could occur within relatively short time intervals. Samples were collected using the Salivette® kit (Sarstedt, AG & Co, Numbrecht, Germany) and centrifuged at 2000 rpm for two min at 15°C. The eluted saliva was stored at -20°C until assaying.

2.3. Hormone analyses

Salivary cortisol was measured in duplicate, using a solid-phase Radioimmunoassay (RIA) (Coat-A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostics) and the tubes were counted on a Packard Cobra Auto Gamma Counter (Auto-Gamma® 5000 series, Cobra 5005, Packard Instruments Company). A minimum of 0.4 mL of saliva was required for the duplicate assay (Menargues *et al* 2008). Modifications were made in the form of increasing the volume of the sample to 200 µL, in the standard curve, through 1:10 dilutions of the standards and by increasing the incubation period to 24 h to increase assay sensitivity (López-Mondéjar *et al* 2006).

2.4. Stressors

2.4.1. Training for a performance

Data from two elephants were available to conduct this part of the study (Grande and Momo). Elephants' training for the performance began at 10:30h and finished at 11:30h every day, and was estimated to last between October 2005 and September 2006. Training consisted in series of repeated exercises such as lifting the front and rear legs, making lateral, forward and backward movements, sitting, lifting the trunk and moving a log. This training was done in an outdoor courtyard of 10×15 m. This program training was designed for an "Elephants biological demonstration", which was never carried out at the zoo. Saliva samples were taken on a daily basis during 2 different weeks (from 8th to 15th, and from 22nd to 29th April 2006) at 10:00h (before training) and at 12:00h (after training). This period roughly correspond to middle dates of the estimated training period and thus, cortisol concentration are expected to be stabilised from an initial increase due to the beginning of the training period. After training and taking the saliva samples, elephants went out into the meadows at 12:00h and came back to the stables at 19:00h.

For both elephants, pre-training and post-training cortisol concentrations were compared using non-parametric Wilcoxon signed rank test. Statistical analyses were conducted using SPSS, version 15.0, and statistical significance was set at $P < 0.05$. All values are reported as mean $\pm$ SD.

1.1.1. Arrival of a new group of elephants to the herd

Data for this part of the study was obtained from the eight elephants (Baby, Grande, Jasmin, Kaisoso, Momo, Modki, Petita and Tania). Given that an entry of

three new elephants to the zoo was planned for May 2006, we used data from that month, as well to the previous and next one, to assess the effect of the entry of new elephants in cortisol levels of existing individuals. This short interval was used to assess the effect of a punctual stressor, avoiding the overall seasonal variations in cortisol levels (Menargues, unpublished results). To do that, saliva samples of the eight individuals were taken on a daily basis at 07:30h during April, May and June 2006. Data were analysed by repeated measures analysis of variance (ANOVA), using the cortisol concentration data obtained from each individual in each month in order to test for differences in mean monthly cortisol concentration between April, May and June 2006 (using individual as a random factor). The Huynh and Feldt correction was used in Mauchly's Test of Sphericity when assumption of sphericity was violated. The Bonferroni multiple comparison test was used to test for pairwise differences in mean cortisol values between the three months.

Additionally, as also several measurements of cortisol concentration from May 2005 was available for six of the individuals, we also analysed differences in cortisol concentration between May 2005 and May 2006 for those individuals, to discard any effect of the year on possible trends arising in the first analysis; to do that, we used the non-parametric Mann-Whitney test. All values are reported as mean $\pm$ SD and statistical significance was set at $P < 0.05$.

1.1.2. Irreversible trunk paralysis

Data for this part of the study was also obtained from the eight elephants. Petita arrived at this zoo with a paralysis from the base to the middle of the trunk. This disability was caused by a serious injury that this elephant suffered by tearing the trunk with a wire, which resulted in the cutting of several external muscles that control the movements of the trunk such as those up, down and side to side. This

disability difficults routine tasks such as feeding, drinking, hygiene, health care and social behaviour. This is an internal chronic stressor that may affect this individual during its whole life. Here, saliva samples were taken on a daily basis at 07:30h 1st January 2006 to 31st July 2006. During this period, mean monthly cortisol concentration from Petita was compared to those of the remaining elephants to test if higher cortisol levels were observed in this individual throughout the whole study period (as it is a chronic stress).

Between-elephants differences in monthly cortisol concentration were analysed using repeated measures analysis of variance (ANOVA), using month as random factor in the model. The Huynh and Feldt correction was used in Mauchly's Test of Sphericity in elephant analysis. The Bonferroni multiple comparison post-hoc test was used to test for pairwise differences in mean monthly cortisol concentration. All values are reported as mean $\pm$ SD and statistical significance was set at $P < 0.05$.

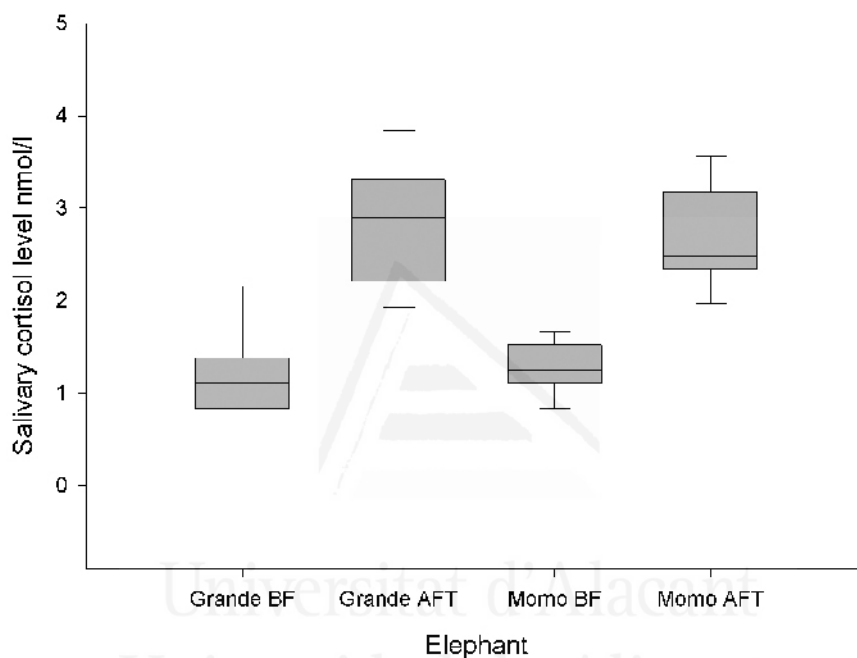
3. RESULTS

3.1. Training for a performance

Mean salivary cortisol concentration was significantly higher after training at 12:30h than before training at 10:00h for both elephants: Grande: 1.21 ± 0.58 nmol l⁻¹ at 10:00h and 2.74 ± 0.97 nmol l⁻¹ at 12:30h. (Wilcoxon $Z = -2.198$, $P = 0.028$, $n = 15$); Momo: 1.26 ± 0.30 nmol l⁻¹ at 10:00h and 2.71 ± 0.57 nmol l⁻¹ at 12:30h (Wilcoxon $Z = -2.397$, $P = 0.017$, $n = 16$) (Figure 1).

Figure 1

Boxplots of mean monthly salivary cortisol concentration of two Asian elephants before and after training activities. Boxes indicate the 25th and 75th percentiles, and the median is indicated as a line within the boxes. Error bars of boxes represent the 10th and 90th percentiles. Units of cortisol concentrations are expressed in nanomol / litre (nmol/l).



3.2. Arrival of a new group of elephants to the herd

Overall, mean monthly salivary cortisol concentrations recorded varied between 1.67 ± 1.08 nmol l⁻¹ (Kaisoso, April) and 4.17 ± 1.92 nmol l⁻¹ (Petita, May) (Table 1), and significant differences in salivary cortisol concentration among months were found ($F_{11.324} = 5.669$, $P < 0.001$). Bonferroni multiple comparison tests (Table 2) revealed that mean cortisol concentration significantly increased in May compared to April ($P < 0.001$), and then slightly decreased in June although not significantly ($P = 0.982$; Figure 2). Similarly, significant

differences between April and June levels were found ($P = 0.003$). On the other hand, we found that mean salivary cortisol concentration was significantly higher in May 2006 than in May 2005 (Mann-Whitney $U = 108$, $P < 0.001$; Table 3).

Table 1: Mean monthly salivary cortisol concentration of eight elephants from April to June 2006. Values are presented as mean $\pm$ SD. Units are expressed in nanomol/litres (nmol/L).

Elephant	Month		
	April	May	Jun
Baby	2.21 $\pm$ 0.65	2.81 $\pm$ 0.85	2.66 $\pm$ 0.63
Grande	2.25 $\pm$ 1.11	3.49 $\pm$ 0.98	2.73 $\pm$ 0.80
Jasmin	2.21 $\pm$ 1.62	2.68 $\pm$ 0.74	3.10 $\pm$ 0.89
Kaisoso	1.67 $\pm$ 1.08	2.80 $\pm$ 1.04	3.04 $\pm$ 1.11
Momo	1.68 $\pm$ 0.66	3.31 $\pm$ 1.37	2.52 $\pm$ 0.73
Motki	1.91 $\pm$ 0.90	3.76 $\pm$ 1.73	2.66 $\pm$ 0.60
Petita	2.94 $\pm$ 1.56	4.17 $\pm$ 1.92	4.06 $\pm$ 1.86
Tania	1.68 $\pm$ 0.65	2.47 $\pm$ 0.85	2.19 $\pm$ 0.46

Table 2. Bonferroni multiple post-hoc comparison tests of salivary cortisol concentration among months.

	April	May	June
April		**	*
May	**		
June	*		

* Significance level: $P < 0.05$

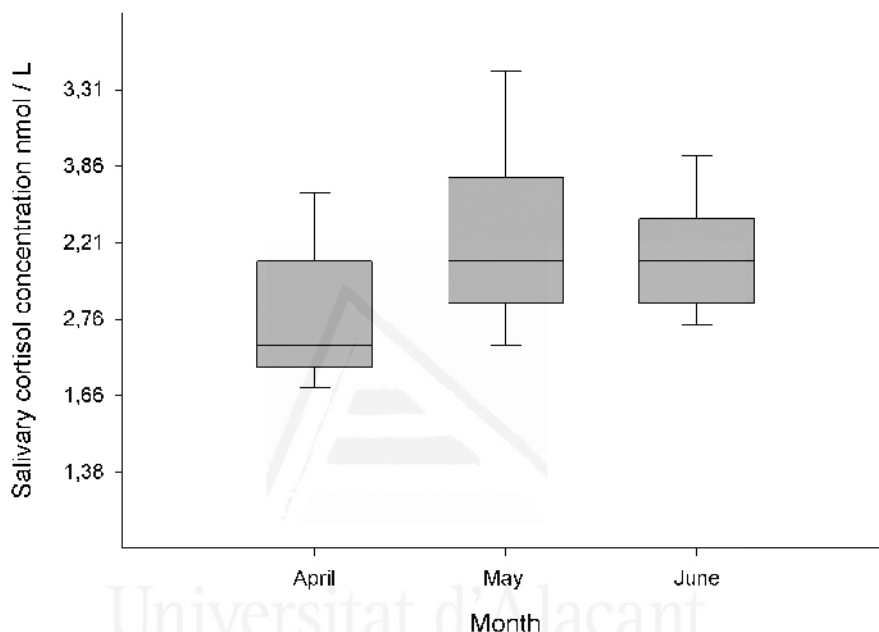
** Significance level: $P < 0.001$

Table 3. Differences on mean of salivary cortisol concentration between May 2005 and May 2006 for six of the eight elephants which were at zoo in both months. Values are presented as mean $\pm$ SD. Units are expressed in nanomol/litres (nmol/L).

		Baby	Jasmin	Kaisoso	Modki	Petita	Tania
May 2005	Salivary cortisol mean	1.97 $\pm$ 0.87	1.78 $\pm$ 0.64	1.73 $\pm$ 0.92	1.85 $\pm$ 0.62	2.08 $\pm$ 0.68	2.26 $\pm$ 0.80
May 2006	Salivary cortisol mean	2.81 $\pm$ 0.85	2.68 $\pm$ 0.74	2.80 $\pm$ 1.04	3.76 $\pm$ 1.73	4.17 $\pm$ 1.92	2.47 $\pm$ 0.85

Figure 2

Boxplots of mean monthly salivary cortisol concentration of eight Asian elephants in April, May and June 2006. Boxes indicate the 25th and 75th percentiles, and the median is indicated as a line within the boxes. Error bars of boxes represent the 10th and 90th percentiles. Units of cortisol concentrations are expressed in nanomol / litre (nmol/l).



3.3. Irreversible trunk paralysis

Petita was the elephant which had the highest mean monthly salivary cortisol concentration during the 7-month study period (Baby: 2.25 ± 0.75 nmol l⁻¹; Grande: 2.80 ± 1.31 nmol l⁻¹; Jasmin: 2.87 ± 1.31 nmol l⁻¹; Kaisoso: 2.4 ± 1.06 nmol l⁻¹; Momo: 2.38 ± 1.16 nmol l⁻¹; Modki: 2.65 ± 1.29 nmol l⁻¹; Petita: 3.63 ± 1.78 nmol l⁻¹; Tania: 1.94 ± 0.72 nmol l⁻¹), and overall significant differences between elephants were found ($F_{6,238} = 15.674$, $P < 0.001$). Bonferroni multiple comparison test revealed that, despite some other differences between individuals,

Petita had significantly higher salivary cortisol concentration than all the other elephants (Table 4), which was true during the whole study period (Figure 3).

Table 4. Bonferroni multiple post-hoc comparison tests of salivary cortisol level between elephants during the study period.

	Bab	Gra	Jas	Kai	Mom	Mod	Pet	Tan
Baby		n.S.	*	n.S.	n.S.	n.S.	**	n.S.
Grande			n.S.	n.S.	n.S.	n.S.	*	**
Jasmin				n.S.	*	n.S.	*	**
Kaisoso					n.S.	n.S.	**	n.S.
Momo						n.S.	**	n.S.
Modki							**	n.S.
Petita								**
Tanja								

* Significance level: $P < 0.05$

** Significance level: $P < 0.001$

n.S.: non significant

4. DISCUSSION

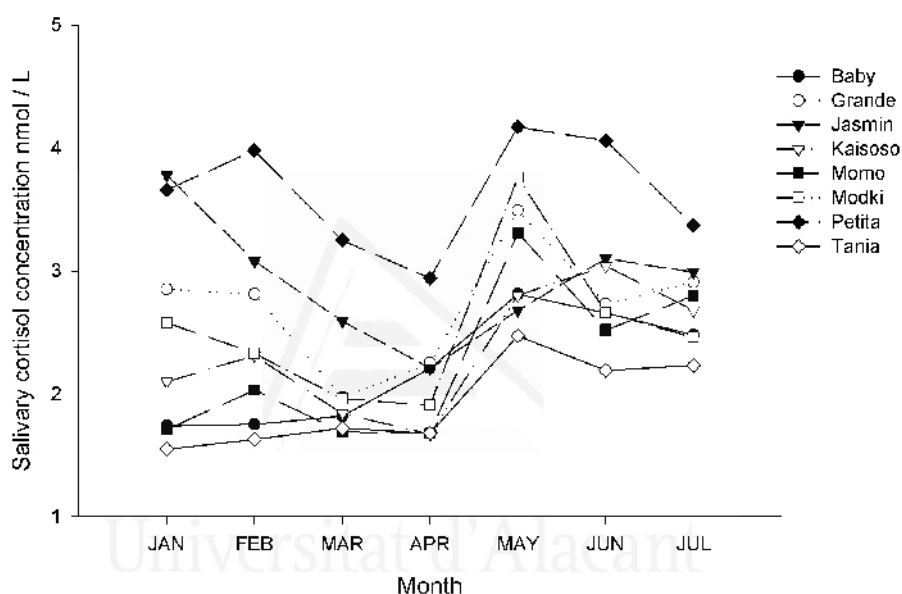
4.1. Effects of performance training

Training activities in zoos is a very practical approach to improve daily care tasks of animals and to make routine veterinary procedures easier. Nevertheless, in places like circuses and some zoos, training is used to prepare animals for people entertainment. Kiley-Worthington (1990) observed that some animals experienced fear and anxiety before becoming accustomed to trainers and others showed frustration, avoidance behaviours and refusal to perform certain activities. Iossa *et al* (2009) suggested that performance acts in the presence of spectators

may cause severe stress in wild animals. Moreover, Friend (1999) concluded that stereotyping increases prior performance in circus elephants.

Figure 3

Mean monthly concentration of salivary cortisol of eight Asian elephants from January to July 2006. Units of cortisol concentrations are expressed in nanomol / litre (nmol/l).



This study reveals that the training sessions undertaken to carry out a performance (biological demonstration) at the zoo, affected the salivary cortisol concentration of elephants, with levels significantly increasing after the training. It is known that salivary cortisol concentration is a good indicator of stress in animals (Beerda *et al* 1996, Fuchs *et al* 1997) and it has been revealed to be an easy tool to assess welfare for captive elephants (Menargues *et al* 2008). Therefore, this increase in cortisol levels could reflect that implementing this kind of training may break the daily routine of individuals, which could result in an increased stress level. However, stress is not always harmful as, for example, cortisol are also

released in response to situations that are not normally regarded as stressful like hunting, courtship or copulation (Broom *et al* 1993). Hence, cortisol increases observed here could be also related with an increase in physical activity level of elephants and thus, not necessarily reflect an increased stress situation. Elephants of the present study were reluctant to cooperate in training activities during the eleven months that program training lasted. This fact, as well as the cortisol results presented here, were determinant for the performance to be never carried out at the zoo. Events like this lead us to consider stress level of animals when taking decisions on management and implementing this kind of performances that could affect captive animals' welfare.

4.2. Effects of the arrival of a new group of elephants to an established herd

The term “stress” is generally used to refer to the negative consequences of an animal's failure to cope with factors in its environment (Wielebnowski *et al* 2002). An increase in cortisol concentration is normally established as a negative experience (Cross *et al* 2004, Dehnhard 2007, Norcross & Newman 1999), but not all stressors have negative impacts on the animal health (Moodie & Chamove 1990). Furthermore, some stress is necessary to ensure survival and allow adaptation to changes in the environment (Wielebnowski *et al* 2002). We can use the term “negative stress” when animals seem to suffer biological costs such as impaired reproduction (Swaisgood 2007) or immune function (Herbert & Cohen 1993, Siegel *et al* 1987) from responding to stressors (Moberg 2000).

Considering the normal range of cortisol concentration of Asian elephants (Menargues *et al* 2008), we observed that during May 2006, salivary cortisol concentration of all individuals rapidly and significantly increased compared with those values from the previous month. This result probably arises from the

introduction of new individuals to the herd that month, which can be regarded as a punctual even of negative stress. Several studies in farm animals have reported increased levels of behavioural activity in cattle due to the abrupt breaking of social bonds (Brakel & Leis 1976, McVeigh & Tarrant 1983). Moreover, the arrival of a new group of animals to an established herd leads to the re-establishment of a new hierarchy (Ewbank & Meese 1971, Puppe 1998, Tan & Shackleton 1990) that may be detrimental for animal welfare. Also, negative effects of mixing unfamiliar pigs have been reported on behaviour, physiology, health and performance (Hayne & Gonyou 2003, McGlone 1985, Stookey & Gonyou 1994). Some studies concern the acute response of cortisol after a single social challenge in an unfamiliar environment and have demonstrated an increase in plasma cortisol levels (Otten *et al* 1997, Zayan & Dantzer 1990). Finally, Coutelier *et al* (2007) founded that salivary cortisol in pigs increased significantly when a group of pigs were mixed and relocated. We can discard a possible effect of seasonal variation in salivary cortisol levels on results presented here, since some of these individuals (those for which data on May 2005 was available) exhibited lower cortisol levels in May of previous year, well within normal levels of the species (Menargues *et al* 2008).

In June 2006, salivary cortisol concentration decreased slightly (although not significantly) in all the studied individuals respect to May levels, which can be regarded as an habituation to the stress situation after several weeks of exposure to the stressor (Coutelier *et al* 2007). On the other hand, cortisol levels in June were significantly higher than those in April, which may suggest that individuals were not fully habituated to the presence of new individuals in the herd just in a month. Nevertheless, this higher level do might reflect seasonal variations in cortisol concentration in this species (Menargues, unpublished results). Understanding this social stress is increasingly necessary in zoo animal husbandry

to create herds of compatible individuals to guarantee the well-being of their components.

4.3. Effects of an internal stressor: irreversible trunk paralysis

Dantzer and Mormède (1979) suggested that stress to animals is mostly caused by external stressors (social stress, environmental stress and human – animal stress). However, internal agents are also a source of stress (Dantzer and Mormède 1983, Stratakin & Chrousos 1995); for example, several studies reveal that chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and psoriasis in humans show high levels of cortisol (Evers *et al* 2010, Zautra *et al* 1997). To our knowledge, this is the first study analyzing how a physical disability affects animal welfare. In this research we studied how a disability in the trunk of an Asian elephant, which could be considered as a chronic internal stressor, affects to its salivary cortisol levels respect to the rest of the non-disabled individuals of the herd. Results achieved revealed that the disabled elephant had a significant higher salivary cortisol concentration than the rest of the individuals of the herd throughout the whole study period (seven months). This suggests that stress level of this disabled individual may be higher than those of the rest of the individuals of the same herd.

The elephant trunk is an extraordinary trait in evolutionary engineering. It is the result of the fusion of upper lip and nose of the elephant and was formed over million years of evolution. This appendix enables elephants to reach up and down into spaces, even into areas they cannot see. The trunk has an extremely importance on elephants' feeding and water drinking. Trunk helps the elephant to rip grass from the ground or fodder from a tree and then place the food in its mouth; moreover elephant uses the trunk to draw water and the sprays it into the mouth. The trunk is also a key on basic hygiene and health care of elephants

spraying water over their bodies or dust or mud which protects them from insect bites or sun rays. Moreover, this appendix is an essential tool for elephant's social behaviour and close elephant interaction involves using the trunk to explore, caress and embrace. Also, the trunk is an essential tool on aggressive and defensive situations and in acoustic communication producing sounds that can range from a low snort to high pitched squeaks of excitement or a deafening full blown trumpet. African and Asian elephants have differences in their trunks tip; the African elephant has two fingers on the tip, while the Asian elephant has only one. This affects the way they use the trunk, so while the African elephant can grasp an object between its fingers, the Asian elephant use more of a scooping movement and hold objects against the underside of the trunk. In any case, the elephant's trunk is an essential appendix for an individual to carry out all necessary activities during its whole life.

Having a partially disabled trunk may suppose an increased stress level, as the individual needs to be more aware to successfully accomplish its daily activities. The disability of Petita difficults seriously its routine tasks. The distal extreme of its trunk does not suffer paralysis, so it can take food and water but to put them into the mouth it needs to swing her head from side to side and up for the trunk to reach its mouth. Moreover, this elephant suffers constant rejection of its fellow and attacks by some members of the herd. Petita has only one friend, Kaisoso, who has accepted her and which is complicity. This elephant, in addition to suffering this disability, underwent a chronic stress as her physical limitation has made daily tasks like feeding, drinking, hygiene, health care or relationship with the rest of the herd more difficult.

A functioning trunk is absolutely vital for an elephant's survival. This disability entails a higher chronic level of stress compared with the rest of the herd. A more detailed knowledge of internal stressors could help to assess

elephant's cares in zoo animal husbandry to provide them an appropriate environment to improve their welfare.

5. CONCLUSIONS

Training, arrival of new individuals to an established herd and paralysis in the trunk are external and internal stressors that produce a negative impact on zoo elephants' welfare, as they represent a significant increase of cortisol levels in all cases. Moreover, an irreversible paralysis in elephant's trunk is a chronic stressor which permanently affected welfare of the disabled elephant. Results presented here are also important to show that in social animals, creating herds of compatible individuals may be very important to improve their welfare in captivity. On the other hand, the salivary cortisol determination used here has been proved as a non-invasive and useful tool to assess stress levels of captive animals, and it can be used to easily assess the effects of several stressors. Knowledge of how stressors could affect animal welfare provides a tool for management decisions to improve welfare.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Terra Natura Foundation for funding this study. The zoo veterinarians Manuel Lopez, Mario Torro and Rocio Canales, kindly collaborated in the study. We are also thankful to José Castro and the rest of animal keepers of Terra Natura Zoo for their assistance in taking saliva samples. We also want to thank the staff of the Hormone Laboratory of the General University Hospital of Alicante for allowing us to use its analytical equipment.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

REFERENCES

- Beerda B, Schilder MBH, Janssen NSCRM, Mol JA 1996 The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behaviour* 30, 272-279.
- Bøe KE, Færevik G 2003 Grouping and social preferences in calves, heifers and cows. *Applied Animal Behaviour Science* 80, 175-190.
- Bradshaw D 2003 *Vertebrate ecophysiology: an introduction to its principles and applications*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Brakel WJ, Leis RA 1976 Impact of social disorganization on behavior, milk yield, and body weight of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 59, 716-721.
- Broom DM, Johnson KG 1993 *Stress and Animal Welfare*, first ed., Chapman & Hall, London.
- Coutelier L, Arnould C, Boissy A, Orgeur P, Prunier A, Veisser I, Meunier-Salaün MC 2007. Pig's responses to repeated social regrouping and relocation during the growing-finishing period. *Applied Animal Behaviour Science* 105, 102-114.
- Cross N, Pines MK, Rogers LJ 2004 Saliva sampling to assess cortisol levels in unrestrained common marmosets and the effect of behavioural stress. *American Journal of Primatology* 62, 107-114.
- Dantzer R, Mormède P 1979 *Le Stress en Elevage Intensif*. Masson, Paris
- Dantzer R, Mormede P 1983 Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal of Animal Science* 57, 6-18.
- Dehnhard M 2007 Characterisation of the sympathetic nervous system of Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants based on urinary catecholamine analyses. *General and Comparative Endocrinology* 151, 274-284.
- Desmond T, Laule G 1994 Use of positive reinforcement training in the management of species for reproduction. *Zoo Biology* 13, 471-477.
- Dineley J 1984 Operant conditioning - a tool in zoo animal training and husbandry. *Ratel* 11, 3-7.
- Evers AWM, Verhoeven EWM, Kraaijaat FW, de Jong EMGJ, de Brouwer SJM, Schalkwijk J, Sweep FCGJ, van de Kerkhof PCM 2010 How stress gets under the skin: cortisol and stress reactivity in psoriasis. *British Journal of Dermatology* 163, 986-991.
- Ewbank R, Meese GB 1971 Aggressive behaviour in groups of domesticated pigs on removal and return of individuals. *Animal Production* 13, 685-693.
- Friend TH 1999 Behavior of picketed circus elephants. *Applied Animal Behaviour Science* 62, 73-88.

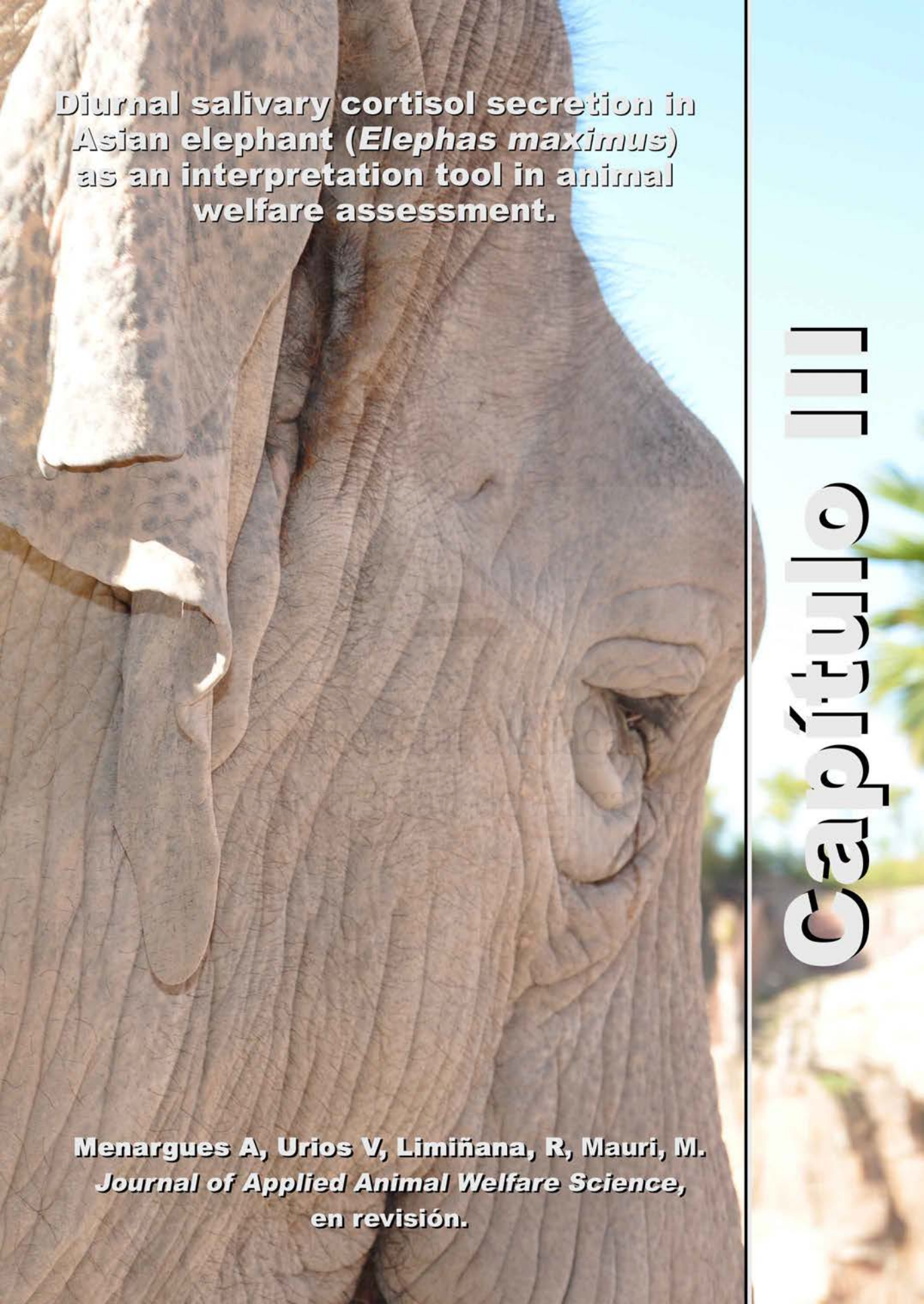
- Fuchs E, Kirschbaum C, Benisch D, Bieser A** 1997 Salivary cortisol: a non-invasive measure of hipotalamo-pituitary-adrenocortical activity in the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *Laboratory Animals* 31, 306-311.
- Gröschl M** 2007 Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry* 54 1759-1769.
- Hayne SM, Gonyou HW** 2003 Effects of regrouping on the individual characteristics of pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 82, 267-278.
- Herbert TB, Cohen S** 1993 Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosomatic Medicine* 55, 364-379.
- Iossa G, Soulsbury CD, Harris S** 2009 Are wild animals suited to travelling circus life? *Animal Welfare* 18, 129-140.
- Keeling LJ, Gonyou HW** 2001 *Social Behaviour in Farm Animals*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Kiley-Worthington M** 1990 *Animals in zoos and circuses: chiron's world?* Little Eco-Farms Publishing: Essex UK.
- Kirschbaum C, Hellhammer DH** 1994 Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 19, 313-333.
- Kock ND, Goedegebuure SA, Lane EP, Lucke V, Tyrrel D, Kock MD** 1994 Flaccid trunk paralysis in free-ranging elephants (*Loxodonta africana*) in Zimbabwe. *Journal of Wildlife Disease* 30, 432-435.
- López-Mondejar P, Fuentes MA, Mauri M, Mora A, Pérez-Soto M, Vargas F, Martín Hidalgo A** 2006 Determinación de cortisol salivar en el diagnóstico de la enfermedad de Cushing pediátrico. *Anales de Pediatría* 64, 270-272.
- McGlone J** 1985 A quantitative ethogram of aggressive and submissive behaviors in recently regrouped pigs. *Journal of Animal Science* 61, 559-565.
- McVeigh JM, Tarrant PV** 1983 Effect of propranolol on muscle glycogen metabolism during social regrouping of young bulls. *Journal of Animal Science* 56, 71-80.
- Mellen JD, Ellis S** 1996 Animal learning and husbandry training. In: *Wild mammals in captivity*. Kleiman, D.G., Allen, M.E., Thomson, K.V., Lumpkin, S., (Eds.) University of Chicago Press, Chicago, p.p. 88-99.
- Menargues A, Urios V, Mauri M** 2008 Welfare assessment of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. *Animal Welfare* 17, 305-312.
- Moberg GP** 1985 Influence of stress on reproduction: measure of well-being. In: *Animal stress*. Moberg GP, Bethesda MD (eds) American Physiological Society. p.p. 245-267.
- Moberg GP** 1990 How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science* 74, 304-311.

- Moberg GP** 2000 Biological response to stress: implications for animal welfare. In: *The biology of animal stress*. Moberg GP and Mench JA (eds). CABI Publishing: New York, p.p. 1-22.
- Moodie EM, Chamove AS** 1990 Brief threatening events are beneficial for captive tamarins. *Zoo Biology* 9, 275-286.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ** 1984 Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological effects. *Endocrine Reviews* 5, 25-44.
- Neisen G, Wechsler B, Gygas L** 2009 Effects of the introduction of single heifers or pairs of heifers into dairy-cow herds on the temporal and spatial associations of heifers and cows. *Applied Animal Behaviour Science* 119: 127-136.
- Norcross JL, Newman JD** 1999 Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (*Callitrix jacchus*). *American Journal of Primatology* 47, 209-222.
- Ohl F, Kirschbaum C, Fuchs E** 1999 Evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) via salivary cortisol measurement. *Laboratory Animals* 33, 269-274.
- Otten W, Puppe B, Stabenow B, Kanitz E, Schön AC, Brüssow KP, Nürnberg G** 1997 Agonistic interactions and physiological reactions of top- and bottom-ranking pigs confronted with a familiar and an unfamiliar group: preliminary results. *Applied Animal Behaviour Science* 55, 79-90.
- Pedernera-Romano C, Valdez RA, Singh S, Chiappa X, Romano MC, Galindo F** 2006 Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): a non-invasive technique. *Animal Welfare* 15, 359-362.
- Powell DM, Carlstead K, Tarou LR, Brown JL, Monfort SL** 2006 Effects of construction noise on behaviour and cortisol levels in a pair of captive Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Zoo Biology* 25, 391-408.
- Puppe B** 1998 Effects of familiarity and relatedness on agonistic pair relationship in newly mixed domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 58, 233-239.
- Rasmussen LEL** 2006 Chemical, tactile and taste sensory systems. In *Biology, medicine and surgery of elephants*. Fowler ME, Mikota SK (eds). Blackwell Publishing 1st Edition Oxford, p.p. 409-414.
- Sapolsky RM** 1990 Stress in the wild. *Scientific American*, (Jan): 116-123.
- Schwammer HM, Karapanou E** 1997 Promoting functional behaviours in confined African elephants (*Loxodonta africana*) by increasing the physical complexity of their environment. Proceedings of the Third Internacional Conference on Environmental Enrichment, Orlando, Florida, Seaworld, Florida.

- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehantym B, Palme R, Boonstra R** 2011 Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166, 869-887.
- Siegel RA, Ducker EM, Pahnke U, Wuttke W** 1987 Stress-induced changes in cholecystikinin and substance P concentrations in discrete regions of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 46, 75-81.
- Stookey JM, Gonyou HW** 1994 The effects of regrouping on behaviour and production parameters in finishing pigs. *Journal of Animal Science* 72, 2804-2811.
- Stratakin CA, Chrousos GP** 1995 Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress sytem. In Stress, basic mechanism and clinical implications. *Annals of the New York Academy Science* 771, 1-18.
- Swaigood R** 2007 Current status and future directions of applied behavioural research for animal welfare conservation. *Applied Animal Behaviour Science* 102, 139-162.
- Tan SSL, Shackleton DM** 1990 Effects of mixing unfamiliar individuals and azaperone on the social behaviour of finishing pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 26, 157-168.
- Taylor VJ, Poole TB** 1998 Captive breeding and infant mortality in Asian elephants: A comparison between twenty Western zoos and three Eastern elephant centres. *Zoo Biology* 17, 311-332.
- Veissier I, Boissy A, de Passille AM, Rushen J, van Reenen CG, Roussel S, Andanson S, Pradel P** 2001 Calves responses to repeated social regrouping and relocation. *Journal of Animal Science* 79, 2580-2593.
- Wielebnowski NC, Fletchall N, Carlstead K, Busso JM, Brown JL** 2002 Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioural factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biology* 21, 77-98.
- Zautra AJ, Hofmann J, Potter P, Matt KS, Yocum D, Castro L** 1997 Examination of changes in interpersonal stress as a factor in disease exacerbations among women with rheumatoid arthritis. *Annals of Behavioural Medicine* 19, 279-286.
- Zayan R** 1990 The effect of social recognition upon aggression and corticosteroid in triads of piglets. In: *Social Stress in Domestic Animals*. Zayan R & Dantzer R (eds) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 157-199.
- Zelena D, Haller J, Halasz J** 1999 Social stress of variable intensity: physiological and behavioural consequences. *Brain Research Bulletin* 48, 297-302.

SECCIÓN II

**ESTUDIO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS Y
CIRCANUALES DE SECRECIÓN DE CORTISOL
EN ELEFANTE ASIÁTICO Y DEL
RINOCERONTE INDIO**

A close-up photograph of an Asian elephant's head and trunk. The elephant's skin is thick and wrinkled, with a light brown color. The trunk is visible on the left side, showing its characteristic rings. The background is a bright, sunny outdoor setting with some green foliage visible on the right.

**Diurnal salivary cortisol secretion in
Asian elephant (*Elephas maximus*)
as an interpretation tool in animal
welfare assessment.**

Capítulo III

**Menargues A, Urios V, Limiñana, R, Mauri, M.
Journal of Applied Animal Welfare Science,
en revisión.**

ABSTRACT

Salivary cortisol concentration is a stress indicator in animals. Defining patterns of cortisol secretion is very important to correctly interpret data obtained for welfare assessment of captive animals through salivary cortisol. To assess this, morning and evening saliva samples of three Asian elephants were collected and analysed by RIA to check whether significant differences between morning and evening salivary cortisol concentration exist. Significant higher salivary cortisol concentrations were found in the morning than at the evening in all individuals, with hormone levels being higher early in the morning than at the end of the evening. These results show that salivary cortisol of Asian elephant follow a diurnal pattern of secretion, which should be taken into account when using this methodology to assess welfare in captive individuals of this species.

Keywords: *animal welfare, Asian elephant, circadian rhythm, non-invasive, salivary cortisol, stress.*

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. INTRODUCTION

Health and welfare improvement is one of the main objectives of zoological parks. When animals are exposed to a stressor agent, the hypothalamic pituitary-adrenal axis is activated, inducing cortisol secretion by the adrenal cortex (Munck *et al* 1984, Sheriff *et al* 2011). The function of this glucocorticoid hormone includes facilitating the mobilization of energy reserves to prepare animals for a response such as fight or flee (Mason & Veasey 2010). Salivary cortisol concentration has been used to assess captive animal welfare in different species (Dathe *et al* 1992; Fuchs *et al* 1997, Menargues *et al* 2008). There is a high correlation between salivary glucocorticoids levels and free-unbound serum glucocorticoids levels (Sheriff *et al* 2011) and hence, this method is a non-invasive procedure that reflects free glucocorticoids concentration in blood (Kirschbaum & Hellhammer 1994, Gröschl 2007, Wood 2009). Serum cortisol concentrations in diurnal terrestrial mammals increase in the early morning and decrease at the evening, whereas show the opposite pattern in nocturnal animals. Knowledge of the basal secretory cortisol rhythms is necessary to evaluate the physiological significance of fluctuations in cortisol concentrations as stress indicator in animals (Suzuki *et al* 2003). In this sense, several studies of diurnal patterns in plasma cortisol secretion (Hudson *et al* 1975, Fulkerson *et al* 1980, Irvine & Alexander 1994, Ingram *et al* 1999, Suzuki *et al* 2003, Murphy *et al* 2007), urinary cortisol excretion (Brown *et al* 2010) and salivary cortisol levels (Ekkel *et al* 1996, Ruis *et al* 1997) have been carried out in different species.

The aim of this study is to test whether salivary cortisol levels of Asian elephant (*Elephas maximus*) vary according with time of day (morning/evening), to take into account these possible variations when using this method as a tool to assess welfare in captive Asian elephants (see also Brown *et al* 2010).

2. METHODS

2.1 Location and animals

The study was conducted at Terra Natura Zoological Park, Alicante, Spain (38°32' N and 0°08' W). Morning and evening salivary samples were obtained from three female Asian elephants (*Elephas maximus*), ranging from 22 to 25 years old (Momo: 22, Grande: 25 and Kaisoso: 25 years old). During night, Momo and Grande were housed together in the same stable and Kaisoso was housed with another female (Petita). Inside dimensions of both stables were $5 \times 8 \times 3.50$ m. During daytime, elephants were located in two different 3,000 m² dry meadows with artificial lakes (Momo and Grande were in the same meadow and Kaisoso in the other one). Diet of elephants consisted in oat, branches, fruit and vegetables, and they were also provided with *ad libitum* water. All animals were trained and handled using free-contact by keepers with whom they became familiar.

2.2. Sample collection

Two saliva samples of each elephant were taken on a daily basis, one at 0730h and the other at 19:30h during June 2007. Elephants were released into the meadows at 09:00h and came back to the stables at 19:00h. Therefore, morning samples were taken before feeding and cleaning cares, and evening samples were taken immediately after elephants returned to their cages and before feeding them at night. Samples were always collected at this time to avoid variations in saliva cortisol concentration (i.e., significantly large variation in concentrations can occur during early morning, within relatively short time intervals). Samples were collected using the Salivette® kit (Sarstedt, AG & Co, Numbrecht, Germany) and centrifuged at

2000 rpm for two min at 15°C. The eluted saliva was stored at -20°C until cortisol concentration was determined.

2.3. Hormone analyses

Salivary cortisol concentration was determined twice from every sample and used mean values for further analyses. To measure cortisol concentration, we used a modification of the solid-phase RIA (Coat-A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostics) and the tubes were counted on a Packard Cobra Auto Gamma Counter (Auto-Gamma® 5000 series, Cobra 5005, Packard Instruments Company). A minimum of 0.4 mL of saliva was required for the duplicate assay (Menargues *et al* 2008). Modifications were made in the form of increasing the volume of the sample to 200 µL, in the standard curve, through 1:10 dilutions of the standards and by increasing the incubation period to 24 h to increase assay sensitivity (López-Mondéjar *et al* 2006). This assay was previously validated (Menargues *et al* 2008).

2.4. Statistical analysis

For every individual, morning and evening cortisol concentrations were compared using the non-parametric Mann-Whitney test. Statistical analyses were conducted using SPSS, version 15.0, and statistical significance was set at $P < 0,05$. All values are reported as mean $\pm$ SD.

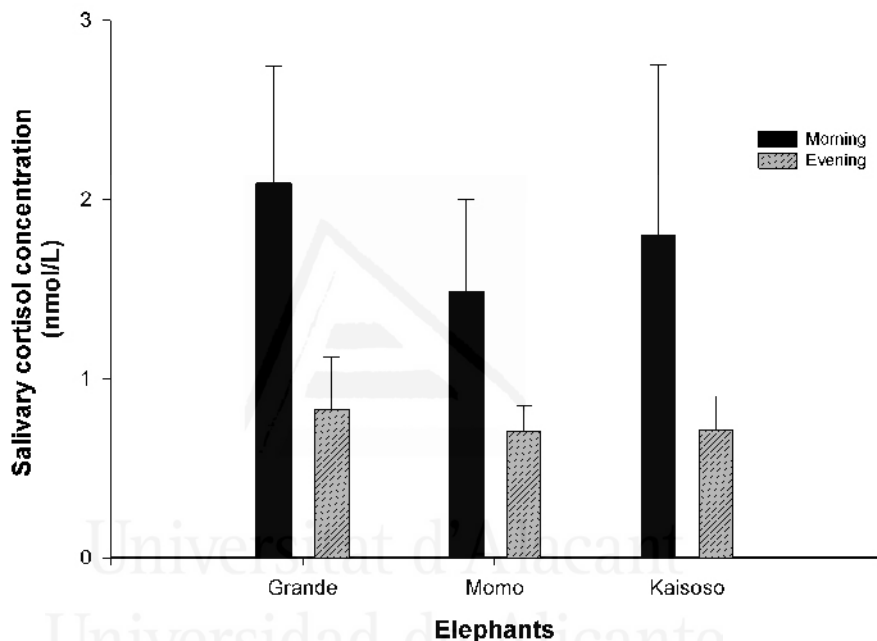
3. RESULTS

Mean salivary cortisol concentration was significantly higher at 07:30h than at 19:30h for each elephant: Grande: 2.09 ± 0.65 nmol l⁻¹ a.m.; 0.83 ± 0.29 nmol l⁻¹ p.m., Mann-Whitney $U = 15$; $P < 0.001$; $n = 48$; Kaisoso: 1.80 ± 0.95 nmol l⁻¹ a.m.;

0.71 ± 0.19 nmol l⁻¹ p.m., Mann-Whitney $U = 2.5$; $P < 0.001$; $n = 38$; Momo: 1.48 ± 0.51 nmol l⁻¹ a.m.; 0.70 ± 0.14 nmol l⁻¹ p.m., Mann-Whitney $U = 11$; $P < 0.001$; $n = 40$ (Figure 1).

Figure 3

Differences in mean values of salivary cortisol concentration of three Asian elephants between morning and evening. Error bars represent standard deviation.



4. DISCUSSION

Results presented here show that levels of salivary cortisol in captive Asian elephants are higher in the morning than at the end of evening (Figure 1), which suggest that secretion of this hormone follows a diurnal pattern of secretion. In diurnal animals, cortisol secretion affected by sleep-wake cycle, with cortisol concentrations being highest early in the morning and lowest at night (Fulkerson *et*

al 1980, Thun *et al* 1981, Czeisler & Klerman 1999, Luboshitzky 2000, Brown *et al* 2010).

Diurnal pattern of urinary cortisol excretion has been well characterised for Asian and African elephants (Brown *et al* 2010). Comparing the salivary cortisol levels found in this study with those reported by Brown *et al* (2010), a similar a similar pattern of cortisol secretion was observed. In both researches, samples taken at 7:30h (6-8h interval in Brown *et al* 2010) showed a cortisol concentration that was more than two times higher than those levels recorded at 19:30h (18-20h interval in Brown *et al* 2010).

It is known that salivary cortisol concentration is a good indicator of stress in animals (Beerda *et al* 1996, Fuchs *et al* 1997) and it has been revealed to be an easy tool to assess welfare for captive elephants (e.g. Menargues *et al* 2008). Baseline levels, as well as rapid and brief increases in cortisol concentration, may be easily detected in elephant saliva (Dathe *et al* 1992, Menargues *et al* 2008, Mason & Veasey 2010). Therefore, knowledge of these daily salivary cortisol patterns in Asian elephants is very important when using this method as a tool for welfare assessment in this species, given that there are fluctuations on the basal levels of cortisol related to hour collection (see also Ekkel *et al* 1996). Furthermore, the description of these general patterns could be improved by analysing differences in circadian salivary cortisol profiles related to age or gender of Asian elephants. Studies in pigs have demonstrated that baseline salivary cortisol concentrations slightly increase between 9 and 11 weeks of age and also between 13 and 15 weeks, and then gradually decrease until 22 weeks of age (de Jong *et al* 2000). In children, it has also been shown an increase in cortisol levels in the first 1-6 years of life, followed by a decrease until 15 years old (Onishi *et al* 1983, Haen *et al* 1994). Gender differences in pig's plasma cortisol have also been found with a higher value for barrows than for gilts (Ruis *et al* 1997).

5. CONCLUSIONS

Knowledge of the circadian pattern of cortisol secretion is of paramount importance to interpret data obtained for welfare assessment in captive Asian elephants through salivary cortisol. Asian elephants exhibit a diurnal pattern of salivary cortisol secretion, with cortisol levels increasing early in the morning and decreasing at the end of the evening. Adrenal cortisol activity in Asian elephants could be monitored using this non-invasive method of analysis of salivary cortisol concentration by RIA, which is a useful and objective method for stress assessment in the species.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Terra Natura Foundation for funding this study. We are also thankful to the Hormone Laboratory of the General University Hospital of Alicante for allowing us to use its analytical equipment.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

REFERENCES

- Beerda B, Schilder MBH, Janssen NSCRM, Mol JA 1996 The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behaviour* 30, 272-279.
- Brown JL, Kersey DC, Freeman EW, Wagener T 2010 Assessment of diurnal urinary cortisol excretion in Asian and African elephants using different endocrine methods. *Zoo Biology* 29, 274-283.
- Dathe HH, Kuckelkorn B, Minnemann D 1992 Salivary cortisol assessment for stress detection in the Asian Elephant (*Elephas maximus*): a pilot study. *Zoo Biology* 11, 285-289.
- Czeisler CA, Klerman EB 1999 Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Progress in Hormone Research* 54, 97-132.
- de Jong IC, Prelle IT, van de Burgwal JA, Lambooi E, Korte SM, Blokhuis HJ, Koolhaas JM 2000 Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior* 68, 571-578.
- Ekkel ED, Dieleman SJ, Shouten WGP, Portela A, Cornelissen G, Tielen MJM, Halberg F 1996 The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiology & Behavior* 60, 985-989.
- Fuchs E, Kirschbaum C, Benisch D, Bieser A 1997 Salivary cortisol: a non-invasive measure of hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *Laboratory Animals* 31, 306-311.
- Fulkerson WJ, Sawyer GJ, Gow CB 1980 Investigations of ultradian and circadian rhythms in the concentration of cortisol and prolactin in the plasma of dairy cattle. *Australian Journal of Biological Sciences* 33, 557-561.
- Gröschl M 2007 Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry* 54, 1759-1769.
- Haen E, Halberg F, Cornelissen G 1994 Cortisol marker rhythmometry in pediatrics and clinical pharmacology. *Annual Review of Chronopharmacology* 1, 165-8.
- Hudson S, Mullord M, Whittlestone WG, Payne E 1975 Diurnal variations in blood cortisol in the dairy cow. *Journal of Dairy Science* 58, 30-33.

- Ingram JR, Crockford JN, Matthews LR** 1999 Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *Journal of Endocrinology* 163, 289-300.
- Irvine CHG, Alexander SL** 1994 Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology* 11, 227-238.
- Kirchbaum C, Hellhammer DH** 1994 Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 19, 313-333.
- López-Mondéjar P, Fuentes MA, Mauri M, Mora A, Pérez-Soto M, Vargas F, Martín Hidalgo A** 2006 Determinación de cortisol salivar en el diagnóstico de la enfermedad de Cushing pediátrico. *Anales de Pediatría*, 64 270-272.
- Luboshitzky R** 2000 Endocrine activity during sleep. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 13, 13-20.
- Mason GJ, Veasey JS** 2010 How should the psychological well-being of zoo elephants be objectively investigated? *Zoo Biology* 29, 237-255.
- Menargues A, Urios V, Mauri M** 2008 Welfare assessment of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. *Animal Welfare* 17, 305-312.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ** 1984 Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological effects. *Endocrine Reviews* 5, 25-44
- Murphy B, Jeffrey E, Dawn S, Mandi V, Kennedy E, Fitzgerald B** 2007 Rapid phase adjustment of melatonin and core body temperature rhythms following a 6-h advance of the light/dark cycle in the horse. *Journal of Circadian Rhythm* Aug 24, 5:5.
- Onishi S, Miyazawa G, Nishimura Y, Sugiyama S, Tamakawa T, Inagaki H, Katoh T, Itoh S, Isobe K** 1983 Postnatal development of circadian rhythm in serum cortisol levels in children. *Pediatrics* 72, 399-404.
- Ruis MA, Te Brake JH, Engel B, Ekkel ED, Buist WG, Blokhuis HJ, Koolhaas JM** 1997 The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender and stress. *Physiology & Behavior* 62, 623-630.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehantym B, Palme R, Boonstra R** 2011 Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166, 869-887.
- Suzuki M, Uchida S, Ueda K, Tobayama T, Katsumata E, Yoshioka M, Aida K** 2003 Diurnal and annual changes in serum cortisol concentrations in Indo-Pacific bottlenose dolphins

Tursiops aduncus and killer whales
Orcinus orca. *General and
Comparative Endocrinology* 132,
427–433.

**Thun R, Eggenberger E, Zerobin
K, Luscher T, Vetter W** 1981
Twenty-four hour secretory
pattern of cortisol in the bull:
evidence of episodic secretion
and circadian rhythm.
Endocrinology 109, 2208-2212.

Wood P 2009 Salivary steroid
assays-research or routine?
Annals of Clinical Biochemistry 46,
183-196.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

**Seasonal pattern of salivary cortisol
secretion in Greater one-horned
rhino (*Rhinoceros unicornis*).**

Capítulo IV

Menargues A, Urios V, Limiñana R.
Animal Welfare, en revisión.

ABSTRACT

The Indian Rhinoceros or Greater One-horned Rhino (*Rhinoceros unicornis*) is classified as vulnerable by the IUCN Red List of Threatened Species and it is subjected to the European Endangered Species Programme since 1990. Ensure welfare of this species in captivity is key to enhance success in breeding programs. Salivary cortisol has been recently used to assess welfare of captive and free-ranging animals. Nevertheless, rhythms of cortisol secretion may fluctuate throughout the year and therefore, knowledge of circannual pattern of cortisol secretion is essential to evaluate the physiological significance of seasonal variations of cortisol levels as stress indicator in animals. This research analyzes monthly differences in cortisol secretion in the Indian Rhinoceros. Saliva samples of two rhinoceros were collected and analyzed by Radioimmunoassay during a whole year to determine cortisol concentration. Results revealed a seasonal pattern of salivary cortisol secretion. The highest cortisol concentrations were found in August and then decreased until reaching the lowest concentrations in January (northern hemisphere). Therefore, high levels of salivary cortisol were recorded in months with elevated temperatures, which may be related to a high attendance of visitors to the zoo. However, we cannot discard an endogenous mechanism controlling the seasonal cortisol secretion observed here. These results indicate that this annual variation in cortisol secretion should be taken into account when using cortisol as a tool to assess animal welfare in captive animals at zoological parks, as well as it opens new questions to further analyse these patterns.

Keywords: animal welfare, Indian Rhinoceros, non-invasive, salivary cortisol, seasonality, stress, zoo visitors.

1. INTRODUCTION

Rhinoceroses have existed on Earth for more than 50 million years. In the past, rhinoceros species were much more diverse and widespread (occurring also in North America and Europe, apart than Africa and Asia). Today, only five species of rhinoceros survive. Population of the Indian Rhinoceros or Greater One-horned Rhino (*Rhinoceros unicornis*), with a strict protection from Indian and Nepalese wildlife authorities, has recovered from less than 200 individuals in the early 1900s. Recently, the total population has been estimated in 2,575 individuals, with a total of 378 occurring in Nepal and 2,200 in India (Talukdar *et al* 2008, Milliken *et al* 2009). On the other hand, its distribution is largely fragmented, and more than 70% of the population occurs in Kaziranga National Park; a catastrophic event there could have a devastating impact on the status of the species.

Indian Rhinoceros living in European zoological parks are subjected to the European Endangered Species Programme (EEP) since 1990 (<http://www.eaza.net/activities/cp/Pages/EEPs.aspx>). Assessment of welfare in captive individuals of these species is key to ensure success in breeding programs. In this sense, prolonged physiological stress has as a consequence suppressed immune function, increased disease susceptibility, abnormal behaviour and poor reproduction (Moberg 1990). Moreover, well-being of zoo animals could be affected by attendance of visitors whose often want to observe and interact with the animals is close proximity (Fernandez *et al* 2009).

When animals are exposed to a stressor agent, the hypothalamic pituitary-adrenal (HPA) axis is activated, inducing cortisol secretion by the adrenal cortex (Munck *et al* 1984, Sheriff *et al* 2011). The function of this glucocorticoid hormone

includes facilitating the mobilization of energy reserves to prepare animals for a response such as fight or flee (Mason & Veasey 2010). Salivary cortisol concentration has been used to assess captive animal welfare in different species (Fuchs *et al* 1997, Pedernera-Romano *et al* 2006, Powell *et al* 2006, Menargues *et al* 2008). There is a high correlation between salivary glucocorticoids levels and free-unbound serum glucocorticoids levels (Sheriff *et al* 2011) and hence, this method is a non-invasive procedure that reflects free glucocorticoids concentration in blood (Kirschbaum & Hellhammer 1994, Gröschl 2007, Wood 2009).

Some studies show that cortisol secretion exhibits variations that fluctuate within or about 24h (ultradian and circadian rhythms respectively) (Ekkel *et al* 1996, Ruis *et al* 1997, de Jong *et al* 2000, Brown *et al* 2010), as well as annual changes in cortisol secretion (seasonal or circannual rhythms) (Monfort *et al* 1993, Ingram *et al* 1999, Suzuki *et al* 2003, Vera *et al* 2011). Moreover, in several species, an influence of climatic temperature on cortisol concentration variation has been described (Millspaugh *et al* 2001, Huber *et al* 2003, Brown *et al* 2010). Nevertheless, circannual rhythms of cortisol secretion, as well as the influence of temperature on these patterns, have not been described in the Greater One-horned rhinoceros yet. Knowledge of this seasonal secretory rhythm in cortisol is necessary when evaluating the physiological significance of fluctuations of this hormone throughout the year as a stress indicator in animals. The aim of this study is to test whether a pattern of seasonal cortisol secretion exists in this species, using a saliva analysis method to determine cortisol levels, in order to help interpreting data of this hormone concentration in welfare assessment.

2. METHODS

2.1 Location

The study was conducted at Terra Natura Zoological Park, Alicante, Spain (38°32'N, 0°08'W). Daily salivary cortisol concentration was recorded for two non-pregnant, female Indian Rhinoceros that were three and four years old (Shiwa and Nisha, respectively), both weighing around 1,500 kg. Rhinoceros arrived at this zoological park in March 2003: Nisha came from Stuttgart Zoo and Shiwa from Munich Zoo. Each rhinoceros was housed at night in individual cages of 20 m² and, from 09:00h to 18:00h, they freely ranged in a meadow of 2000 m² equipped with an artificial lake. Animals were fed on a diet of oats, branches, fruit and vegetables, and were provided with *ad libitum* water. Rhinoceroses were trained and handled using free-contact by keepers with whom they became familiar.

2.2. Sample collection

Saliva samples were taken on a daily basis at 07:30h during a whole year from first August 2005 to end of July 2006, before feeding and cleaning cares. Samples were always collected at this time to avoid variations in saliva cortisol concentration, given that significantly large variation in cortisol concentrations occur during early morning within relatively short time intervals (Brown *et al* 2010). Samples were collected using the Salivette® kit (Sarstedt, AG & Co, Numbrecht, Germany) and centrifuged at 2000 rpm for two min at 15°C. The eluted saliva was stored at -20°C until assaying.

2.3. Hormone analyses

Salivary cortisol was measured in duplicate, using a solid-phase Radioimmunoassay (RIA) (Coat-A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostics) and the tubes were counted on a Packard Cobra Auto Gamma

Counter (Auto-Gamma® 5000 series, Cobra 5005, Packard Instruments Company). A minimum of 0.4 ml of saliva was required for the duplicate assay (Menargues *et al* 2008). Modifications were made in the form of increasing the volume of the sample to 200 μ L, in the standard curve, through 1:10 dilutions of the standards and by increasing the incubation period to 24 h to increase assay sensitivity (López-Mondéjar *et al* 2006). This assay was previously validated (Menargues *et al* 2008).

2.4. Statistical analysis

Differences in cortisol concentration between months and individuals (also considering the interaction between both variables) were analysed using a Generalized Linear Model (GLM), with a normal error distribution and a identity log function; pairwise post-hoc comparison were conducted using the Games-Howell test. Pearson's correlation coefficient was used to test if rhinoceroses cortisol profiles of both rhinos (based in mean monthly values) were correlated. Pearson's correlation was also used to test for correlation between mean monthly temperatures and mean monthly cortisol concentration of both individuals. Temperature data was provided by Villajoyosa Weather Station (which is located seven kilometres away from Terra Natura Zoological Park) from the Irrigation Technology Service, Valencian Institute of Agrarian Research. Statistical analyses were conducted using SPSS, version 15.0. All values are reported as mean $\pm$ SD and statistical significance was set at $P < 0.05$.

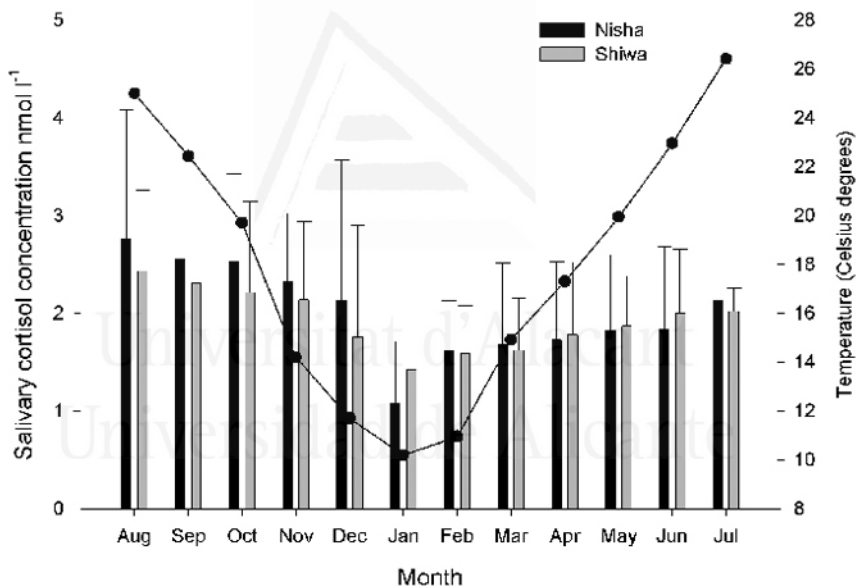
3. RESULTS

Mean monthly salivary cortisol concentration of rhinoceroses ranged between 1.08 ± 0.63 nmol l⁻¹ (Nisha, January) and 2.76 ± 1.32 nmol l⁻¹ (Nisha,

August) (Table 1), with levels of both individuals showing a positive correlation throughout the whole year ($r = 0.940$, $P < 0.001$; Figure 1). Mean monthly salivary cortisol concentration increased between February and August, reaching the highest peak of cortisol level in the latter month. From August on, hormone levels decreased, reaching the lowest values in January.

Figure 1

Mean monthly salivary cortisol concentration (vertical bars) of two Indian rhinoceroses during a whole year (from August 2005 to July 2006); error bars represent standard deviation. Line represents mean monthly temperature in this same period.



Indeed, there were significant differences in mean salivary cortisol concentration between months ($\chi^2_{11} = 63.93$, $P < 0.001$), especially due to significant differences between the warmest and coldest months (Table 2). In contrast, there were not differences between individuals ($\chi^2_1 = 0.73$, $P = 0.392$), nor for the interaction between individuals and months ($\chi^2_{11} = 5.16$, $P = 0.923$). Additionally, mean monthly temperature was positively correlated to mean

monthly cortisol concentration in both rhinos during the study period (Nisha $r = 0.597$, $P = 0.04$; Shiwa $r = 0.751$, $P = 0.005$; Figure 1).

Table 1. Mean monthly salivary cortisol concentration of two Indian rhinos from August 2005 to July 2006. Values are expressed as mean $\pm$ SD, in nanomol/litres (nmol l⁻¹). Sample size is given in parentheses.

Rhino	NISHA	SHIWA
Month		
AUG	2,76 $\pm$ 1,32 (15)	2,43 $\pm$ 0,83 (15)
SEP	2,56 $\pm$ 1,40 (16)	2,31 $\pm$ 1,28 (16)
OCT	2,53 $\pm$ 0,90 (15)	2,21 $\pm$ 0,93 (15)
NOV	2,32 $\pm$ 0,70 (15)	2,14 $\pm$ 0,80 (22)
DEC	2,13 $\pm$ 1,44 (17)	1,76 $\pm$ 1,14 (18)
JAN	1,08 $\pm$ 0,63 (25)	1,42 $\pm$ 1,05 (15)
FEB	1,62 $\pm$ 0,51 (14)	1,59 $\pm$ 0,49 (14)
MAR	1,68 $\pm$ 0,83 (27)	1,62 $\pm$ 0,54 (26)
APR	1,73 $\pm$ 0,80 (16)	1,78 $\pm$ 0,74 (19)
MAY	1,82 $\pm$ 0,78 (14)	1,87 $\pm$ 0,51 (14)
JUN	1,84 $\pm$ 0,84 (15)	2,00 $\pm$ 0,66 (16)
JUL	2,13 $\pm$ 0,71 (16)	2,02 $\pm$ 0,24 (19)

4. DISCUSSION

Several studies in mammals have revealed a circannual pattern of cortisol secretion in different species such as the Red Deer *Cervus elaphus* (Ingram *et al* 1999), Bottlenose Dolphins *Tursiops aduncus*, Killer Whales *Orcinus orca* (Suzuki *et al* 2003) or Tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Vera *et al* 2011). This research revealed that Indian Rhinoceros studied also showed a seasonal pattern of salivary cortisol

secretion, reaching the highest cortisol level in August whereas the lowest cortisol concentration was found in January, which was true for the two individuals studied, as monthly values of both rhinoceroses were significantly and positively correlated.

Table 2. Games-Howell post-hoc multiple comparison test between months of mean salivary cortisol concentration of two Indian Rhinoceroses.

	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
January												
February	n.s											
March	n.s	n.s										
April	n.s	n.s	n.s									
May	*	n.s	n.s	n.s								
June	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s							
July	**	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s						
August	**	*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s					
September	**	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s				
October	**	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s			
November	***	**	*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s		
December	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	

* Significance level: $P < 0.05$

** Significance level: $P < 0.01$

*** Significance level: $P < 0.001$

n.s. non significant

Seasonality in the HPA axis function is not fully understood yet. Vera *et al* (2011) suggest that under natural conditions, cortisol levels are affected by environmental stimuli or by different endogenous regulation, both resulting in this seasonal secretion. Amirat *et al* (1980) described in their study that the response of adrenal tissue versus adrenocorticotrophic hormone (ACTH) signal changes seasonally and adrenal mass is often correlated with plasma glucocorticoids.

Several tortoises (Gregory *et al* 1996, Whittier *et al* 1997, Schramm *et al* 1999, Lance *et al* 2001), lizards (Grassman & Hess 1992, Manzo *et al* 1994, Wilson & Wingfield 1994) snakes (Krohmer *et al* 1987, Tyrrel & Cree 1998, Moore *et al* 2001), amphibians (Zerani & Gobbeti 1993, Harvey *et al* 1997), birds (Wingfield *et al* 1992, Kotrschal *et al* 1998), and few mammals species (Sangalang & Freeman 1976, Cavigelli 1999) show increased glucocorticoid levels during the breeding season (Romero 2002). The annual pattern of cortisol secretion described here for Indian Rhinoceros follows an increasing tendency from February to August and then it decreases until January. This pattern follows the annual changes in monthly temperatures, and high levels of salivary cortisol coincided with elevated annual temperatures, whereas low hormone concentrations coincided with the lower temperatures. Studies in Asian Elephants revealed that this species showed a seasonal pattern of salivary cortisol, although no correlation between temperature and annual cortisol secretion was observed (A Menargues, unpublished observations).

Romero (2002) put forward three hypotheses to explain seasonal modulation in glucocorticoids (GC) levels; the Energy Mobilization, the Behavioural, and the Preparative hypotheses are derived from different aspects of GC physiology. For the *Energy Mobilization Hypothesis* the author posits that GC concentrations will be highest during energetically costly periods of the year (i.e., breeding season, hibernation in some mammals or migration in birds), to move energy reserves to fulfil the energetic requirements during these periods. The *Behavioural Hypothesis* suggests that there is a need to seasonally regulate the expression of behaviours (such as fleeing an area and relocating during adverse environmental conditions) which drive GC release rhythms. And finally, *The Preparative Hypothesis* proposes that annual changes in glucocorticoids concentrations serve to modulate the priming of stress pathways during periods with different potential exposures to adverse conditions, according to life-histories

of the different species, such predation (Mason 1998), disease (Dunlap & Schall 1995) or competition for mates (Sapolski 1992).

The Indian Rhinoceros is a species that can be in heat whenever in the year, so that it is not subject to a period of reproductive quiescence and thus, no effect of breeding season in cortisol levels is expected. In addition, the two females studied had not reached their sexual maturity yet, given that this occur when individual are between five and seven years old (Talukdar *et al* 2008). Moreover, it is neither a migratory or a hibernating species. Therefore, the Energy Mobilization and Behavioural Hypotheses are not likely to explain the Indian Rhinoceros' seasonal pattern of cortisol secretion. In contrast, according to *The Preparative Hypothesis*, as described by Romero (2002), we may argue that hot or cold temperatures may represent adverse conditions for this species, endogenously controlling cortisol secretion. In this sense, high cortisol levels have been found in undisturbed Red Deers in the Northern Hemisphere in December and January, probably related to cold temperatures (Huber *et al* 2003). However, for captive Asian Elephants, whose individuals can be also on heat whenever in the year, the highest cortisol levels have been found in both the coldest and hottest periods of the year (Brown *et al* 2010). Hence, we cannot discard an endogenous mechanisms controlling the seasonal variations in cortisol levels found here.

On the other hand, in summer, zoological parks receive a higher number of visitors, which could negatively affect animal welfare during these months of good weather, increasing cortisol levels of stressed individuals (Menargues *et al* 2008). A critical issue in the exhibited zoo animals is the impact that visitors have on the behaviour and well-being of these animals (Fernandez *et al* 2009). Several studies suggest that zoo visitors produce stress on animals, and these stressful effects depends on the species (Anderson *et al* 2002, Mallpur & Chellam 2002). In this sense, Carlstead & Brown (2005) found that corticoids concentration were

positively correlated with exposure to zoo visitors in Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*), and several studies also reveal that zoo visitors are a source of stress for primates (Hossey 2000).

This research is a first approach to describe the seasonal pattern of cortisol secretion in Indian Rhinoceros. Nevertheless, more studies should be carried out at other zoos and with free-ranging individuals to describe the overall seasonal pattern in cortisol secretion in this species. Also, this would be helpful to analyze endogenous or environmental control in these patterns, as well as to assess whether stressor agents could influence the seasonal pattern of cortisol secretion in the Indian Rhinoceros. Knowledge of these circannual rhythms in cortisol secretion is essential to establish assessment criteria to interpret data obtained for welfare assessment in captive individuals of this species through salivary cortisol.

5. CONCLUSIONS

The Indian Rhinoceroses studied here revealed a seasonal pattern of salivary cortisol secretion. Cortisol profiles of both individuals showed a positive correlation between them, being also correlated with annual temperature pattern. The highest cortisol concentration was recorded in August and the lowest hormone level was observed in January (northern hemisphere). Despite some possible endogenous regulation of this seasonal pattern, zoo visitors could be a source of stress in this species, thus increasing cortisol levels of animals during the warmest months of the year, when more visitors attend to the zoo. An improved knowledge of this seasonal pattern in cortisol secretion in this species is necessary to evaluate the physiological significance of fluctuations in cortisol concentrations as stress indicator in animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Terra Natura Foundation for funding this study. Also, we want to thank the Hormone Laboratory of the General University Hospital of Alicante for allowing us to use its analytical equipment. This manuscript is part of the PhD thesis of AM at the University of Alicante.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

REFERENCES

- Amirat Z, Khammar F, Brudieus R** 1980 Seasonal changes in plasma and adrenal concentrations of cortisol, corticosterone, aldosterone, and electrolytes in the adult male sand rat (*Psammomys obesus*). *General and Comparative Endocrinology* 40 36-43.
- Anderson US, Benne M, Bloomsmith MA, Maple TL** 2002 Retra space and human visitor density moderate undesirable behavior in petting zoo animals. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 5 125-137.
- Brown JL, Kersey DC, Freeman EW, Wagener T** 2010 Assessment of diurnal urinary cortisol excretion in Asian and African elephants using different endocrine methods. *Zoo Biology* 29 274-283.
- Carlstead K, Brown JL** 2005 Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. *Zoo Biology* 24 215-232.
- Cavigelli SA** 1999 Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Animal Behaviour* 57 935-944.
- de Jong IC, Prella IT, van de Burgwal JA, Lambooi E, Korte SM, Blokhuis HJ, Koolhaas JM** 2000 Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior* 68 571-578.
- Dunlap KD, Schall JJ** 1995 Hormonal alterations and reproductive inhibition in male fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) infected with the malarial parasite *Plasmodium mexicanum*. *Physiological Zoology* 68 608-621.
- Eckel ED, Dieleman SJ, Shouten WGP, Portela A, Cornelissen G, Tielen MJM, Halberg F** 1996 The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiology & Behavior* 60 985-989.
- Fernandez EJ, Tamborski MA, Pickens SR, Timberlake W** 2009 Animal-visitor interactions in the modern zoo: Conflicts and interventions. *Applied Animal Behavior Science* 120 1-8.
- Fuchs E, Kirschbaum C, Benisch D, Bieser A** 1997 Salivary cortisol: a non-invasive measure of hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *Laboratory Animals* 31 306-311.
- Grassman M, Hess DL** 1992. Sex differences in adrenal function in the lizard *Cnemidophorus sexlineatus*. I. Seasonal variation in the field.

- Journal of Experimental Zoology* 264 177–182.
- Gregory LF, Gross TS, Bolten AB, Bjørndal KA, Guillette Jr LJ** 1996 Plasma corticosterone concentrations associated with acute captivity stress in wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *General and Comparative Endocrinology* 104 312–320.
- Gröschl M** 2007 Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry* 54 1759–1769.
- Harvey LA, Propper CR, Woodley SK, Moore MC** 1997 Reproductive endocrinology of the explosively breeding desert spadefoot toad, *Scaphiopus couchii*. *General and Comparative Endocrinology* 105 102–113.
- Hosey GR** 2000. Zoo animals and their human audiences: What is the visitor effect? *Animal Welfare* 9 343–357.
- Huber S, Palme R, Arnold W** 2003 Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *General and Comparative Endocrinology* 130, 48–54.
- Ingram JR, Crockford JN, Matthews LR** 1999 Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *Journal of Endocrinology* 163 289–300.
- Kirchbaum C, Hellhammer DH** 1994 Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 19 313–333.
- Kotrschal K, Hirschenhauser K, Moestl E** 1998 The relationship between social stress and dominance is seasonal in greylag geese. *Animal Behaviour* 55 171–176.
- Krohmer RW, Grassman M, Crews D** 1987 Annual reproductive cycle in the male red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*: field and laboratory studies. *General and Comparative Endocrinology* 68 64–75.
- Lance VA, Grumbles JS, Rostal DC** 2001 Sex differences in plasma corticosterone in desert tortoises, *Gopherus agassizii*, during the reproductive cycle. *Journal of Experimental Zoology* 289 285–289.
- López-Mondejar P, Fuentes MA, Mauri M, Mora A, Pérez-Soto M, Vargas F, Martín Hidalgo A** 2006 Determinación de cortisol salivar en el diagnóstico de la enfermedad de Cushing pediátrico. *Anales de Pediatría* 64 270–272.
- Mallapur A, Sinha A, Waran N** 2005 Influence of visitor presence on the behavior of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*) housed in Indian zoos. *Applied Animal Behavior Science* 94 341–352.
- Manzo C, Zerani M, Gobbetti A, Maddalena Di Fiore M, Angelini F** 1994 Is corticosterone involved in the reproductive processes of the male lizard, *Podarcis sicula sicula*? *Hormones and Behavior* 28 117–129.
- Mason G** 1998 The physiology of the hunted deer. *Nature* 391 22.
- GJ Mason, J Veasey** 2010 What do population-level welfare indices

- suggest about the well-being of zoo elephants? *Zoo Biology* **29** 256-273.
- Menargues A, Urios V, Mauri M** 2008 Welfare assessment of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. *Animal Welfare* **17** 305-312.
- Milliken T, Emslie RH, Talukdar, B** 2009 African and Asian Rhinoceroses – Status, Conservation and Trade. IUCN Species Survival Commission (IUCN/SSC) African and Asian Rhino Specialist Groups and TRAFFIC to the CITES Secretariat. Available at: <http://www.cites.org/common/cop/15/doc/E15-45-01A.pdf>
- Millspough JJ, Woods RJ, Hunt KE, Raedeke KJ, Brundige GC, Washburn BE, Wasser SK** 2001 Fecal glucocorticoid assays and the physiological stress response in elk. *Wildlife Society Bulletin* **29**, 899–907.
- Monfort SL, Brown JL, Wildt DE** 1993 Episodic and seasonal rhythms of cortisol secretion in male Eld's deer (*Cervus eldi thamin*). *Journal of Endocrinology* **138** 41-49.
- Moberg GP** 1990 How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science* **74** 304–311.
- Moore IT, Greene MJ, Mason RT** 2001 Environmental and seasonal adaptations of the adrenocortical and gonadal responses to capture stress in two populations of the male garter snake, *Thamnophis sirtalis*. *Journal of Experimental Zoology* **289** 99–108.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NI** 1984 Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relationship to pharmacological actions. *Endocrine Reviews* **5** 25-44.
- Pedernera-Romano C, Valdez RA, Singh S, Chiappa X, Romano MC, Galindo F** 2006 Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): a non-invasive technique. *Animal Welfare* **15** 359-362.
- Powell DM, Carlstead K, Tarou LR, Brown JL, Monfort SL** 2006 Effects of construction noise on behaviour and cortisol levels in a pair of captive Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Zoo Biology* **25** 391-408.
- Romero LM** 2002 Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* **128** 1-24.
- Ruis MA, Te Brake JH, Engel B, Ekkel ED, Buist WG, Blokhuis HJ, Koolhaas JM** 1997 The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender and stress. *Physiology & Behavior* **62** 623-630.
- Sangalang GB, Freeman HC** 1976 Steroids in the plasma of the gray seal, *Halichoerus grypus*. *General and Comparative Endocrinology* **29** 419–422.
- Sapolsky RM** 1992 Cortisol concentrations and the social significance of rank instability

- among wild baboons. *Psychoneuroendocrinology* 17 701–709.
- Schramm BG, Casares M, Lance VA** 1999. Steroid levels and reproductive cycle of the Galapagos tortoise, *Geochelone nigra*, living under seminatural conditions on Santa Cruz island (Galapagos). *General and Comparative Endocrinology* 114 108–120.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehantym B, Palme R, Boonstra R** 2011 Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166 869–887.
- Suzuki M, Uchida S, Ueda K, Tobayama T, Katsumata E, Yoshioka M, Aida K** 2003 Diurnal and annual changes in serum cortisol concentrations in Indo-Pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* and killer whales *Orcinus orca*. *General and Comparative Endocrinology* 132 427–433.
- Talukdar BK, Emslie R, Bist SS, Choudhury A, Ellis S, Bonal BS, Malakar MC, Talukdar BN, Barua, M** 2008 *Rhinoceros unicornis*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 August 2011.
- Tyrrell CL, Cree A** 1998 Relationships between corticosterone concentration and season, time of day and confinement in a wild reptile (tuatara, *Sphenodon punctatus*). *General and Comparative Endocrinology* 110 97–108.
- Vera F, Antenucci CD, Zenuto RR** 2011 Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *General and Comparative Endocrinology* 170 550–557.
- Whittier JM, Corrie F, Limpus C** 1997 Plasma steroid profiles in nesting loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in Queensland, Australia: relationship to nesting episode and season. *General and Comparative Endocrinology* 106 39–47.
- Wilson BS, Wingfield JC** 1994 Seasonal and interpopulational variation in plasma levels of corticosterone in the side-blotched lizard (*Uta stansburiana*). *Physiological Zoology* 67 1025–1049.
- Wingfield JC, Vleck CM, Moore MC** 1992 Seasonal changes of the adrenocortical response to stress in birds of the Sonoran Desert. *Journal of Experimental Zoology* 264 419–428.
- Wood P** 2009 Salivary steroid assays—research or routine? *Annals Of Clinical Biochemistry* 46 183–196.
- Zerani M, Gobbetti A** 1993 Corticosterone during the annual reproductive cycle and in sexual behavior in the crested newt, *Triturus carnifex*. *Hormones and Behavior* 27 29–37.

A photograph of two Asian elephants resting in a pool of water. The elephants are partially submerged, with their heads and trunks visible above the water. They have dark, wrinkled skin with some reddish-brown patches. In the background, there is a traditional building with a tiled roof and arched windows. The water is a murky green color.

**Seasonal rhythms of salivary cortisol
secretion in Asian elephants
(*Elephas maximus*).**

V
Capítulo

**Menargues A, Urios V, Limiñana R.
General and Comparative Endocrinology,
en revisión.**

ABSTRACT

Salivary cortisol has been used recently to assess welfare of captive and free-ranging animals. However, rhythms of cortisol secretion may vary annually and thus, knowledge of this is necessary when evaluating the physiological significance of fluctuations of this hormone throughout the year as a stress indicator in animals. Here, we analyze monthly differences in cortisol secretion in Asian elephants (*Elephas maximus*). Saliva samples of 8 Asian elephants were collected and analyzed by Radioimmunoassay during a whole year. Results revealed a seasonal pattern of salivary cortisol secretion and significant differences in cortisol concentration among months were founded. Overall, the highest cortisol level was found in October, when it began to decrease until reaching the lowest concentration in April from when it increased again. Mean monthly values of cortisol concentration were significantly and positively correlated with individual monthly values in six of the eight elephants studied. These results indicate that this annual variation in cortisol secretion should be taken into account when using cortisol as a tool to assess animal welfare in captive animal at zoological parks, as well as it opens new questions to further analyse these patterns.

Keywords: animal welfare, Asian elephant, non invasive, salivary cortisol, seasonality, stress.

1. INTRODUCTION

Glucocorticoids (GC) have been used recently to assess welfare of captive and free-ranging animals. Cortisol is a glucocorticoid released from the adrenal cortex as result of the activation of the hypothalamic-pituitary adrenal axis (HPA). This hormone is an indicator of animal wellbeing, and its levels increase during times of distress (Powell *et al* 2006, Menargues *et al* 2008). Not all stress situations are harmful, for example, GC are also released in response to situations that are not normally regarded as stressful like hunting, courtship or copulation (Broom & Johnson 1993). However, chronic stress produces elevated GC concentrations, which may have deleterious effects on fitness like immunosuppression and atrophy of tissues (Munck *et al* 1984), inhibit bone formation resulting in accelerated bone loss (Kleerekoper 1997) and poor reproductive success (Liptrap 1993, Dobson & Smith 1995). Diurnal and seasonal variation of cortisol levels regulates physiological processes and plays an important role in metabolism and in regulating body homeostasis (Ohl *et al* 1999). Several studies have found an effect of temperature on seasonal cortisol secretion in some species (Dantzer & Mormede 1983, Saltz 1991, Yousef *et al* 1991, Huber *et al* 2003).

Salivary cortisol concentration has been used to assess animal welfare in different species [(Dathe *et al* 1992, Beerda *et al* 1996, Fuchs *et al* 1997, Oki & Atkinson 2004, Pedernera-Romano *et al* 2006, Menargues *et al* 2008). There is a high correlation between salivary glucocorticoids levels and free-unbound serum glucocorticoids levels (Sheriff *et al* 2011) and hence, this method is a non-invasive procedure that reflects free glucocorticoids concentration in blood (Kirchbaum & Hellhammer 1994, Gröschl 2007, Wood 2009). Some studies show that cortisol exhibits variations that fluctuate within or about 24h (ultradian and circadian rhythms respectively) (Fulkerson *et al* 1980, Ekkel *et al* 1996, Ruis *et al* 1997,

Ingram *et al* 1999, de Jong *et al* 2000, Brown *et al* 2010) and annual changes in cortisol secretion (seasonal or circannual rhythms) (Ingram *et al* 1999, Monfort *et al* 1993, Suzuki *et al* 2003, Vera *et al* 2011). Nevertheless, circannual rhythms of cortisol secretion have not yet been described in Asian elephants. Knowledge of the seasonal secretory rhythms in cortisol is necessary when evaluating the physiological significance of fluctuations of this hormone throughout the year as a stress indicator in animals. The aim of this study is to test whether a pattern of seasonal cortisol secretion exists by using a saliva analysis method, in order to help interpreting data of cortisol concentration in welfare assessment of this species.

2. METHODS

2.1 Location and animals

The study was conducted at Terra Natura Zoological Park, Alicante, Spain (38°32'N, 0°08'W). Daily salivary cortisol concentration was recorded for eight non-pregnant, female Asian elephants (*Elephas maximus*), ranging from 21 to 46 years old (Momo: 21, Grande: 24, Kaisoso: 24, Tania 31, Petita 34, Motki 37, Jasmin 40 and Baby 46 years old). Three of the elephants (Tania, Jasmin and Motki) arrived at Terra Natura Zoological Park in August 2004 from Austria (Gänserndorf Safari Park), three other ones (Petita, Baby and Kaisoso) arrived in December 2004, having previously resided at the Safari Park Vergel (Vergel, Alicante, Spain) whilst the other two (Grande and Momo) arrived in May 2005 from Austria (Gänserndorf Safari Park). One of the elephants (Baby) was housed individually in a cage measuring 5 x 6 x 3,5 m during the night due to conflicts with other elephants, while the rest of the herd was housed in groups in cages also measuring 5 x 8 x 3,5 m; one group consisted of two individuals (Kaisoso and

Petita), another group of three elephants (Tania, Modki and Jasmin) and other group of two elephants (Momo and Grande). During the day (09:00 to 19:00h) time was spent in three different dry meadows of 3000, 5000 and 8000 m² which were equipped with artificial lakes and waterfalls. Animals were fed on a diet of oats, branches, fruit and vegetables, and were provided with *ad libitum* water. All the animals were trained and managed using free-contact by keepers with whom they became familiar.

2.2. Sample collection

Saliva samples were taken on a daily basis at 07:30h during a whole year from first August 2005 to end of July 2006, before feeding and cleaning cares. Samples were always collected at this time to avoid variations in saliva cortisol concentration, given that significantly large variation in cortisol concentrations occur during early morning within relatively short time intervals. Samples were collected using the Salivette® kit (Sarstedt, AG & Co, Numbrecht, Germany) and centrifuged at 2000 rpm for two min at 15°C. The eluted saliva was stored at –20°C until assaying.

2.3. Hormone analyses

Salivary cortisol was measured in duplicate, using a modification of the solid-phase Radioimmunoassay (RIA) (Coat-A-Count®, Siemens Medical Solutions Diagnostics) and the tubes were counted on a Packard Cobra Auto Gamma Counter (Auto-Gamma® 5000 series, Cobra 5005, Packard Instruments Company). A minimum of 0.4 ml of saliva was required for the duplicate assay (Menargues *et al* 2008). Modifications were made in the form of increasing the volume of the sample to 200 µL, in the standard curve, through 1:10 dilutions of the standards and by increasing the incubation period to 24 h to increase assay

sensitivity (López-Mondejar *et al* 2006). This assay was previously validated (Menargues *et al* 2008).

2.4. Statistical analysis

Between-month differences in cortisol concentration were analysed using repeated measures analysis of variance (ANOVA), using all data obtained from each individual (random factor) in each month. The Huynh and Feldt correction was used in Mauchly's Test of Sphericity in elephant analysis. The Bonferroni multiple comparison post-hoc test was used to test for pairwise differences in mean monthly cortisol concentration.

The Pearson's correlation coefficient was used to test whether elephants' cortisol profiles were correlated with mean monthly cortisol concentrations of all individuals. Pearson's correlation was also used to test for correlation between mean monthly temperatures and mean monthly cortisol concentration of all elephants. Temperature data was provided by Villajoyosa Weather Station (which is located 7 kilometres away from Terra Natura Zoologica Park) from the Irrigation Technology Service, Valencian Institute of Agrarian Research. Statistical analyses were conducted using SPSS, version 15.0. All values are reported as mean $\pm$ SD and statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. RESULTS

Figure 1 shows the similarities in annual salivary cortisol profiles measured for each elephant monitored for one year. Overall, mean monthly salivary cortisol concentration of elephants ranged from 1.55 ± 0.67 nmol/l (Tania, January) to 4.93 ± 1.97 nmol/l (Grande, October) (Table 1). In general, mean monthly salivary

cortisol concentration increases between May and October in all individuals, reaching in these months the highest peaks of cortisol level (Figure 2). From October on hormone levels begin to decrease, reaching the lowest values in April.

Figure 1

Mean monthly concentration of salivary cortisol of eight Asian elephants from august 2005 to July 2006. Units of cortisol concentrations are expressed in nanomol / litre (nmol/l).

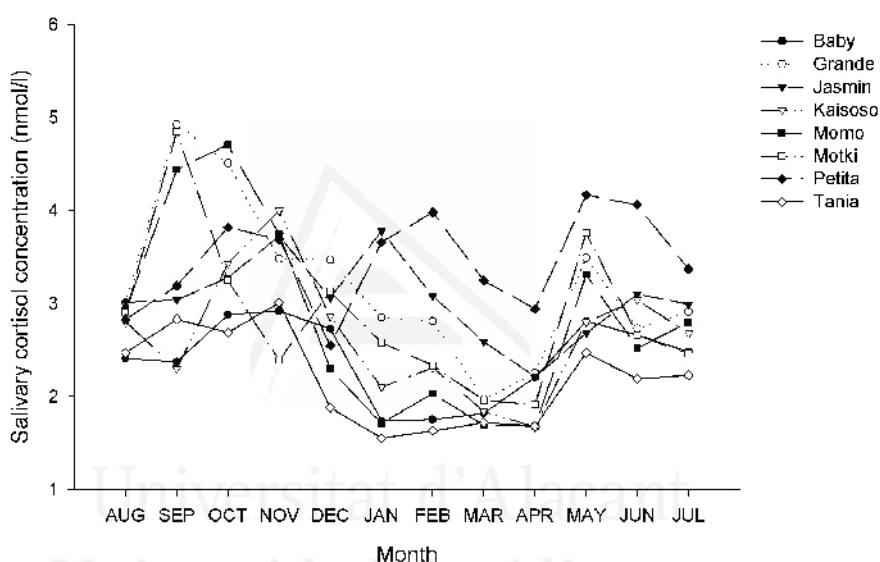


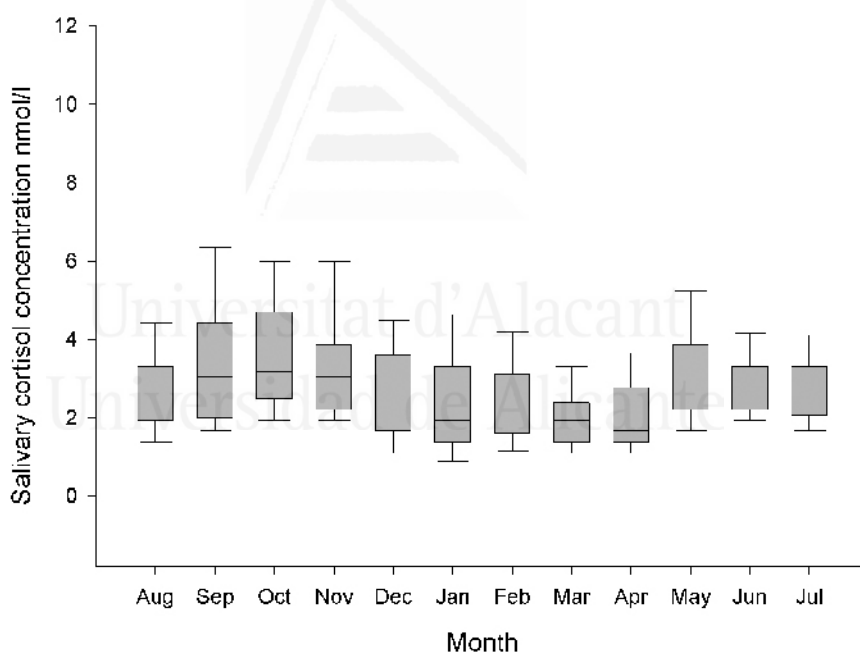
Table 1. Mean monthly salivary cortisol concentration of eight Asian elephants from August 2005 to July 2006. Values are expressed as mean $\pm$ SD, in nanomol/litres (nmol l⁻¹). Sample size is given in parentheses.

Eleph Month	BABY	GRANDE	JASMIN	KAISOSO	MOMO	MOTKI	PETITA	TANIA
AUG	2,41 $\pm$ 0,97 (16)	3,01 $\pm$ 1,95 (11)	3,01 $\pm$ 1,12 (18)	2,80 $\pm$ 1,04 (20)	2,93 $\pm$ 1,17 (10)	2,90 $\pm$ 1,48 (21)	2,83 $\pm$ 0,89 (17)	2,47 $\pm$ 1,25 (20)
SEP	2,37 $\pm$ 0,80 (25)	4,93 $\pm$ 1,97 (28)	3,04 $\pm$ 1,52 (19)	2,30 $\pm$ 0,86 (29)	4,44 $\pm$ 1,59 (25)	4,85 $\pm$ 2,04 (28)	3,19 $\pm$ 1,70 (28)	2,83 $\pm$ 1,40 (25)
OCT	2,88 $\pm$ 0,95 (14)	4,51 $\pm$ 1,90 (18)	3,28 $\pm$ 1,45 (9)	3,43 $\pm$ 1,57 (14)	4,71 $\pm$ 1,48 (12)	3,25 $\pm$ 1,14 (14)	3,82 $\pm$ 1,94 (12)	2,69 $\pm$ 1,09 (15)
NOV	2,92 $\pm$ 1,49 (14)	3,48 $\pm$ 1,64 (28)	3,73 $\pm$ 1,25 (20)	4,00 $\pm$ 1,98 (27)	3,75 $\pm$ 1,57 (17)	2,39 $\pm$ 0,99 (26)	3,69 $\pm$ 2,03 (24)	3,01 $\pm$ 0,98 (22)
DEC	2,73 $\pm$ 0,67 (8)	3,47 $\pm$ 2,01 (12)	3,06 $\pm$ 1,09 (11)	2,86 $\pm$ 1,51 (17)	2,30 $\pm$ 1,06 (12)	3,13 $\pm$ 1,35 (18)	2,55 $\pm$ 1,40 (16)	1,88 $\pm$ 1,14 (11)
JAN	1,74 $\pm$ 0,57 (8)	2,85 $\pm$ 1,64 (16)	3,78 $\pm$ 2,23 (10)	2,10 $\pm$ 1,09 (19)	1,71 $\pm$ 0,85 (16)	2,58 $\pm$ 1,46 (19)	3,66 $\pm$ 2,04 (14)	1,55 $\pm$ 0,67 (15)
FEB	1,75 $\pm$ 0,52 (10)	2,81 $\pm$ 1,62 (14)	3,08 $\pm$ 1,70 (10)	2,56 $\pm$ 1,14 (13)	2,35 $\pm$ 1,44 (11)	2,64 $\pm$ 1,30 (14)	3,98 $\pm$ 2,04 (11)	1,83 $\pm$ 0,63 (10)
MAR	1,82 $\pm$ 0,37 (9)	1,97 $\pm$ 0,87 (9)	2,59 $\pm$ 0,70 (10)	1,84 $\pm$ 0,39 (9)	1,69 $\pm$ 0,89 (8)	1,96 $\pm$ 0,65 (9)	3,25 $\pm$ 1,98 (9)	1,72 $\pm$ 0,64 (9)
APR	2,21 $\pm$ 0,65 (11)	2,25 $\pm$ 1,11 (15)	2,21 $\pm$ 1,62 (14)	1,67 $\pm$ 1,08 (15)	1,68 $\pm$ 0,66 (14)	1,91 $\pm$ 0,90 (15)	2,94 $\pm$ 1,56 (17)	1,68 $\pm$ 0,65 (12)
MAY	2,81 $\pm$ 0,85 (11)	3,49 $\pm$ 0,98 (22)	2,68 $\pm$ 0,74 (21)	2,80 $\pm$ 1,04 (23)	3,31 $\pm$ 1,37 (24)	3,76 $\pm$ 1,73 (23)	4,17 $\pm$ 1,92 (18)	2,47 $\pm$ 0,85 (14)
JUN	2,66 $\pm$ 0,63 (11)	2,73 $\pm$ 0,80 (19)	3,10 $\pm$ 0,89 (18)	3,04 $\pm$ 1,11 (17)	2,52 $\pm$ 0,73 (14)	2,66 $\pm$ 0,60 (16)	4,06 $\pm$ 1,86 (17)	2,19 $\pm$ 0,46 (13)
JUL	2,48 $\pm$ 0,77 (11)	2,91 $\pm$ 1,21 (11)	2,99 $\pm$ 0,81 (11)	2,68 $\pm$ 0,81 (10)	2,80 $\pm$ 0,94 (13)	2,46 $\pm$ 0,56 (12)	3,37 $\pm$ 0,89 (14)	2,23 $\pm$ 0,69 (14)

Repeated measures ANOVA reveals significant changes in mean salivary cortisol concentration between months ($F_{68,622} = 2.618$, $P < 0.001$), with September, October, November, December and May showing significantly higher concentrations than in the other months (Table 2).

Figure 2

Boxplot of mean monthly salivary cortisol concentration of eight Asian elephants during a year. Boxes indicate the 25th and 75th percentiles, and the median is indicated as a line within the boxes. Error bars of boxes represent the 10th and 90th percentiles. Units of cortisol concentrations are expressed in nanomol / litre (nmol/l).



Cortisol concentrations of six out of the eight elephants show a significant and positive correlation with mean monthly concentration of all individuals throughout the year (Baby $r = 0.728$, $P = 0.007$; Grande $r = 0.901$, $P < 0.001$; Kaisoso $r = 0.755$, $P = 0.005$; Momo $r = 0.953$, $P < 0.001$; Motki $r = 0.733$, $P =$

0.007; Tania $r = 0.895$, $P < 0.001$). One of the other two elephants show a significant correlation with other individuals (Jasmin with Kaisoso $r = 0.577$, $P = 0.049$). Finally, no significant correlation was found between mean monthly temperatures and mean monthly cortisol levels of all elephants ($r = 0.334$, $P = 0.289$)

Table 2. Games-Howell post-hoc multiple comparison test between months of mean salivary cortisol concentration of two Indian Rhinoceroses.

	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
January												
February	n.s											
March	n.s	n.s										
April	n.s	n.s	n.s									
May	*	n.s	n.s	n.s								
June	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s							
July	**	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s						
August	**	*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s					
September	**	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s				
October	**	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s			
November	***	**	*	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s		
December	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	

* Significance level: $P < 0.05$

** Significance level: $P < 0.01$

*** Significance level: $P < 0.001$

n.s. non significant

4. DISCUSSION

This research reveals significant differences in cortisol concentration among months, showing the highest cortisol levels in September, October, November and December, whereas the lowest cortisol concentration are found in

January, February, March and April. Elephants showed a seasonal pattern of salivary cortisol secretion, which was correlated in six out of the eight animals studied with mean monthly values of all individuals. Although two individuals did not show a significant correlation, one of them is correlated with other elephant which did show that correlation with mean monthly concentration of all individuals.

In May, an isolated peak of cortisol concentration was observed, which might be related to the introduction in the herd of a group of three female Asian elephants that arrived at the zoological park in mid-May. Comparing these values of salivary cortisol concentration in May 2006 with data obtained in May 2005, higher mean values for the former were observed (Menargues *et al*, in prep). Furthermore, cortisol levels suffered an increase in mid-May 2006, coinciding with the new elephants' arrival. Some studies have correlated stress events with increases in cortisol level (Powell *et al* 2006, Menargues *et al* 2008). The introduction a new group of individuals into an established herd could be a stress factor, and all elephants experienced that significant increase in salivary cortisol concentration accordingly.

There are studies that demonstrate a seasonal variation in cortisol secretion in some mammals (Ingram *et al* 1999, Suzuki *et al* 2003, Vera *et al* 2011). In African elephants, it has been found that there are no apparent relationship between serum cortisol concentrations and seasons (Bechert *et al* 1999). In Asian elephants in the northern hemisphere it has been shown that they exhibit slightly higher cortisol level in the coldest (January) and hottest (August) months (Brown *et al* 2010). The present study reveals that the annual pattern of cortisol secretion follows a decreasing tendency from October to April from which it begins to increase (including the peak in May) until October, showing two periods of six months each. Nevertheless, it has not been found any correlation between mean

monthly temperatures and annual cortisol secretion. Ingram (1999) founded that plasma cortisol concentrations in Red deer (*Cervus elaphus*) was correlated with the seasonal cycle in growth, with higher cortisol levels during periods of weight gain in November (southern hemisphere) and reduced concentrations during periods of weight loss during the rut (Ingram *et al* 1999). Some studies show that the annual cortisol pattern is subjected to different endogenous regulation of its seasonal secretion (Thaller *et al* 2004, Vera *et al* 2011). The study about how HPA axis function is regulated seasonally is just beginning to be understood. Plasma GC concentrations are often correlated with adrenal mass (Amirat *et al* 1980) so the ability of adrenal tissue to respond to the ACTH signal from the pituitary likely changes seasonally. Wild species studied under natural conditions vary GCs seasonally. Moreover, except in mammals, GCs increase during breeding season (Romero 2002).

Romero (2002) put forward three hypotheses to explain seasonal modulation in GC levels. The Energy Mobilization, Behavioral, and Preparative hypotheses are derived from different aspects of GC physiology. For the *Energy Mobilization Hypothesis* he posits that GC concentrations will be highest during energetically costly times of the year (i.e., breeding season, hibernation in some mammals or migration in birds). The *Behavior Hypothesis* suggests annual changes in GC levels result from animals having different requirements for expressing (or not expressing) these GC mediated behaviours at different times of the year, therefore the nature of stressor is immaterial. And finally, *The Preparative Hypothesis* proposes that neither the nature of stressors nor GC's acute effects are relevant, but rather annual GC rhythms are an evolutionary consequence of seasonal differences in the risks of being exposed to stressors. Asian elephant is a species that can be in heat at any time of year, so that it is not subject to a period of reproductive quiescence and breeding season like other species as the Red deer (*Cervus elaphus*) (Ingram *et al* 1999). It is neither a migratory or a hibernating species. Therefore,

the Energy Mobilization and Behavioral Hypothesis fails to explain the Asian elephants' seasonal pattern of cortisol secretion. Romero (2002) maintains that the Preparative Hypothesis combines with the Energy Mobilization Hypothesis since energetic risk may also be predictable and proposes that GC concentrations vary to mediate changes in preparedness associated with different life history stages. This hypothesis predicts that increases in the frequency of stressors would result in higher basal GC concentrations; nevertheless individuals that never have been subjected to a stressor during that season still will show higher GC concentrations.

The Preparative Hypothesis is the one more likely explaining the seasonal pattern of cortisol secretion in captive Asian elephants observed here. Several studies of captivity animals should be compared with studies in wild animals to explain this cortisol pattern under the Preparative Hypothesis. In addition different factors (e.g. intraspecific competition or risk of disease) during different seasonal periods should be assessed to understand how they could affect to basal GC concentrations and correlate them with baseline GC levels. Moreover, controlling different variables (e.g. environmental, social, or disease variables) in a group of individuals in captivity or wild (which is more difficult) is a utopian task. They should be compared with data of several years and groups of individuals of the same species to establish their seasonal pattern of GC secretion.

This research is a first approach to describe the seasonal pattern of cortisol secretion in Asian elephant. To understand the endogenous mechanism that regulates basal GCs secretion, several studies should be carried out. On the other hand, the knowledge of this seasonal pattern of cortisol secretion in the Asian elephant is necessary to establish assessment criteria in order to interpret data obtained from welfare assessment in captive individuals of this species through salivary cortisol.

5. CONCLUSIONS

The Asian elephants studied here revealed a seasonal pattern of salivary cortisol secretion, showing significant differences in cortisol levels among months. The highest cortisol concentration was recorded in October and the lowest hormone level was observed in April (northern hemisphere). Knowledge of this seasonal pattern of cortisol secretion in this species is necessary to evaluating the physiological significance of fluctuations in cortisol concentrations as a stress indicator in animals. It is necessary to determine factors that could affect the cortisol level punctually to interpret data correctly.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Terra Natura Foundation for financing this study, to the Hormone Laboratory of the General University Hospital of Alicante for allowing us to use its equipment and to Dr. Cadahía for language revision.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

REFERENCES

- Amirat Z, Khammar F, Brudieux R** 1980 Seasonal changes in plasma and adrenal concentrations of cortisol, corticosterone, aldosterone, and electrolytes in the adult male sand rat (*Psammomys obesus*). *General and Comparative Endocrinology* 40, 36-43.
- Bechert US, Swanson LI, Wasser S, Hess DL, Stormshak F** 1999 Serum prolactin concentrations in the captive female African elephant (*Loxodonta Africana*): potential effects of season and steroid hormone interactions, *General and Comparative Endocrinology* 114, 269-278.
- Beerda B, Schilder MBH, Janssen NSCRM, Mol JA** 1996 The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behaviour* 30, 272-279
- Broom DM, Johnson KG** 1993 *Stress and Animal Welfare*, first ed., Chapman & Hall, London.
- Brown JL, Kersey DC, Freeman EW, Wagener T** 2010 Assessment of diurnal urinary cortisol excretion in Asian and African elephants using different endocrine methods. *Zoo Biology* 29 274-283.
- Dathe HH, Kuckelkorn B, Minnemann D** 1992 Salivary cortisol assessment for stress detection in the Asian Elephant (*Elephas maximus*): a pilot study. *Zoo Biology* 11, 285-289.
- de Jong IC, Prelle IT, van de Burgwal JA, Lambooi E, Korte SM, Blokhuis HJ, Koolhaas JM** 2000 Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior* 68 571-578.
- Dantzer R, Mormede P** Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal of Animal Science* 57, 6-17.
- Dobson H, Smith RF** 1995 Stress and reproduction in farm animals. *Journal of Reproduction and Fertility* 49, 451-461
- Ekkel ED, Dieleman SJ, Shouten WGP, Portela A, Cornelissen G, Tielen MJM, Halberg F** 1996 The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiology & Behavior* 60 985-989.
- Fuchs E, Kirschbaum C, Benisch D, Bieser A** 1997 Salivary cortisol: a non-invasive measure of hipotalamo-pituitary-adrenocortical activity in the squirrel monkey. *Saimiri sciureus. Laboratory Animals* 31, 306-311.
- Fulkerson WJ, Sawyer GJ, Gow CB** 1980 Investigations of ultradian and circadian rhythms in the concentration of cortisol and

- prolactin in the plasma of dairy cattle. *Australian Journal of Biology Science* 33, 557-561.
- Gröschl M** 2007 Current status of salivary hormone analysis. *Clinical Chemistry* 54 1759-1769.
- Huber S, Palme R, Arnold W** 2003 Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *General and Comparative Endocrinology* 130, 48-54.
- Ingram JR, Crockford JN, Matthews LR** 1999 Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *Journal of Endocrinology* 163 289-300.
- Kirchbaum C, Hellhammer DH** 1994 Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 19 313-333.
- Kleerekoper M, Schiebinger R, Gutai JP** 1997 Editorial: steroid therapy for adrenal disorders-getting the dose right. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 32, 266-284.
- Liptrap RM** 1993 Stress and reproduction in domestic animals. *Annals of New York Academy of Science* 697, 275-284.
- López-Mondejar P, Fuentes MA, Mauri M, Mora A, Pérez-Soto M, Vargas F, Martín Hidalgo A** 2006 Determinación de cortisol salivar en el diagnóstico de la enfermedad de Cushing pediátrico. *Anales de Pediatría* 64 270-272.
- Menargues A, Urios V, Mauri M** 2008 Welfare assessment of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. *Animal Welfare* 17 305-312.
- Monfort SL, Brown JL, Wildt DE** 1993 Episodic and seasonal rhythms of cortisol secretion in male Eld's deer (*Cervus eldi thamin*). *Journal of Endocrinology* 138 41-49.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ** 1984 Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological effects. *Endocrine Reviews* 5, 25-44.
- Oki C, Atkinson S** 2004 Diurnal patterns of cortisol and thyroid hormones in the Harbor seal (*Phoca vitulina*) during summer and winter seasons. *General and Comparative Endocrinology* 136, 289-297.
- Ohl F, Kirschbaum C, Fuchs E** 1999 Evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) via salivary cortisol measurement. *Laboratory Animals* 33, 269-274.
- Pedernera-Romano C, Valdez RA, Singh S, Chiappa X, Romano MC, Galindo F** 2006 Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): a non-invasive technique. *Animal Welfare* 15, 359-362.

- Powell DM, Carlstead K, Tarou LR, Brown JL, Monfort SL** 2006 Effects of construction noise on behaviour and cortisol levels in a pair of captive Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Zoo Biology* 25, 391-408.
- Romero LM** 2002 Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 128 1-24.
- Ruis MA, Te Brake JH, Engel B, Ekkel ED, Buist WG, Blokhuis HJ, Koolhaas JM** 1997 The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender and stress. *Physiology & Behavior* 62, 623-630.
- Saltz D, White GC** 1991 Urinary cortisol and urea nitrogen responses to winter stress in mule deer. *Journal of Wildlife Management* 55, 1-16.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehantym B, Palme R, Boonstra R** 2011 Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166, 869-887.
- Suzuki M, Uchida S, Ueda K, Tobayama T, Katsumata E, Yoshioka M, Aida K** 2003 Diurnal and annual changes in serum cortisol concentrations in Indo-Pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* and killer whales *Orcinus orca*. *General and Comparative Endocrinology* 132 427-433.
- Thaller D, Schwarzenberger F, Bögel R, Slotta-Bachmayr L, Walzer C, Arnold W** 2004 Seasonal variation in cortisol secretion in chamois (*Rupicapra rupicapra*), European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, 5th scientific meeting. Ebeltoft. Denmark (2004).
- Vera F, Antenucci CD, Zenuto RR** 2011 Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *General and Comparative Endocrinology* 170, 550-557.
- Wood P** 2009 Salivary steroid assays-research or routine? *Annals Of Clinical Biochemistry* 46 183-196.
- Yousef MK, Cameron RD, Luick JR** 1971. Seasonal changes in hydrocortisone secretion rate in reindeer, Rangifer tarandus. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 40, 495-501.



Discusión general

Mejorar la salud y el bienestar de los animales en cautividad requiere la identificación de las condiciones ambientales o las prácticas de manejo que les pueden resultar estresantes. En este contexto, evaluar el nivel de estrés psicológico de los animales es un componente importante desde que se conoce que los niveles elevados de glucocorticoides pueden afectar negativamente tanto al comportamiento como a la función reproductiva..

El mantenimiento de la homeostasis es necesario para la supervivencia de los organismos. Los seres vivos han desarrollado un sistema fisiológico para poder amortiguar las condiciones ambientales adversas y restablecer la balanza. Si los estímulos externos o internos son demasiado intensos, o persisten durante un largo periodo de tiempo, pueden considerarse agentes estresantes que provocan una respuesta del organismo ante el estrés (Dehnhard 2007).

Los glucocorticoides son el producto final de eje hipotálamo-pituitario-adrenal y participan en el control de la totalidad de la homeostasis del cuerpo y en la repuesta del organismo al estrés. Durante los últimos años, se han realizado estudios para medir el estrés de animales tanto en libertad como en cautividad centrados en la respuesta del eje hipotálamo-pituitario-adrenal mediante análisis no invasivos de corticosteroides y cortisol en saliva (Pedernera-Romano *et al* 2006, Menargues *et al* 2008), heces (Touma y Palme 2005, Millspaugh *et al* 2001), orina (Stephen y Ledger 2006, Brown *et al* 2010), leche (Shutt y Fell 1985, Verkerk *et al* 1998), pelo (Accorsi *et al* 2008, Bennett y Hayssen 2010), plumas (Bortolotti *et al* 2008, 2009) agua (Scott *et al* 2008) y en la yema de huevos (Love *et al* 2008, Hackl *et al* 2003).

La elección del material biológico para evaluar el bienestar de una especie es importante, ya que no todas las técnicas sirven para valorar los niveles de

cortisol en periodos de tiempo determinados. Para medir niveles de estrés puntuales, es muy útil la medición de cortisol en saliva, orina, leche y agua (en peces), mientras que para realizar un seguimiento del bienestar de un animal durante periodos más largos de tiempo se puede emplear el análisis de glucocorticoides en heces, pelo, plumas o en la yema de huevos (Sheriff *et al* 2011). Hay que considerar también si es o no viable la recogida de muestras dependiendo de la especie con la que se va a trabajar. Por ejemplo, en felinos no sería viable tomar muestras de saliva debido a que se pondría en riesgo la integridad física de la persona que va a tomar la muestra. En esas especies, la evaluación del nivel de estrés mediante cortisol urinario tampoco sería factible, puesto que los felinos evacuan la orina rociándola, por lo que se hace casi imposible poder tomar una muestra de este fluido biológico. Otro factor a tener en cuenta en la elección del método no invasivo es si se trata de especies domésticas, de granja o animales salvajes en libertad o en cautividad y, en este último caso, si están o no habituados al manejo por parte de los cuidadores de zoológicos, laboratorios, etc.

En elefantes asiáticos y rinocerontes indios, el cortisol es el glucocorticoide principal producido por las glándulas suprarrenales (Brown *et al* 2008). Los niveles basales de cortisol sufren elevaciones rápidas y breves que pueden ser detectadas en la saliva de ambas especies (Dathe *et al* 1992, Exner y Zanella 1999, Menargues *et al* 2008). En esta tesis se ha medido el bienestar del elefante asiático y del rinoceronte indio a través de la concentración de cortisol salivar, ya que nos permite analizar niveles puntuales de estrés ante distintos factores. Además, este método permite tomar muestras con la frecuencia que deseemos de forma no invasiva, puesto que el muestreo no influye en el nivel de estrés del animal, ya que los individuos con los que se ha trabajado están habituados al contacto directo con sus cuidadores.

1. Sección I.

1.1 Validación del ensayo y efecto de la apertura del parque Terra Natura.

La validación del análisis es necesaria para cada especie para garantizar la cuantificación correcta de los glucocorticoides (Sheriff *et al* 2011), por ello la medida de la concentración de cortisol salivar mediante radioinmunoanálisis tuvo que ser validada para ambas especies, puesto que aunque esta técnica ya había sido empleada en rinocerontes indios (Kuckelkorn y Dathe 1990) y elefantes asiáticos (Dathe *et al* 1992) con anterioridad, nunca había sido validada, por lo que no se había probado la fiabilidad de este tipo de análisis con estas especies.

La correlación positiva que se obtuvo entre las curvas de dilución del pool de saliva de elefantes, rinocerontes y la dilución de la curva estándar, reveló un elevado grado de precisión y detectabilidad en los cambios de los niveles de cortisol en estas especies mediante este análisis. El nivel mínimo de cortisol detectado por este método viene dado por la sensibilidad del análisis (0.83 nmol/L), lo que indica que niveles por debajo de este valor no son fiables. Hay que señalar que tan sólo 34 muestras, de las 2628 analizadas, es decir, el 1.3%, estuvieron por debajo de este valor, por lo que el porcentaje de detectabilidad del cortisol salivar de las muestras de los elefantes asiáticos y los rinocerontes indios de este estudio fue muy elevado. La precisión de esta técnica analítica resultó ser alta, ya que los coeficientes de variación intra- e inter-analíticos de los controles de cortisol del kit de análisis fueron inferiores al 10% para las dos especies. La reactividad cruzada del anticuerpo del cortisol fue total para la molécula del cortisol (100%), y para un metabolito del cortisol, el 11-deoxicortisol, se obtuvo una reactividad superior al 5%, pero hay que señalar que el cortisol en la saliva se encuentra en forma libre y que no forma metabolitos. La reacción con otros

glucocorticoides fue igual o inferior al 1%, excepto con la prednisona, que fue del 2.3%, pero en todos los casos se trata de un porcentaje muy bajo, por lo que la fiabilidad del kit analítico resultó ser muy alta. Por tanto, la validación del análisis del nivel de cortisol salivar mediante radioinmunoanálisis con I125 hizo que este método pudiera aplicarse en estas especies como medida de la variación de los niveles de estrés.

En la especie humana, existen numerosas tablas en las que se establecen rangos dentro de los cuales puede saberse si una persona presenta elevados niveles de cortisol, si padece diabetes o tiene una presión arterial alta. Sin embargo, en animales, las bases de datos de valores de cortisol salivar para distintas especies de animales son escasas o no existen, por lo que se tuvo que establecer a priori el rango de cortisol salivar “normal” para ambas especies y para cada uno de los individuos con los que se trabajó en esta tesis, ya que existían variaciones en los rangos intraespecíficos e interespecíficos (Dathe *et al* 1992), y lo que para un individuo podía ser un valor normal de cortisol, para otro individuo esta concentración podía resultar elevada, desviando su homeostasis e influyendo negativamente en su bienestar.

Una vez establecido el rango de cortisol para cada especie y para cada individuo, pudimos testar la validez de este método mediante el estudio del efecto que producía en estos animales la apertura al público del parque zoológico Terra Natura, considerando tres periodos: el de pre-apertura (los 30 días anteriores a la apertura del parque); el de apertura (que comenzó el día que el parque abrió sus puertas a los visitantes, y al que se le asignó una duración de 1 mes a partir dicho día); y el de post-apertura (el mes posterior al periodo de apertura). El estudio reveló que, durante el periodo de apertura, la concentración de cortisol salivar aumentó significativamente, en comparación con los otros dos periodos, en todos los individuos de ambas especies. Este incremento de cortisol salivar durante el

periodo de apertura pudo ser debido a que los animales seguían expuestos a los ruidos de las máquinas y de los operarios, ya que las obras del parque todavía no habían finalizado. Powell *et al* (2006) observó que el nivel de cortisol del panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) aumentaba cuando estos animales eran expuestos ante ruidos de construcción de intensidad moderada. Además, durante este periodo los animales salieron a las praderas por vez primera, ya que en el periodo anterior se encontraban confinados en patios internos adosados a las cuadras. Asimismo durante este periodo comenzaron a recibir las visitas del público, lo que también pudo ser una fuente de estrés para los animales estudiados. Existen estudios que correlacionan incrementos de la concentración de cortisol con la afluencia de visitantes al zoológico (Anderson *et al* 2002, Mallpur y Chellam 2002, Carlstead y Brown 2005), así como con cambios de recinto en animales (Ohl *et al* 1999, Cross *et al* 2004). La concentración de cortisol salivar disminuyó durante el periodo de post-apertura en ambas especies, posiblemente debido a que los animales se habituaron a sus nuevas praderas y a la presencia de los visitantes del parque. Además, es posible que el enriquecimiento ambiental aplicado en estos animales, contribuyera al descenso del nivel de estrés en ellos.

1.2 Evaluación del efecto de estresores externos e internos en el bienestar de elefantes asiáticos cautivos.

En este capítulo de la presente tesis doctoral se analiza cómo afectan al bienestar de un grupo de elefantes dos agentes estresantes externos (el entrenamiento de una pareja de elefantes para un espectáculo y la llegada de un nuevo grupo de elefantes a una manada ya establecida) y un estresor interno (una parálisis irreversible en la trompa de un elefante).

1.2.1 Efectos del entrenamiento para un espectáculo.

El entrenamiento destinado a facilitar los cuidados veterinarios y de aseo diario de los elefantes es una práctica rutinaria en los parques zoológicos que albergan a estas especies. Sin embargo, en algunos parques zoológicos el entrenamiento también está enfocado a la realización de espectáculos llamados “demostraciones biológicas”, en los que se enseñan otros comportamientos a los elefantes para entretener a los visitantes. Estas demostraciones biológicas incluyen levantamiento de patas, de cabeza, sentar y tumbar a los animales, y cargar un tronco desplazándolo de un lugar a otro. Los comportamientos que se les enseña a estos elefantes se denominan “comportamientos forzados”, debido al gran esfuerzo que requieren para ser realizados por parte de los individuos.

Este estudio reveló que las sesiones de entrenamiento efectuadas con los elefantes para poder llevar a cabo las “demostraciones biológicas” a los visitantes afectaron al nivel de cortisol salivar de los elefantes, obteniéndose concentraciones significativamente más elevadas después de la sesión de entrenamiento que antes de ella. Este aumento en el nivel de cortisol podría revelar que efectuar este tipo de entrenamiento puede romper la rutina diaria de los individuos, elevando su nivel de estrés. Sin embargo, el estrés no es siempre dañino. Durante la caza de presas, el cortejo o la copulación, la corteza adrenal libera glucocorticoides (Broom *et al* 1993). El aumento de la concentración de cortisol en estos elefantes podría deberse a un incremento de la actividad física, y no reflejar necesariamente una situación de estrés. Sin embargo, los elefantes estudiados fueron reticentes a cooperar en las actividades a realizar en los entrenamientos durante los 11 meses que duró el programa de entrenamiento de este parque zoológico. Este hecho, junto con los resultados de cortisol obtenidos en este estudio, fueron determinantes para decidir que el espectáculo no se llevase

a cabo en Terra Natura. Hechos como estos deberían llevarnos a considerar que este tipo de espectáculos pueden afectar al bienestar de animales en cautividad.

1.2.2 Efecto de la llegada de un nuevo grupo de elefantes a una manada establecida.

En este estudio se analizó el efecto de la llegada de un nuevo grupo de elefantes a una manada ya establecida. Para ello fueron considerados tres periodos de un mes cada uno. El periodo anterior a la llegada del nuevo grupo (mes de abril de 2006), el periodo correspondiente a la llegada del nuevo grupo (mes de mayo de 2006) y el periodo siguiente a la llegada de los nuevos elefantes (mes de junio de 2006). El estudio reveló que la concentración de cortisol salivar de los ocho elefantes analizados aumentó significativamente en el mes de mayo con respecto al mes de abril. Además se compararon los valores de cortisol del mes de mayo de 2006 con los valores del mismo mes del año anterior y se observó también una concentración hormonal significativamente más elevada en mayo de 2006 que en mayo de 2005. Hay estudios que muestran que la llegada de un nuevo grupo de individuos a una manada establecida lleva a formar una nueva jerarquía que puede ir en detrimento del bienestar animal (Ewbank y Meese 1971, Puppe 1998). Este aumento de cortisol probablemente pudo deberse a la introducción de un nuevo grupo de individuos en la manada de elefantes que ya estaba establecida.

La concentración de cortisol de los animales estudiados descendió levemente en el mes de junio de 2006 respecto al mes de la llegada de los nuevos elefantes, probablemente porque podrían haberse habituado a los nuevos individuos semanas después de su llegada. Por otro lado, el nivel hormonal de los elefantes en junio fue significativamente más elevado que en el de abril del mismo

año, lo que puede sugerir que los individuos no se habían habituado totalmente a los nuevos elefantes en el plazo de un mes. Sin embargo, analizando los valores de cortisol mensuales en el estudio de los ritmos estacionales de secreción de cortisol, observamos que, justo en este periodo del año, la secreción de cortisol sigue una tendencia ascendente hasta el mes de octubre, donde alcanza la concentración máxima anual.

1.2.3 Estudio del efecto de un estresor interno: parálisis irreversible en la trompa de un elefante.

En este estudio se quiso comprobar cómo afecta una discapacidad tan importante para un elefante como es una parálisis irreversible en su trompa, a su nivel de cortisol, respecto a otros individuos sanos. Para ello, se comparó el nivel medio mensual de cortisol salivar de Petita (la elefanta discapacitada) con el de las otras siete hembras sanas de la manada entre enero y julio de 2006. Los resultados del estudio mostraron que el elefante que presentaba la discapacidad sufría un estrés crónico de origen interno, mostrando un nivel de cortisol significativamente más alto que el resto de la manada durante todo el periodo analizado. En humanos hay estudios que revelan que, enfermedades crónicas como artritis reumatoide o soriasis, elevan significativamente los niveles de cortisol (Evers *et al* 2010, Zautra *et al* 1997). Para nuestro conocimiento, esta investigación es la primera que analiza el nivel de estrés de un animal discapacitado.

La trompa del elefante es un apéndice imprescindible para su supervivencia, ya que con ella pueden arrancar la hierba del suelo o las hojas de los árboles, o aspirar agua para luego llevársela a la boca. Además es un elemento fundamental para los cuidados de su salud e higiene, porque con ella pueden

“ ducharse ” lanzando agua sobre su cuerpo y pueden arrojar tierra y barro sobre su piel, lo cual les ayuda a protegerse de las picaduras de los insectos y de los rayos del sol. La trompa además es una herramienta de defensa y ataque frente a otros individuos. También es un apéndice esencial de interacción en las relaciones sociales entre los individuos, ya que con ella se intercambian caricias y abrazos.

La trompa de los elefantes asiáticos se diferencia de la de los africanos porque tiene un dedo en su extremo en lugar de dos (como la de su homónimo africano). Esto afecta en la forma de manejo de la trompa, ya que, por ejemplo, para arrancar hierba del suelo, el elefante africano solo tiene que “pellizcarla” con los dedos de su trompa, mientras que el elefante asiático ha de rodearla con su trompa y tirar de ella para poder conseguirla. Este hecho hace que los elefantes asiáticos tengan una trompa más musculada que la de los africanos.

Tener una parálisis en la trompa implica que el individuo que la padece tenga que adaptar sus movimientos para poder beber, comer o asearse, ya que para realizar todas estas tareas de primera necesidad, el animal tiene que balancear su cabeza de un lado hasta que su trompa alcance el alimento y a continuación debe volver a hacer una serie de complejos movimientos con la cabeza para depositar la comida o el agua en su boca. Además, esta parálisis hizo que esta elefanta fuera rechazada por la manada, a excepción de una compañera que sí la aceptó.

Los resultados de este estudio indican que es necesario conocer cómo afectan estresores externos e internos como el entrenamiento de los elefantes para un espectáculo, el estrés social o una discapacidad. La evaluación de la concentración de cortisol salivar es una herramienta útil en el manejo de los animales de un parque zoológico a la hora de crear manadas con individuos compatibles, de considerar las actuaciones con animales como un elemento de

entretenimiento para los visitantes, o para asegurar el bienestar de sus componentes proporcionándoles un entorno que mejore su bienestar.

2. Sección II

1.3 Variaciones circadianas y estacionales en la secreción de cortisol.

Del mismo modo que existen variaciones individuales dentro de una misma especie y entre especies diferentes, la secreción de cortisol no es continua a lo largo del día y del año. Se han realizado estudios que muestran variaciones en el nivel de cortisol, que fluctúa en periodos de 24 horas (ritmos circadianos) (Ekkel *et al* 1996, Ruis *et al* 1997, de Jong *et al* 2000, Brown *et al* 2010). El cortisol en mamíferos diurnos aumenta a primera hora de la mañana y disminuye al anochecer, presentando en mamíferos nocturnos el patrón opuesto (Suzuki *et al* 2003). Los cambios anuales en la secreción de cortisol también han sido estudiados en diversas especies como en ciervos (Monfort *et al* 1993, Ingram *et al* 1999) delfines y orcas (Suzuki *et al* 2003) y tucos-tucos (Vera *et al* 2011).

Es necesario tener conocimiento de la secreción diaria y anual de cortisol cuando queremos evaluar el significado fisiológico de las fluctuaciones de esta hormona a lo largo del día y del año. Por ello, parte de esta tesis se dedicó al estudio del patrón de secreción estacional de cortisol salivar en el elefante asiático y en el rinoceronte indio, ya que hasta la fecha no habían sido descritos. El estudio de los ritmos circadianos tan sólo lo pudimos determinar en el elefante asiático, debido a que no tuvimos la misma disponibilidad de toma de muestras con los rinocerontes.

En el estudio del patrón circadiano del elefante asiático, los resultados mostraron que la concentración de cortisol salivar a primera hora de la mañana era más elevada que al anochecer, lo que sugirió que esta especie seguía un patrón diurno de secreción de cortisol. Brown *et al* (2010) describió del mismo modo en su estudio, a través de cortisol urinario, que los elefantes africanos y asiáticos seguían el mismo patrón que el descrito en nuestro estudio.

Es importante conocer el patrón de secreción circadiano de cortisol en las especies que se estudian, ya que existen fluctuaciones diarias en los niveles basales de cortisol que hay que tener en cuenta a la hora de tomar las muestras, para evitar posibles variaciones circadianas en los resultados obtenidos (Ekkel *et al* 1996). En estudios posteriores, debería considerarse el efecto de la edad y del sexo en los patrones de secreción circadiana de cortisol, ya que se ha visto en cerdos y en la especie humana que el nivel basal de concentración de cortisol varía en función de estos dos parámetros, siendo más elevado el cortisol durante la infancia y disminuyendo paulatinamente hasta la edad adulta, en la que se mantiene constante (de Jong *et al* 2000, Onishi *et al* 1983, Haen 1994, Ruis *et al* 1997). En el presente estudio no se han tenido en cuenta los parámetros de la edad y del sexo, puesto que todos los individuos eran adultos y hembras.

Durante el estudio del patrón estacional de secreción de cortisol salivar en el rinoceronte indio se tomaron muestras de dos hembras, a la misma hora de la mañana, desde agosto de 2005 hasta julio de 2006. Los resultados del estudio revelaron un ritmo anual de secreción de esta hormona en estos individuos mostrando una tendencia creciente desde febrero hasta agosto, y a partir de ahí comenzó a disminuir la secreción de cortisol. La concentración más alta se dio en el mes de agosto, y la más baja en el mes de enero, coincidiendo con los valores medios más altos y más bajos de las temperaturas anuales, estando los dos rinocerontes correlacionados positivamente entre ellos y con el patrón anual de

temperaturas medias mensuales. Llegados a este punto, habría que preguntarse si las estaciones cálidas o frías suponen un factor que pudiera afectar al bienestar de estos animales. Cabe destacar que en los meses de verano es cuando el parque zoológico recibe un mayor número de visitantes, y este factor podría ser una causa del aumento del nivel de cortisol en estos individuos. Existen diversos estudios que sugieren que los visitantes de los parques zoológicos producen estrés en los animales (Anderson *et al* 2002, Mallpur *et al* 2005). Carlstead y Brown (2005) encontraron que la concentración de corticoides en el rinoceronte negro (*Diceros bicornis*) estaba positivamente correlacionada con la exposición de estos animales a los visitantes.

En el estudio de los ritmos anuales de secreción del cortisol salivar en los elefantes se tomaron muestras diarias de saliva de ocho hembras, a la misma hora de la mañana, y durante el mismo periodo de tiempo que los rinocerontes (desde agosto de 2005 hasta julio de 2006). Los resultados obtenidos revelaron un patrón estacional de secreción de cortisol salivar, y se encontraron diferencias significativas entre los meses en la concentración de esta hormona. El nivel de cortisol más elevado se detectó en octubre, mes desde el cual comenzó a disminuir hasta alcanzar su nivel más bajo en abril, desde donde comenzó a aumentar de nuevo. Los valores medios mensuales de concentración de cortisol resultaron estar correlacionados positivamente con el valor medio mensual de seis de las ocho elefantes estudiadas. Sin embargo, se observó que el patrón estacional de secreción de esta hormona no estaba correlacionado con las variaciones anuales de temperatura. En el estudio en elefantes africanos realizado por Bechert *et al* (1999) no se encontraron relaciones aparentes entre el cortisol plasmático y las variaciones estacionales. Cabe destacar que se encontró un máximo aislado de concentración de cortisol en el mes de mayo, que coincidía con la introducción de un nuevo grupo de elefantes en la manada ya establecida, lo cual se detalla en

el estudio del efecto de estresores externos e internos en el bienestar del elefante asiático (capítulo II).

Estudios realizados en ciervos, correlacionan los periodos de ganancia de peso con niveles elevados de cortisol en noviembre (hemisferio sur) así como una disminución de la concentración hormonal durante el celo (Ingram *et al* 1999). Hay estudios que muestran que el patrón anual de cortisol está sujeto a una regulación interna (Vera *et al* 2011), sin embargo, el estudio de la regulación estacional de la función del eje hipotálamo-pituitario-adrenal está comenzando a desvelarse.

Estos estudios son una primera aproximación para describir el patrón estacional de secreción de cortisol en el rinoceronte indio y en el elefante asiático. Sin embargo, deberían llevarse a cabo diversos estudios que permitiesen comparar los ritmos estacionales de secreción de esta hormona, en animales cautivos, con el patrón de secreción de estos animales en libertad, y ver si existen variaciones entre ellos para poder comprender el mecanismo endógeno que los regula y, de este modo, poder explicar a qué pudieran ser debidas las fluctuaciones anuales de la concentración hormonal. Además, deberían ser considerados diversos factores potencialmente estresantes, como, por ejemplo, el efecto de los visitantes en los animales o la introducción de nuevos individuos dentro de una manada de animales ya establecida, ya que estos agentes pueden afectar puntualmente a la secreción anual de cortisol en estas especies. Los resultados de estos estudios indican que las variaciones circadianas y anuales en la secreción de cortisol han de ser tenidas en cuenta a la hora de emplear la concentración de esta hormona como herramienta en la evaluación del bienestar de estas especies en los parques zoológicos.

3. Aplicaciones y futuro de la técnica de análisis de la concentración de cortisol salivar.

La evaluación del bienestar animal a través del cortisol salivar ya ha sido empleada con otras especies, como en perros (Beerda *et al* 1996), delfines mulares (Pedernera-Romano *et al* 2006), caballos (Peeters *et al* 2010), cerdos (Ruis *et al* 1996), monos rhesus (Boyce *et al* 1995), titís (Cross *et al* 2004), monos ardilla (Fuchs *et al* 1997) o en la tupaya de Belanger (Ohl *et al* 1999). Por extensión, este método podría emplearse en otras especies, validando primeramente análisis para cada una de ellas. Las posibles aplicaciones que tiene este método son, entre otras:

- a) Seguimiento del bienestar de la especie que se quiera estudiar
- b) Conocimiento del patrón de secreción de cortisol circadiano y estacional.
- c) Evaluación de cómo agentes estresantes internos y externos afectan al bienestar de la especie o de los individuos estudiados.
- d) Evaluación del éxito del enriquecimiento ambiental empleado en un grupo de individuos de una especie determinada.
- e) Efecto del estrés en la salud y el éxito reproductivo en animales cautivos.
- f) Efecto del estrés en el crecimiento y desarrollo de crías de animales en cautividad.
- g) Selección de individuos aptos para un trabajo determinado, en función de su nivel de estrés, como, por ejemplo, perros guía, perros policía, animales de competición, animales de terapia, etc.
- h) Efecto del entrenamiento y del trabajo en animales de trabajo, como perros policía o perros guía.

- i) Efecto del nivel de estrés en la producción y la calidad del producto en animales de granja.
- j) Efecto del nivel de estrés en el rendimiento de animales de competición (como caballos o perros).
- k) Evaluación del bienestar en animales empleados en exhibiciones. Cómo afecta el entrenamiento y la exhibición (por ejemplo en leones marinos, delfines, primates, o elefantes).
- l) Evaluación del nivel de estrés en animales empleados como terapia en personas discapacitadas, tanto física como psíquicamente. Efecto del entrenamiento y la sesión de terapia en los animales empleados, así como efectos obtenidos en el bienestar de los pacientes.

El método de análisis de concentración de cortisol salivar desarrollado en esta tesis doctoral es un método no invasivo, objetivo y fiable en la evaluación del bienestar de los elefantes asiáticos y de los rinocerontes indios que permite conocer el nivel de estrés de estos animales y constituye una herramienta necesaria para la toma de decisiones en el manejo de estas especies en un parque zoológico. Este método de detección del bienestar a través del cortisol salivar es una técnica desconocida para la mayoría de los gerentes de parques zoológicos, y sería interesante difundirlo para que pudiera ser empleado en la evaluación del nivel de estrés de los animales de estos centros, para que, mediante su conocimiento y su puesta en práctica, se pudiera asegurar el bienestar de sus animales.



Conclusiones

1. El nivel de estrés en el elefante asiático y el rinoceronte indio se puede cuantificar a través de la medición de concentración de cortisol en saliva mediante radioinmunoanálisis.
2. Para emplear esta técnica, es necesario establecer *a priori* el rango de cortisol salivar en que se mueve cada especie y cada individuo, puesto que existen variaciones intra- e inter-específicas.
3. Es necesario conocer el patrón circadiano y circanual de secreción de cortisol para interpretar correctamente el nivel de estrés del animal en función de las fluctuaciones de esta hormona a lo largo del día y del año.
4. La evaluación del bienestar de estas especies a través de la medición de la concentración de cortisol salivar puede ser una herramienta muy útil en la gestión y manejo de las especies de un parque zoológico.
5. Por extensión, este método de evaluación del nivel de estrés podría emplearse en otras especies, teniendo, además, aplicaciones muy útiles como por ejemplo: en programas de cría en cautividad; rendimiento y bienestar en animales de trabajo como perros guía o perros policía; bienestar y producción en animales de granja (entre otras).



Referencias

- Accorsi PA, Carloni E, Valsecchi P, Viaggiani R, Gamberoni M, Tamanini C, Seren E** 2008 Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General and Comparative Endocrinology* 155, 398-402.
- Anderson US, Benne M, Bloomsmith MA, Maple TL** 2002 Retreta space and human visitor density moderate undesirable behavior in petting zoo animals. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 5, 125–137.
- Ausperin B, Geslin M** 2008 Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. *General and Comparative Endocrinology* 94, 33-43.
- Bahr NI, Palme R, Möhle U, Hodges JK, Heistermann M** 2000 Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. *General and Comparative Endocrinology* 117, 427–438.
- Bamberg E, Palme R, Meingassner JG** 2001 Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. *Laboratory Animals* 35, 307-14.
- Beerda, B, Schilder MBH, Janssen NSCRM, Mol JA** 1996 The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and Behavior* 30, 272-279.
- Beisel WR, Cos JJ, Horton R, Chao PY, Forsham PH** 1964 Physiology of urinary cortisol excretion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 24, 887-893.
- Benett A, Haysen V** 2010 Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology* 39, 171-180.
- Bentson KL, Capitanio JP, Mendoza SP** 2000 Effects of blood sampling, telazon and ketamine on cortisol in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology* 51, 43.
- Bentley PJ** 1998 *Comparative vertebrate endocrinology*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Bertin A, Richard-Yris MA, Houdelier C, Lumineau S, Möstl E, Kuchar A, Hirschenhauser K, Kotschal K** 2008 Habituation to humans affects yola steroid levels and offspring phenotype in quail. *Hormones and Behaviour* 54, 396–402.
- Blake S y Hedges S** 2004 Sinking the flagship: the case of forest elephants in Asia and Africa. *Conservation Biology* 18, 1191-1202.

- Boonstra R, Hik D, Singleton GR, Tinnikov A** 1998 The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecological Monographs* 79, 317–394.
- Bortolotti GR, Marchant T, Blas J, Cabezas S** 2009 **Tracking stress: localisation**, deposition and stability of corticosterone in feathers. *Journal of Experimental Biology* 212, 1477–1482.
- Bortolotti GR, Marchant TA, Blas J, German T** 2008 Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology* 22, 494–500.
- Boyce WT, Champoux M, Suomi SJ, Gunnar MR** 1995 Salivary cortisol in nursery-reared rhesus monkeys: reactivity to peer interactions and altered circadian activity. *Developmental Psychobiology* 28, 257–267.
- Bradley AJ, Stoddart DM** 1993 The dorsal paracloacal gland and its relationship with seasonal changes in cutaneous scent gland morphology and plasma androgen in the marsupial sugar glider (*Petaurus breviceps*; Marsupialia: Petauridae). *Journal of Zoology* 229, 331–346.
- Bradshaw D** 2003 *Vertebrate ecophysiology: an introduction to its principles and applications*. Cambridge University Press, Cambridge
- Brandenberger G, Follenius M** 1973 Diurnal variations of blood cortisol, blood glucosa and free urinary cortisol in resting man. *Journal of Physiology* 66, 271–282.
- Bremen RD, Gangwer MI** 1978 Effect of adrenocorticotropin injection and stress on milk cortisol content. *Journal of Dairy Science* 61, 1103–1108.
- Broom DM, Johnson KG** 1993 *Stress and animal welfare*. 1ª ed Chapman and Hall, London.
- Brown JL, Kersey DC, Freeman EW, Wagener T** 2010 Assessment of diurnal urinary cortisol excretion in Asian and African elephants using different endocrine methods. *Zoo Biology* 29, 274–283.
- Busch DS, Hayward LS** 2009 Stress in a conservation context: a discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biological Conservation* 142, 2844–2853.
- Cannon, WB** 1914 The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *American Journal of Physiology* 33, 356–372.
- Cannon WB** 1929 *Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage*. New York: Appleton-Century-Crofts.
- Carcagno A** 1995 Corteza adrenal. En *Fisiología Veterinaria*. A García, F

- Castejón, LF de la Cruz, J González, MD Murillo, G Salido (eds). Interamericana – Mc Graw-Hill, Madrid, pp 767-780
- Carlstead K, Brown JL, Seidensticker J** 1993 Behavioural and adrenocortical response to environmental changes in leopard cats (*Felis bengalensis*). *Zoo Biology* 12, 321-331.
- Carlstead K, Brown JL** 2005 Relationships between patterns of fecal corticoid excretion and behavior, reproduction, and environmental factors in captive black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceros. *Zoo Biology* 24, 215-232.
- Chacon, G 2004 Estandarización de técnicas de enzimoimmunoensayo para la valoración del eje corticotropo en las especies bovina y canina. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Zaragoza.
- Chin EH, Love OP, Verspoor JJ, Williams TD, Rowley K, Burness G** 2009 Juveniles exposed to embryonic corticosterone have enhanced flight performance. *Proceedings of the Royal Society of London B* 276, 499-505.
- Choudhury A, Lahiri Choudhury DK, Desai A, Duckworth JW, Easa PS, Johnsingh AJT, Fernando P, Hedges S, Gunawardena M, Kurt F, Karanth U, Lister A, Menon V, Riddle H, Rübel A, Wikramanayake E** 2008 *Elephas maximus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 17 August 2011.
- Chrousos GP** 1998 Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptative response. *Annals of the New York Academy Science* 851, 311-335.
- Chrousos GP, Gold PW** 1992 The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioural homeostasis. *Journal of the American Medical Association* 267, 1244-1252.
- Cook DM, Kendall JW, Greer MA, Kramer RM** 1973 The effect of acute or chronic ether stress on plasma ACTH concentration in the rat. *Endocrinology* 93, 1019-1024.
- Cone EJ** 1996 Mechanisms of drug incorporation into hair. *Therapeutic Drug Monitoring* 18, 438-443.
- Contreras LN, Hane S, Tyrrell JB** 1986 Urinary cortisol in the assessment of pituitary-adrenal function: utility of 24-hour and spot determinations. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 62, 965-969.
- Creel S, Fox JE, Hardy A, Sands J, Garrott B, Peterson RO** 2002 Snowmobile activity and glucocorticoid stress responses in wolves and elk.

- Conservation Biology* 16, 809–814.
- Croke V** 1997 *The Modern Ark, The History of Zoos: past, present and future*. New York, Scribner.
- Cross N, Pines MK, Rogers LJ** 2004 Saliva sampling to assess cortisol levels in unrestrained common marmosets and the effect of behavioural stress. *American Journal of Primatology* 62, 107–114.
- Dantzer R, Mormède P** 1979 *Le Stress en Elevage Intensif*. Masson, Paris
- Dantzer R, Mormede P** 1983 Stress in farm animals: a need for revaluation. *Journal of Animal Science* 57, 6–18.
- Dathe HH, Kuckelkorn B, Minnemann D** 1992. Salivary cortisol assessment for stress detection in the Asian Elephant (*Elephas maximus*): a pilot study. *Zoo Biology* 11, 285–289.
- Dawson A, Howe PD** 1983 Plasma corticosterone in wild starlingd (*Sturnus vulgaris*) immediately following capture and relation to body weight during the annual cycle. *General and Comparative Endocrinology* 51, 303–308.
- Dehnhard M** 2007 Characterisation of the sympathetic nervous system of Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants based on urinary catecholamine analyses. *General and Comparative Endocrinology* 151, 274–284.
- de Jong IC, Prelle IT, van de Burgwal JA, Lambooi E, Korte SM, Blokhuis HJ, Koelhaas JM** 2000 Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiology & Behavior* 68 571–578.
- De Kloet ER, Sibug RM, Helmerhorst M, Schmidt M** 2005 Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neuroscience Biobehavioural Reviews* 29, 271–281.
- Drazner FH** 1987 The adrenal cortex. En: *Small animal endocrinology*, FH Drazner, DVM Churchill (eds) Livingstone Inc, London, pp 178–201
- Duckworth JW, Hedges S** 1998 *Tracking tigers: a review of the status of tiger, Asian elephant, gaur and banteng in Vietnam, Lao, Cambodia and Yunnan (China) with recommendations for future conservation action*. WWF Indochina Programme, Hanoi, Vietnam.
- Ekkel ED, Dieleman SJ, Shouten WGP, Portela A, Cornelissen G, Tielen MJM, Halberg F** 1996 The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiology & Behavior* 60, 985–989
- Ellis T, James JD, Scott AP** 2005. Branchial release of free cortisol and melatonin by

- rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 67, 535-540.
- Ellis T, James JD, Stewart C, Scott AP** 2004. A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 65, 1233-1252.
- Eriksson H, Gustafsson JA** 1970 Steroids in germfree and conventional rats. Distribution and excretion of labelled pregnenolone and corticosterone in male and female rats. *European Journal of Biochemistry* 15, 132-139.
- Evers AWM, Verhoeven EWM, Kraaijaat FW, de Jong EMGJ, de Brouwer SJM, Schalkwijk J, Sweep FCGJ, van de Kerkhof PCM** 2010 How stress gets under the skin: cortisol and stress reactivity in psoriasis. *British Journal of Dermatology* 163, 986-991.
- Ewbank R, Meese GB** 1971 Aggressive behaviour in groups of domesticated pigs on removal and return of individuals. *Animal Production* 13, 685-693.
- Ferguson MM, MacPhee GB** 1975 Kinetic study of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase in rat submandibular salivary gland. *Archives of Oral Biology* 20, 241.
- Fowler ME, Mikota SK** 2006 *Biology, medicine and surgery of elephants*. ME Fowler, SK Mikota (eds) Blackwell Publishing 1st Edition Oxford, p.p. xiii.
- Fox L, Butler WR, Everett RW, Natzke RP** 1981 Effect of adrenocorticotropin on milk and plasma cortisol and prolactin concentrations. *Journal of Dairy Science* 64, 1794-1803.
- Fuchs E, Kirschbaum C, Benisch D, Bieser A** 1997 Salivary cortisol: a non-invasive measure of hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *Laboratory Animals* 31, 306-311.
- Gagliano M, McCormick MI** 2009 Hormonally mediated maternal effects shape offspring survival potential in stressful environments. *Oecologia* 160, 657-665.
- García Belenguer S, Mòrmede P** 1993 Nuevo concepto de estrés en ganadería: Psicobiología y neurobiología de la adaptación. Investigación Agraria: *Producción y Sanidad Animal* 8, 87-110.
- Goymann W, Möstl E, Van't Hof T, East ML, Hofer H** 1999 Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). *General and Comparative Endocrinology* 114, 340-348.
- Graham LH, Brown JL** 1996 Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in

- endangered felids. *Zoo Biology* 15, 71-82.
- Greenwood LN, Scott AP, Vermeirssen EL, Mylonas CC, Pavlidis M** 2001 Plasma steroids in mature common dentex (*Dentex dentex*) stimulated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *General and Comparative Endocrinology* 123, 1-12.
- Gröing K, Saller M** 1998 *Elephants; a cultural and natural history*. Colonia, Alemania, Könemann Verlagsgesellschaft mbH.
- Grubb T** 1989 Feather growth bars as indicators of nutritional status. *Auk* 106, 314-320.
- Guyton AC, Hall JA** 2001 Endocrinología y reproducción. En: *Tratado de Fisiología Médica*, Interamericana McGraw-Hill de España, 10ª ed. Madrid, pp 1005-1164.
- Hackl R, Bromundt V, Daisley J, Kotrschal K, Möstl E** 2003 Distribution and origin of steroid hormones in the yolk of Japanese quail eggs (*Coturnix coturnix japonica*) *Journal of Comparative Physiology B* 173, 327-331.
- Haeckel R** 1989 Application of saliva in laboratory medicine. Report on the workshop conference. *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry* 27, 233-252.
- Haen E, Halberg F, Cornelissen G** 1994. Cortisol marker rhythmometry in pediatrics and clinical pharmacology. *Annual Review of Chronopharmacology*. 1, 165-168.
- Hamilton GD, Weeks Jr HP** 1985 Cortisol and aldosterone comparisons of cottontail rabbits collected by shooting, trapping, and falconry. *Journal of Wildlife Diseases* 31, 40-42.
- Harper JM, Austad SN** 2000 Fecal glucocorticoids: a non-invasive method of measuring adrenal activity in wild and captive rodents. *Physiological and Biochemical Zoology* 73, 12-22.
- Hedges S, Tyson MJ, Sitompul AF, Kinnaird MF, Gunaryadi D, Asla N** 2005 Distribution, status and conservation needs of Asian elephants (*Elephas maximus*) in Lampung Province, Sumatra, Indonesia. *Biological Conservation* 124, 35-48.
- Ingram JR, Crockford JN, Matthews LR** 1999 Ultradian, circadian and seasonal rhythms in cortisol secretion and adrenal responsiveness to ACTH and yarding in unrestrained red deer (*Cervus elaphus*) stags. *The Journal of endocrinology* 163, 289-300.
- Jurke MH, Czekala NM, Lindburg DG, Millard SE** 1997 Fecal corticoid metabolite measurement in cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Zoo Biology* 16, 133-147.
- Kemf E, Santiapillai C** 2000 *Asian elephants in the wild, 2000*. A WWF Species Status Report.

- WWF-International, Gland, Switzerland.
- Kirchbaum C, Hellhammer DH** 1994 Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology* 19, 313-333.
- Klasing KC** 2005 Potential impact of nutritional strategy on noninvasive measurements of hormones in birds. *Annals of the New York Academy Science* 1046, 5-16.
- Kong WM, Alagband-Zadeh J, Jones J, Carter G, O'Shea D** 1999 The midnight to morning urinary cortisol increment is an accurate, noninvasive method for assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84, 3093-3098.
- Koren L, Mokady O, Karasov T, Klein J, Koren G, Geffen E** 2002 A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Animal Behaviour* 63, 403-406.
- Kuckelkorn B, Dathe HH** 1990 Trächtigkeits-diagnose beim Panzernashorn (*Rhinoceros unicornis*) anhand von Progesteronbestimmungen im Speichel. *Der Zoologische Garten* 60, 333-340.
- Leimgruber P, Gagnon JB, Wemmer CM, Nelly DS, Songer MA, Sellig ER** 2003 Fragmentation of Asia's remaining wildlands: Implications for Asian elephant conservation. *Animal Conservation* 6, 347-359.
- Lidner HR** 1972 Enterohepatic circulation and patterns of urinary excretion of cortisol metabolites in the ewe. *Journal of Endocrinology* 52 XIX - XX.
- Lipar JL, Ketterson ED, Nolan Jr V, Casto JM** 1999 Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. *General and Comparative Endocrinology* 115, 220-227.
- López JR** 2005. Capture, restraint and transport stress in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*). Modulation with acepromazine and evaluation using physiological parameters. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- López-Calderón A** 1999 Glándulas suprarrenales. En *Fisiología humana*, JAF Tresguerres (eds), Mc Graw-Hill Interamericana, 2ª ed. Madrid, pp 931-952.
- López-Mondejar P, Fuentes MA, Mauri M, Mora A, Pérez-Soto M, Vargas F, Martín Hidalgo A** 2006 Determinación de cortisol salivar en el diagnóstico de la enfermedad de Cushing pediátrico. *Anales de Pediatría* 64, 270-272.
- Love OP, Wynne-Edwards KE, Bond L, Williams TD** 2008 Determinants of within-

- and among clutch variation in yolk corticosterone in the European starling. *Hormones and Behavior* 53, 104 -111.
- Lutz CK, Tiefenbacher S, Jorgensen MJ, Meyer JS, Novak MA** 2000 Techniques for collecting saliva from awake, unrestrained, adult monkeys for cortisol assay. *American Journal of Primatology* 52, 93-99.
- Mallapur A, Sinha A, Waran N** 2005 Influence of visitor presence on the behavior of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*) housed in Indian zoos. *Applied Animal Behavior Science* 94, 341–352.
- Manser C** 1992 *The assessment of stress in laboratory animals*. Causeway, Horsham, West Sussex (UK): Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals.
- Menargues A, Urios V, Mauri M** 2008 Welfare assessment of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. *Animal Welfare* 17, 305-312.
- Meyer JM, Walker SL, Freeman EW, Steinetz BG, Brown JL** 2004 Species and fetal gender effects on the endocrinology of pregnancy in elephants. *General and Comparative Endocrinology* 138, 263-270.
- Miller MW, Hobbs NT, Williams ES** 1991 Spontaneous pasteurellosis in captive Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): clinical, laboratory, and epizootiological observations. *Journal of Wildlife Disease* 27, 534-542.
- Millsaugh JJ, Woods RJ, Hunt KE, Raedeke KJ, Brundige GC, Washburn BE, Wasser SK** 2001 Using fecal glucocorticoid assays to study the physiological stress response of elk. *Wildlife Society Bulletin* 29, 899-907.
- Moberg GP** 1990 How behavioral stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *Journal of Dairy Science* 74, 304–311.
- Monfort SL, Brown JL, Wildt DE** 1993 Episodic and seasonal rhythms of cortisol secretion in male Eld's deer (*Cervus eldi thamin*). *Journal of Endocrinology* 138, 41-49.
- Monfort SL, Mashburn KL, Brewer BA, Creel SR** 1998 Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 29, 129-133.
- Montané J** 2002 Valoración del estrés de captura, transporte y manejo en el corzo (*Capreolus capreolus*). Efecto de la acepromacina y de la cautividad. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

- Morineau BA, Barka A, Gourmelen M, Degeilh F, Ardí N, Al-Halnak A, Soliman H, Gosling JP, Julián R, Brerault JL, Aubert P, Villette JM, Pruna A, Galons H, Fiet J** 1997 Radioimmunoassay of corticosterone in serum, urine and saliva to assess the status of the cortisol-corticosterone Shuttle. *Clinical Chemistry* 43, 1397-1407.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ** 1984 Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological effects. *Endocrine Reviews* 5, 25-44.
- Ohl F, Kirschbaum C, Fuchs E** 1999 Evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) via salivary cortisol measurement. *Laboratory Animals* 33, 269-274.
- Olivier R** 1978 Distribution and status of the Asian elephant. *Oryx* 14, 379-424.
- Onishi S, Miyazawa G, Nishimura Y, Sugiyama S, Tamakawa T, Inagaki H, Katoh T, Itoh S, Isobe K** 1983 Postnatal development of circadian rhythm in serum cortisol levels in children. *Pediatrics* 72, 399-404.
- Palme R** 2005 Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy Science* 1046, 75-80.
- Palme R, Möstl E** 1997 Measurements of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Mammalian Biology* 62, 192-197.
- Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Möstl E** 2005 Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy Science* 1040, 162-171.
- Palme R, Robia C, Messmann S, Hofer J, Möstl E** 1999 Measurements of faecal cortisol metabolites in ruminants: anon-invasive parameter of adrenal function. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 86, 237-241.
- Parrot RF, Misson BH, Baldwin BA** 1989 Salivary cortisol in pigs following adrenocortrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *British Veterinary Journal* 145, 362-366.
- Pedernera-Romano C, Valdez RA, Singh S, Chiappa X, Romano MC, Galindo F** 2006 Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): a non-invasive technique, *Animal Welfare* 15, 359-362.
- Peeters M, Sulon J, SerTEYN D, Vandenheede M** 2010 Assessment of stress level in horses during competition

- using salivary cortisol: preliminary studies. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* 5, 216.
- Powell DM, Carlstead K, Tarou LR, Brown JL, Monfort SL** 2006 Effects of construction noise on behaviour and cortisol levels in a pair of captive Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Zoo Biology* 25, 391-408.
- Puppe B** 1998 Effects of familiarity and relatedness on agonistic pair relationship in newly mixed domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 58, 233-239.
- Queyras A, Carossi M** 2004 Non-invasive techniques for analysing hormonal indicators of stress. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 40, 211-221.
- Recuerda P, Moyano R, Castro F** 2003 *Bienestar animal*. P Recuerda, R Moyano, F Castro (eds) Córdoba.
- Reeder DM, Kramer KM** 2005 Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalogy* 86, 225-235.
- Rettenbacher S, Möstl E, Groothuis TGG** 2009 Gestagens and glucocorticoids in chicken eggs. *General and Comparative Endocrinology* 164, 125-129.
- Rijnberk A, Mol JA** 1989 Adrenocortical function. En: *Clinical Biochemistry of Domestic Animal*, J Kaneko (eds) Academia Press Inc. San Diego, 4^a ed California, pp 610-629.
- Romero LM, Romero RC** 2002 Corticosterone responses in birds: the importance of rapid initial sampling. *Condor* 104, 129-135.
- Ruis MA, Te Brake JH, Engel B, Ekkel ED, Buist WG, Blokhuis HJ, Koolhaas JM** 1997 The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender and stress. *Physiology & Behavior* 62, 623-630.
- Sabatino F, Masoro EJ, McMahan A, Kuhn RW** 1991 Assessment of the role of glucocorticoid system in aging process and in the action of food restriction. *Journal of Gerontology* 46, 171-179.
- Santiapillai C, Jackson P** 1990 *The Asian elephant: an actionplan for its conservation*. IUCN/SSC Asian Elephant Specialist Group, Gland, Switzerland.
- Sapolsky RM** 1992 Neuroendocrinology of the stress-response. In: *Behavioural endocrinology*. JB Becker, SM Breedlove, D Crews (eds) MIT Press, Cambridge, pp 287-324.
- Sapolsky RM** 1990 Stress in the wild. *Scientific American*, (Jan): 116-123.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU** 2000 How do glucocorticoids influence stress responses? integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative

- actions. *Endocrine Reviews* 21, 55–89.
- Schatz S, Palme R** 2001 Measurement of faecal cortisol metabolitos in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications* 25, 271-287.
- Schoech SJ, Ktterson ED, Nolan Jr V** 1999 Exogenous testosterone and the adrenocortical response in dark-eyed juncos. *Auk* 116, 64-72.
- Schwarzenberger F, Möstl E, Palme R, Bamberg E** 1996 Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 42, 515-526.
- Scott AP, Ellis T** 2007 Measurement of fish steroids in water a review. *General and Comparative Endocrinology* 153, 392-400.
- Scott AP, Hirschenhauser K, Bender N, Oliveira R, Earley RL, Sebire M, Ellis T, Pavlidis M, Hubbard PC, Huertas M, Canario A** 2008 Non-invasive measurement of steroids in fish-holding water: important considerations when applying the procedure to behaviour studies. *Behaviour* 145, 1307-1328.
- Selye H** 1936 A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32 .
- Selye H** 1946 The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Journal of Clinical Endocrinology* 6, 117.
- Selye H** 1974 *Stress without Distress*, McClelland and Steward Ltd, Toronto.
- Selye H** 1976 *Stress in Health and Disease*. Boston: Butterworth
- Sharpley CF, Kauter KG, McFarlane JR** 2009 An initial exploration of in vivo hair cortisol response to a brief pain stressor: latency, localization and independence effects. *Physiological Research* 58, 757–761.
- Sheriff MJ, Bosson CO, Krebs CJ, Boonstra R** 2009 A noninvasive technique for measuring fecal cortisol metabolites in snowshoe hares (*Lepus americanus*). *Journal of Comparative Physiology* 179, 305–313.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehantym B, Palme R, Boonstra R** 2011 Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166, 869-887.
- Shimozuru M, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y** 2006 Scent-marking and sexual activity may reflect social hierarchy among groupliving male Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Physiology & Behavior* 89, 644–649.
- Shutt DA, Fell LR** 1985 Comparison of total and free cortisol in bovine serum and milk or calostrum. *Journal of Dairy Science* 68, 1832-1854.

- Shoshani J, Eisenberg JF** 1982 *Elephas maximus*. *Mammalian Species* 182, 1-8.
- Smith EL, Hill RL, Lehmani IR, Lefkowitz RJ, Handler P, White A** 1987 Principles of Biochemistry: Mammalian Biochemistry, Internacional student edition, 7^a ed Mc Graw-Hill Internacional Book Company, Auckland, Bogota pp 542-563.
- Sorensen PW, Pinillos M, Scott AP** 2005 Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione to the water where it functions as a pheromone. *General and Comparative Endocrinology* 140, 164-175.
- Stavinsky R, Russel E, Whitten PL** 1992 Noninvasive method for the detection of androgens and adrenal steroids in free-ranging primates. *American Journal of Physical Anthropology* 14, 187.
- Stephen JM, Ledger RA** 2006 A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Physiology & Behaviour* 87, 911-916.
- Stratakin CA, Chrousos GP** 1995 Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress sytem. In Stress, basic mechanism and clinical implications. *Annals of the New York Academy Science* 771, 1-18.
- Sukumar R** 1992 *The Asian elephant: ecology and management*, 2nd ed. Cambridge University Press.
- Sukumar R** 2003a *The living elephants*. London, T & AD Poyser Ltd.
- Sukumar R** 2003b *The living elephants: evolutionary ecology, behaviour and conservation*. Oxford, UK. Oxford University Press.
- Suzuki M, Uchida S, Ueda K, Tobayama T, Katsumata E, Yoshioka M, Aida K** 2003 Diurnal and annual changes in serum cortisol concentrations in Indo-Pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* and killer whales *Orcinus orca*. *General and Comparative Endocrinology* 132 427-433.
- Talukdar BK, Emslie R, Bist SS, Choudhury A, Ellis S, Bonal BS, Malakar MC, Talukdar BN, Barua M** 2008 *Rhinoceros unicornis*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 17 August 2011.
- Taylor VJ, Poole TB** 1998 Captive breeding and infant mortality in Asian elephants: A comparison between twenty Western zoos and three Eastern elephant centres. *Zoo Biology* 17, 311-332.
- Taylor W** 1971 The excretion of steroid hormone metabolites in bileand feces. *Vitamins and Hormones Series* 29, 201-285.

- Todd HE, Shideler SE, Laughlin FS, Overstreet JW, Pohl CR, Byrd W, Lasley BL** 1999 Application of an enzyme Immunoassay for urinary Follicle-Stimulating Hormone to describe the effects of an acute stressor at different stages of the menstrual cycle in female laboratory macaques. *American Journal of Primatology* 48, 135-151.
- Touma C, Palme R** 2005 Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy Science* 1046, 54-74.
- Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R** 2003 Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology* 130, 267-278.
- Tucker HA, Schwalm JM** 1977 Glucocorticoids in mammary tissues and milk. *Journal of Animal Science* 45, 627-634.
- Van de Kar LD, Richardson-Morton KD, Rittenhouse PA** 1991 Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. In: *Stress revisited. 1. Neuroendocrinology of stress*. G Jasmin, M Antin (eds) New York: Karger, pp 133-173.
- Vegas AS** 2008 Efectos de la transformación del hábitat en la conducta y niveles de estrés de "*Alouatta palliata mexicana*". Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Vera F, Antenucci CD, Zenuto RR** 2011 Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *General and Comparative Endocrinology* 170, 550-557.
- Verkerk GA, Phipps AM, Carragher JF, Matthews LR, Stelwagen K** 1998 Characterisation of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Animal Welfare* 7, 77-86.
- Vincent IC, Michell AR** 1992 Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in Veterinary Science* 53, 342-345.
- Vining RF, McGinley RA, Symors RG** 1983a Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clinical Chemistry* 29, 1752-1756.
- Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Hok Y** 1983b Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Annals of Clinical Biochemistry* 20, 329-335.
- Vinson GP, Whitehouse BJ, Hinson JP** 2007 Adrenal cortex. In: *Encyclopedia of stress*, 2nd edn. G Fink (ed). Elsevier, London, pp 39-46.

- Warner DA, Radder RS, Shine R** 2009 Corticosterone exposure during embryonic development affects offspring growth and sex ratios in opposing directions in two lizard species with environmental sex determination. *Physiological and Biochemical Zoology* 82, 363-371.
- Wasser SK, Bevis K, King G, Hanson E** 1997 Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. *Conservation Biology* 11, 1019-1022.
- Washburn BE, Millsaugh JJ** 2002 Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. *General and Comparative Endocrinology* 127, 217-222.
- Whitten PL, Brockman DK, Stavisky RC** 1998 Recent advances in non-invasive techniques to monitor hormone-behaviour interactions. *Yearbook of Physical Antropology* 41, 1-23.
- Wingfield JC, Maney DL, Breuner CW, Jacobs JD, Lynn S, Ramenofsky M, Richardson RD** 1998 Ecological bases of hormone-behavior interactions: the "emergency life history stage". *American Zoologist* 38, 191-206.
- Wingfield JC, Romero LM** 2001 Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. In: *Handbook of physiology, section 7: the endocrine system. Coping with the environment: neural and endocrine mechanisms.* BS McEwen (ed) Oxford University Press, Oxford, pp 211-236.
- World Wild Found for Nature (WWF)** 2002a. *Saving a future for Asia's wild rhinos & elephants. WWF's Asian Rhino and Elephant Action Strategy.* WWF-International, Gland, Switzerland.
- World Wild Found for Nature (WWF)** 2002b. *WWF factsheet: Asian elephant (Elephas maximus).* Prepared for the 12th Meeting Conference of the Parties to CITES Santiago, 3-15 November 2002. WWF-World Wide Fund for Nature, Godalming, UK.
- Zautra AJ, Hofmann J, Potter P, Matt KS, Yocum D, Castro L** 1997 Examination of changes in interpersonal stress as a factor in disease exacerbations among women with rheumatoid arthritis. *Annals of Behavioural Medicine* 19, 279-286.



Agradecimientos

Ha sido un largo recorrido echando la vista atrás, el día que comencé mi andadura en la Universidad, allá por el año 1996, cuando fui una de los primeros 90 alumnos de la primera promoción de Arquitectura. Tras dos años de andadura en esta carrera, una bronquitis aguda, incontables noches en vela realizando puestas a escala, axonometrías y rayados micrométricos escuchando las madrugadas de “Gomaespuma” y “Espacio en Blanco”, y una lesión cervical provocada por las interminables horas de dibujo, decidí cambiar mi rumbo radicalmente. Mi pasión por la naturaleza y los animales me llevó a matricularme en la licenciatura de biología, que combiné con mi otra gran afición: el deporte. Hubo una asignatura en esta carrera que me abrió un nuevo horizonte: la Zoología y dentro de ésta, la Zoología de Vertebrados y la Etología e inmediatamente supe a lo que me quería dedicar.

No fue hasta dos años después de finalizar la licenciatura cuando tuve la oportunidad de realizar una tesis doctoral en el campo de la etología de vertebrados de la mano del Doctor Vicente Urios, profesor mío durante la carrera a quien tengo que agradecer en primer lugar la confianza que depositó en mí desde el primer momento para embarcarnos en la aventura de la creación de la Estación Biológica Terra Natura y desarrollar allí mi tesis doctoral. Han sido años en los que hemos disfrutado de grandes acontecimientos y en los que hemos superado dificultades todo el equipo de la Estación Biológica, con Vicente al frente. La seguridad que siempre ha transmitido Vicente y su espíritu aventurero y soñador nos ha contagiado a muchos de nosotros. A veces incomprendido (por los que no le conocen) ha tenido una forma pionera y poco convencional de realizar “ciencia” dándonos mucha libertad para desarrollar nuestros estudios y dejando siempre una puerta abierta a futuras colaboraciones una vez llegado al final de este recorrido. Por todo esto y mucho más, gracias, Vicente.

La realización de esta tesis no hubiese sido posible sin la beca de investigación que me fue concedida a través de la Fundación Terra Natura, por ello, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a D. Miguel Tarberner, presidente de dicha fundación y a cada uno de sus patronos, por la confianza y el apoyo brindado durante todos estos años.

Han sido muchas personas las que han hecho posible el desarrollo de este estudio, comenzando por el equipo de veterinarios de Terra Natura: con D. Manuel López, como veterinario jefe (por aquél entonces), Rocío Canales y Mario Torro; continuando por los cuidadores de los rinocerontes: M^a Dolores, Elisa y Guzmán; y finalizando con los cuidadores de los elefantes: Adolfo, Oliver, Sonia, Luismi, Ángel, Juan, José, Miguel, Pedro y Marta. Gracias al trabajo de todas estas personas, se coordinaron los trabajos de recolección y almacenamiento de muestras de saliva sin las que esta tesis, sencillamente, no existiría. A todos ellos mil gracias por vuestra paciencia, dedicación e ilusión durante casi tres años de muestreos.

Quiero agradecer especialmente a la doctora Monserrat Mauri, directora del laboratorio de hormonas del Hospital General Universitario de Alicante, que me abrió las puertas para poder utilizar las instalaciones de este laboratorio a través de un convenio entre el hospital y la Universidad de Alicante, y que me ayudó especialmente con la validación bioquímica del análisis con su experiencia y sus consejos. Gracias a mi tía Mara, que me puso en contacto con la doctora Mauri y que sin su “pequeña, gran ayuda” hubiese sido todo mucho más complicado. Gracias también a la doctora Rocío Alfayate, del laboratorio de hormonas, quien tuvo la amabilidad de resolver las dudas que tenía cada vez que tenía problemas con los ajustes de los calibradores y con el contador de rayos gamma. Rocío fue

una persona clave en la detección de la concentración de cortisol en la saliva de los elefantes y los rinocerontes, ya que sin su ayuda no hubiera podido incrementar la sensibilidad del análisis.

Gracias a mis compañeros de la Estación Biológica, ahora ya doctores la mayoría de ellos (y algunos hasta padres!), por no haber sido sólo compañeros de trabajo, sino compañeros de aventuras y amigos y, quienes además de magníficos científicos, son grandes personas. Gracias al Dr. Cadahía, quien desde diferentes lugares de la geografía europea me ha echado una mano con las revisiones de las traducciones de algunos artículos que componen los capítulos de esta tesis. Gracias al Dr. Soutullo que me abrió las puertas del hasta entonces, para mí, “inexplorado” mundo de la estadística. Gracias al Dr. Monroy-Vilchis, por sus consejos y su enorme sentido del humor. Gracias al resto de compañeros de la Estación: Miguel, Diego y Pascual (Dr. López) por tantos momentos inolvidables, como aquella vuelta en taxi desde Sevilleja de la Jara (por un “pequeño percance” con el *Ford Explorer*), con un taxista que no hacía más que hablar de extraterrestres a las 5 de la madrugada.

Quiero agradecer muy en especial al Dr. Limiñana el apoyo que me ha brindado durante la redacción de esta tesis doctoral quien durante los meses de julio y agosto de este año ha estado al pie del cañón para revisar artículos, consultar dudas y prestarme toda la ayuda que ha estado al alcance de su mano, sacrificando quizás su tiempo libre y quien siempre, con una sonrisa, ha estado ahí para ayudarme. No conozco a muchas personas como tú, Rubén. Eres un amigo al que admiro como persona y como profesional. Te estaré siempre agradecida por todo lo que me has ayudado en un momento tan importante para mí. En este apartado no puedo olvidarme de Lourdes, quien también debe haber “sufrido” mi tesis estos últimos meses. Quiero pedirte disculpas por haber “liado” tanto a Rubén y agradecerte la paciencia que has tenido.

Y llegados a este punto, tengo que agradecer a mi familia por todo el apoyo que me han brindado. A mi niña, que me ha descubierto el verdadero sentido de mi existencia. Quien ha sacudido los cimientos de mi vida siendo mi pilar central. Quien me ha dado fuerzas para luchar por un futuro mejor (sin ella ser consciente de todo esto, pero que quizás algún día, si llega a ser mamá, podrá comprender). Quien me ha hecho sonreír en los momentos más difíciles. Quien me ha hecho unos dibujos tan bonitos y quien me ha hecho tanta compañía sentándose en su pequeña sillita con su mesita a hacer la “tesis” con su mamá. Gracias también a Tony, que se ha portado como el “padrazo” y el “marido” que es, apoyándome con este proyecto, pese a las dificultades del momento y creyendo en mí.

Gracias a mi hermano, que es el pulmón de mi vida. Quien siempre está a mi lado, aunque nos separen cientos de kilómetros y nos veamos menos de lo que a ambos nos gustaría. Gracias a mi abuela, que siempre ha estado tan orgullosa de su nieta.

Mil gracias a mis padres, de los que una hija no puede estar más orgullosa y agradecida, que han estado a mi lado todos los momentos de mi vida, los más bonitos y los más difíciles. En los que tanto me he apoyado cuando no me encontraba a mí misma y me decían que debía buscar en mis raíces. Dándome siempre alas para elegir libremente mi destino. Gracias a los dos, por todo lo que vosotros y yo sabemos que me habéis ayudado.

Gracias por haberme dado raíces y alas.

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha acordó otorgar, por
..... a la Tesis Doctoral de Dña. MARÍA DE LA
ASUNCIÓN MENARGUES MARCILLA la calificación de
.....

Alicante de de

El Secretario,

El Presidente,



UNIVERSIDAD DE ALICANTE
CEDIP

La presente Tesis de D. _____
_____ ha sido registrada con el nº _____ del
registro de entrada correspondiente.

Alicante ____ de _____ de _____

El Encargado del Registro,

