

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Identificación y Cuantificación de Metabolitos Fecales  
de Cortisol en *Zalophus wollebaeki* en la isla San  
Cristóbal-Galápagos  
Proyecto de Investigación**

**Diana P. Ochoa Castro**

**Ecología Aplicada**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Licenciada en Ecología Aplicada

Quito, 29 de agosto de 2016

Universidad San Francisco de Quito USFQ

Colegio Ciencias Biológicas y Ambientales

---

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Identificación y Cuantificación de Metabolitos Fecales de Cortisol en  
*Zalophus wollebaeki* en la isla San Cristóbal-Galápagos**

**Diana P. Ochoa Castro**

Calificación:

10 (DIEZ)

Nombre del profesor, Título académico

Diego Paez-Rosas, PhD.

Firma del profesor



San Cristóbal, 19 de agosto del 2016

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Diana Paola Ochoa Castro

Código: 25120

Cédula de Identidad: 1709584419

Lugar y fecha: Quito, agosto de 2016

**Dedicatoria**

Al Ecuador,

mi país repleto de enormes riquezas.

A la vida,

que merece el respeto más grande de todos

tesoro que solo vale vivo y nunca muerto.

Al tiempo,

por perseguirme

apresurarme

y regalarme sabiduría.

A mis padres,

por permitirme ser libre.

y a *Zalophus wollebaeki*

por simplemente

existir.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que han estado involucradas en mi carrera y en esta investigación. A todos los compañeros que me acompañaron durante todos estos años, a todos los amigos que en el campo, laboratorio y análisis estadísticos que no me abandonaron. A todos los profesores que me aceptaron en el campo y en las clases con Killa; a todos los que me han ayudado a compartir esta aventura de mi vida. A todos mis amigos, familiares, jefes y estudiantes quienes me motivaron a no abandonar hacer lo que amo. A este país de increíbles maravillas naturales y humanas. A todos los que creyeron en mí, en la validez de mi investigación y en la continua propuesta de conservación. A *Zalophus wollebaeki* por existir y por procurar que sigas existiendo sano. Porque todos luchamos con un fin en común: valorar la vida solo por estar viva.

## Resumen

El lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) representa a una de las poblaciones de pinnípedos más pequeñas y vulnerables del mundo. Esta especie ha sido gravemente afectada por los fenómenos de El Niño en las últimas tres décadas y ha sido clasificada En Peligro de Extinción por la UICN. Distintas colonias reproductivas de esta especie habitan bajo distintos grados de interacción humana y esto puede incrementar el número de impactos y efectos de distintos factores directos e indirectos entre humanos y especies silvestres por los distintos conflictos de recursos y espacio.

Se realizó un análisis comparativo no invasivo de las concentraciones basales de glucocorticoides fecales de cortisol entre dos colonias reproductivas en la misma isla de San Cristóbal: Puerto Baquerizo Moreno (0°54'08.57"S 89°36'33.12"W) y Punta Pitt (0°42'03.92"S 89°14'36.7"W) en Junio 2015. Estas colonias en sus respectivas localidades fueron seleccionadas debido a su nivel de continua interacción con el ser humano (Puerto Baquerizo Moreno) versus el completo aislamiento de asentamientos humanos o visitación turística (Punta Pitt).

Los resultados indican que existe una diferencia significativa en las concentraciones basales de glucocorticoides en ambas colonias (Punta Pitt: 840.90 ng(esteroide)/g(heces) vs 'El Malecón' 371.61 ng(esteroide)/g(heces)). Esto sugiere que esta diferencia pueden ser atribuidas a la atenuación fisiológica de glucocorticoides por excesiva liberación de cortisol. Estos resultados son consistentes con otras investigaciones donde se ha observado que la colonia 'El Malecón' en Puerto Baquerizo Moreno presenta otras señales de atenuación fisiológica en distintos parámetros de salud y de comportamiento.

## Abstract

The Galápagos Sea Lion (*Zalophus worlbeaeki*) represents one of the smallest and most vulnerable populations of pinnipeds in the world. This species has been seriously affected by 'El Niño' events and classified Endangered by the IUCN. Different reproductive colonies live under different degrees of human interaction and this can increase the number of impacts and direct or indirect effects between humans and wild populations due to the various resources and space conflicts.

A non-invasive comparative analysis of the basal concentrations of faecal cortisol glucocorticoids between two reproductive colonies on the same island of San Cristóbal: Puerto Baquerizo Moreno (0°54'08.57"S 89°36'33.12"W) and Punta Pitt (0°42'03.92"S 89°14'36.7"W) in June 2015. These two localities and their respective colonies were selected due to the continuous interaction with human beings (Puerto Baquerizo Moreno) versus complete isolation from cohabitation and tourist visitation (Punta Pitt).

The results indicate that there is a significant difference in the basal concentrations of glucocorticoids between the two colonies (Pitt: 840.90 ng(steroid)/g(faeces) vs 'El Malecón' 371.61 ng(steroid)/g(faeces)). This suggests that the variation can be attributed to the physiological attenuation to glucocorticoids due to excessive and prolonged cortisol release. These results are consistent with other previous findings where the 'El Malecón' colony on Puerto Baquerizo Moreno presents other signs of physiological attenuation in different health and behavioural parameters.

## Tabla de Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Marco Teórico</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 Objetivos</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Objetivo General.....	14
1.2.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MÉTODOS Y MATERIALES</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Sitio de Estudio</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2 Colección de datos</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3 Cuantificación de metabolitos fecales</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4 Análisis y estadística</b> .....	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>7. TABLAS</b> .....	<b>26</b>
<b>8. FIGURAS</b> .....	<b>27</b>
Figura 1 – Histograma de pg Cortisol y 72T - Punta Pitt y el Malecón.....	27
Figura 2 – Histograma de ng(esteroide)/g(heces) Punta Pitt y el Malecón .....	28
Figura 3a – Histograma de logaritmos naturales de ng(esteroide)/g(heces) Punta Pitt.....	29
Figura 3b – Histograma de logaritmos naturales de ng(esteroide)/g(heces) el Malecón....	30
Figura 4 – Boxplot de logaritmos naturales de ng(esteroide)/g(heces) Punta Pitt y el Malecón .....	31
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>32</b>
Anexo 1 - Isla San Cristóbal.....	32
Anexo 2 - Mapa de Punta Pitt (Páez-Rosas 2015).....	32
Anexo 3 - Puerto Baquerizo Moreno y 4 localidades de toma de muestras .....	33
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	<b>34</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

El lobo marino de Galápagos (*Zalophus wollebaeki*) es una especie endémica de las Islas Galápagos y representa a una de las poblaciones más pequeñas de lobos marinos en el mundo (Trillmich et al. 2013; Trillmich 2015). Esta especie ha sido clasificada en peligro de extinción por la UICN debido a drásticas disminuciones poblacionales durante las últimas tres décadas (Trillmich 2015). Estos impactos están relacionados con procesos naturales y actividades humanas (Alava et al. 2014; Denkinger et al. 2015; Trillmich 2015). Dos eventos de El Niño (1982-83 y 1997-98) provocaron grandes disminuciones poblacionales principalmente por muerte y migración (Alava & Salazar 2006).

La frecuencia e intensidad de los fenómenos naturales se podrían incrementar a consecuencia del cambio climático, afectando seriamente a la sostenibilidad de esta población (Alava & Salazar 2006; Alava et al. 2014; Trillmich et al. 2013). Por otra parte, los efectos antropogénicos son una fuente significativa de impactos directos e indirectos (Denkinger et al. 2015; Walsh et al. 2010) en las poblaciones silvestres. En los próximos años se espera un incremento exponencial en la población humana (González et al. 2008), razón por la que es necesario conocer los distintos tipos y magnitud de los impactos, así como las consecuencias fisiológicas en las poblaciones naturales más expuestas (Walker et al. 2006).

Las Islas Galápagos fueron declaradas como patrimonio natural mundial y reserva de biosfera por la UNESCO, principalmente por la biodiversidad única de este archipiélago aislado por millones de años de las actividades e impactos humanos (Barriga 2014; González et al. 2008). La integridad de los ecosistemas y sus especies, que se conserva en un 95% de su fidelidad natural, son el principal interés turístico (Alava et al. 2014; Walsh et al. 2010). El

turismo es el motor del desarrollo socio-económico de la provincia, contribuye con el 65.4% del producto interno bruto de la provincia y aporta unos \$210 millones anuales para el gobierno nacional (Alava et al. 2014; Gonzáles et al. 2008; Taylor et al. 2003). Esfuerzos enfocados en la conservación y otros en el ecoturismo han promovido varios de los conflictos actuales donde la expansión de la oferta turística genera presión de crecimiento demográfico por migración en busca de mejores oportunidades económicas (Alava et al. 2014; Barriga 2014; Walsh et al. 2010).

La isla San Cristóbal es la segunda más poblada de la provincia de Galápagos (7,330 personas) (Burbano et al. 2014) y varias poblaciones de flora y fauna nativas y endémicas están presentes en el principal asentamiento humano: Puerto Baquerizo Moreno (Denkinger et al. 2015). Aquí se asienta la colonia reproductiva más numerosa de la isla conocida como la colonia “El Malecón” (Páez-Rosas 2008). El ambiente social de las especies de fauna silvestre es una de las principales fuentes de información que pueden inducir una respuesta fisiológica (Creel et al. 2013) y en Puerto Baquerizo Moreno, el ambiente social de *Z. wollebaeki* es constantemente compartido con el ser humano.

Se ha demostrado que las actividades humanas, como el turismo, pueden provocar cambios en las concentraciones de Glucocorticoides (Romero & Wikelski 2002). Estas hormonas, junto con epinefrina y noriepinefrina son efectoras fisiológicas de la estimulación adrenocortical o estrés (Hill & Broom 2009; Sapolsky et al. 1986; 2000; Smith & Vale 2006). Los factores estresantes pueden ser: físicos, climatológicos, nutricionales, psicológicos, agudos o crónicos; y la vía de respuesta fisiológica es altamente conservada (Huber et al. 2003; Petrauskas et al. 2008; Sapolsky et al. 2000). Esta respuesta no es siempre negativa pero si es necesaria para la supervivencia y adaptación (McLean & Smith 2001; Möstl &

Palme 2002; Sapolsky et al.2000).

En los vertebrados, el mecanismo principal por el cual se procesa la información relacionada con el estrés es a través de la iniciación de la cascada fisiológica del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Hill & Broom 2009; Palme 2005; Sapolsky et al. 1986; Smith & Vale 2006). La percepción del factor estresante estimula a la liberación de glucocorticoides en el plasma sanguíneo; las hormonas son metabolizadas por la flora intestinal y por acción enzimática del hígado; estas son excretadas y cuantificables por medio de ensayos inmuno-enzimáticos (Griffin 1950; Huber et al. 2003; Moisan & Le Moal 2012).

Medir la concentración de glucocorticoides fecales presenta varias ventajas: A) permite fácil colección de un alto volumen de muestras de la población; B) es un método no invasivo que no produce un respuesta inducida; C) provee un indicador a la magnitud de la estimulación del eje HPA que permite evaluar la respuesta integrada sin producir un sesgo por manipulación; D) permite que cada individuo o población sirva como su propio control (Dantzer et al. 2010; Goymann et al. 1999; Palme 2014).

La respuesta al estrés (la estimulación del eje HPA) es esencial para los procesos adaptativos de supervivencia, etapa y modo de vida (Hill & Broom 2009; Moisan & Le Moal 2012; Möstl & Palme 2002). Durante un estrés de corta duración la liberación de glucocorticoides mejora la capacidad del organismo de movilizar energía así como adaptar el comportamiento para ejercer la respuesta necesaria a la situación impredecible (Moisan & Le Moal 2012; Möstl et al. 1997; Romero & Wikelski 2002). En un estrés de prolongada duración (largos periodos de elevadas concentraciones de glucocorticoides) puede resultar en supresión de varios sistemas fisiológicos y producir cambios neuro-morfológicos

significativos (Filipovic et al. 2013; Hill & Broom 2009; Moisan & Le Moal 2012). Por lo que validar procesos fisiológicos, inmunológicos y de comportamiento es necesario para comprender adecuadamente los como se afectan los mecanismos biológicos frente al estrés (Carenzi & Verga 2009; Palme 2005).

## **1.1 Marco Teórico**

Las especies han evolucionado mecanismos adaptativos para lidiar con las demandas particulares de cada nicho ecológico para producir una respuesta conductual y fisiológica correspondiente (Hill & Broom 2009; Moisan & Le Moal 2012). El eje HPA es un centro de control fisiológico cuya estimulación se da en situaciones naturales o inducidas (ej. captura y cautiverio); positivas (ej. copulación, parto, apareamiento) o supervivencia (ej. respuesta lucha/huida) y producir una respuesta adaptativa (Creel et al. 2013; Möstl & Palme 2002). Una respuesta inapropiada o inadecuada se considera como un fracaso a su capacidad de lidiar con su ambiente y produce 'estrés' (Filipovic et al. 2013; Hill & Broom 2009; Romero & Wilkeski 2002)

Podemos definir al 'estrés' como el conjunto de efectos que retan al estado de homeostasis y no simplemente a la estimulación adrenocortical (Hill & Broom 2009; Moisan & Le Moal 2012). Bajo esta definición, podemos resumir que el 'estrés' es un estado negativo de sobre-estimulación del eje HPA que alteran al equilibrio fisiológico y neuronal (Filipovic et al. 2013). Esto resulta en la reducción de varios aspectos de la aptitud fisiológica; infringe en la memoria a corto plazo y reduce la capacidad de reaccionar adecuadamente a nuevas situaciones impredecibles (Filipovic et al. 2013; Moisan & Le Moal 2012; Romero & Wikelski 2002). Si existen interacciones negativas o inapropiadas entre las poblaciones naturales y humanos, se puede limitar la capacidad de adaptación de las especies que puede

limitar su potencial productivo y amenazar su supervivencia (Griffin 1989).

El bienestar animal puede ser cuantificado científicamente por medio de distintos indicadores, entre ellos: los glucocorticoides – GC (Hill & Broom 2009; Möstl & Palme 2002; Walker et al. 2006). Los GC son hormonas esteroides mediadores metabólicos producidas frente a un estrés; facilitan importantes procesos adaptativos cardiovasculares y cerebrales (Filipovic et al. 2013; Sapolsky et al. 2000; Smith & Vale 2006). La vía central de la respuesta al estímulo se da por activación de la cascada neuroendocrina que involucra el eje Hipotalámico (CRF) – Pituitario (ACTH) – Adrenal (GC) (Griffin 1989). La percepción del estresor por el cerebro promueve la liberación de CRF (hormona liberadora de corticotropina) y AVP (vasopresina) de las neuronas del PVN (núcleo paraventricular) en el hipotálamo; esto a su vez promueve la liberación de ACTH (hormona adrenocorticotrópica) de la glándula pituitaria al sistema circulatorio y señala a la glándula adrenal de producir epinefrina, noriepinefrina y GC (Griffin 1989; Sapolsky et al. 1986; Smith & Vale 2006). El ACTH promueve la liberación de GC en un mecanismo que implica alteraciones genómicas que se dan en respuesta a un estímulo (Smith & Vale 2006).

Los GC, bajo una estimulación aguda, temporalmente promueve la movilización energética a los músculos y el cerebro para responder adecuadamente a la estimulación (e.j. respuesta de lucha/huida) y son considerados adaptativos y protectores (Moisan & Le Moal 2012; Sapolsky et al. 2000). A su vez, los GC inhiben o limitan otros procesos fisiológicos que son energéticamente costosos: se reduce la efectividad del sistema inmune; inhibe crecimiento somático; reproducción y digestión (Broom 2006; Moisan & Le Moal 2012; Touma & Palme 2005). La misma secreción de GC previene al organismo de exceder la respuesta defensiva primaria por medio de retroalimentación negativa; pero al mismo

tiempo también sirven para estimularla si el factor estresante persiste (Sapolsky et al. 2000; Smith & Vale 2006).

Este es un proceso finamente coordinado, altamente conservado, esencial para la adaptación y supervivencia (Moisan & Le Moal 2012). Tanto la ausencia como el exceso de GC tiene consecuencias pato-fisiológicas (Moisan & Le Moal 2012; Sapolsky et al. 1986; 2000). La elevada concentración de GC durante un periodo extendido de tiempo es característico del estrés crónico (Fowler 1999; Moisan & Le Moal 2012). En el estrés crónico, la secreción excesiva de GC deja de ser beneficiosa para el organismo ya que promueve la reducida efectividad de los sistemas esenciales pero energéticamente costosos a largo plazo (Bennet et al. 2012; Filipovic et al 2013; Moisan & Le Moal 2012; Smith & Vale 2006). Esto provoca cambios permanentes en la transcripción de los receptores en el hipotálamo y afecta directamente al sistema de retroalimentación negativa (Moisan & Le Moal 2012). Alteraciones en el sistema de retroalimentación negativa del eje HPA se ha observado en pacientes humanos con depresión y esta es una condición similar a la experimentada por animales bajo estrés crónico (Mizoguchi et al. 2003).

Existen distintos factores pueden influenciar en las concentraciones de GC y no están únicamente relacionados a la proximidad humana. Existe variabilidad intra e interespecífica; varía de acuerdo a dieta y metabolismo; así como en respuesta a ritmos circadianos, estacionalidad, clima, edad, sexo, estado reproductivo, estado de salud, sensibilización y habituación (Huber et al. 2003; Petrauskas et al. 2008). Los GC del suero sanguíneo son metabolizados en el hígado y excretados en la orina y heces como metabolitos conjugados y no conjugados que pueden ser visualizados por medio de ensayos inmuno-enzimáticos (Möstl & Palme 2002). El análisis por cuantificación de Glucocorticoides Fecales de Cortisol -

GFC ofrece un método práctico para monitorear la respuesta al estrés de forma no invasiva y que reflejan auténticamente las concentraciones de cortisol en el plasma sanguíneo (Möstl & Palme 2002; Palme 2005). Así mismo, los GCF permiten observar una respuesta integrada longitudinal representativa del modo de vida de las especies (Touma & Palme 2005).

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo General

Incrementar información y conocimiento del estado de salud y aptitud física de dos colonias reproductivas de *Zalophus wollebaeki* en la Isla San Cristóbal que están expuestas a distintos grados de interacción humana por medio de parámetros fisiológicos y métodos no invasivos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar y cuantificar metabolitos fecales de cortisol para *Zalophus wollebaeki*
2. Observar si existen diferencias entre las dos colonias de acuerdo al nivel de interacción con el ser humano

## 2. HIPÓTESIS

La exposición a distintos grados de interacción humana alterará de forma significativa la respuesta neuroendocrina de las colonias de lobos marinos (*Zalophus wollebaeki*) que habitan en la isla San Cristóbal.

### 3. MÉTODOS Y MATERIALES

#### 3.1 Sitio de Estudio

La isla San Cristóbal fue seleccionada como sitio de estudio debido a que presenta las variables consideradas en la hipótesis para *Zalophus wollebaeki*: presencia y ausencia de población humana.

Muestras fueron recolectadas en dos localidades: Puerto Baquerizo Moreno y Punta Pitt (Anexo 1). La colonia de Punta Pitt ( $0^{\circ}42'03.92''S$   $89^{\circ}14'36.7''W$ ) (Anexo 2) fue seleccionada como grupo control debido a su completo aislamiento de los asentamientos humanos. En la colonia de "El Malecón" ( $0^{\circ}54'08.57''S$   $89^{\circ}36'33.12''W$ ) (Anexo 3) se recolectaron muestras en las playas y aceras de Puerto Baquerizo Moreno.

Todas las muestras fueron recolectadas entre el 11 y 30 de Junio 2015, de 06:00 a 09:00 am. Únicamente se consideraron muestras diurnas debido que el grupo control (Punta Pitt) solo fue accesible durante la mañana.

#### 3.2 Colección de datos

Se recolectaron muestras al azar ( $n=80$ ) en las ambas localidades. Todas las muestras fueron marcadas con localidad, fecha, hora de colección y en caso de ser posible, identificación del individuo de acuerdo a sexo, edad y estado reproductivo ya que esto puede alterar las concentraciones de glucocorticoides (Möstl et al. 1997; Palme 2005). En el caso de identificar muestras de hembras se añadió información de su estado reproductivo como lactantes o preñadas únicamente si esto fue evidenciado personalmente o por un

asistente. La edad en machos se estimó por desarrollo su testicular catalogándolos como: subadultos y adultos.

Se recolectaron únicamente muestras frescas las cuales fueron identificadas por su textura o por visualización directa. La toma de muestras se realizó en distintos días y las playas fueron recorridas en una sola dirección para evitar doble colección. Todas las muestras fueron congeladas después de su recolección.

Los extractos de los metabolitos fecales fueron extraídos en las instalaciones del GSC-USFQ de acuerdo a la metodología establecida por Palme et al. (2005). Las muestras fueron rápidamente descongeladas a 95°C durante 15 minutos para evitar la degradación de los glucocorticoides por medio de la acción bacteriana. Estas fueron homogenizadas y una alícuota de 0.5 g fue colocada en tubos de ensayo donde se añadieron 5 ml de metanol al 80% por cada muestra. Cada tubo de ensayo fue enumerado y batido a mano durante 30 segundos previo a la centrifugación para asegurar que toda la muestra esté dentro del metanol. Los tubos de ensayo fueron centrifugados durante 30 minutos a 3000 rpm. 0.5 ml de sobrenadante fue extraído por triplicado y evaporados a 75°C durante 5 horas con ayuda de un horno-secador. Los extractos permanecieron bajo congelamiento aparte de los momentos de viaje a Austria.

### **3.3 Cuantificación de metabolitos fecales**

La identificación y cuantificación de los metabolitos fecales de cortisol fue realizada en las instalaciones de la Unidad de Fisiología, Patofisiología y Endocrinología Experimental del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Medicina Veterinaria en

Viena, Austria entre el 3 y 7 de Agosto 2015.

Inicialmente se preparó cada muestra previo al inmunoensayo enzimático (EIA). Los extractos fueron inicialmente re-suspendidos en 400  $\mu$ l de metanol al 100%. Se mezcló a 1300 rpm en un termo-mezclador a 30°C por 5 minutos. En esta fase de la re-suspensión se utilizó metanol al 100% ya que esto permite que haya mejor recuperación física de los metabolitos previamente extraídos y evaporados (Schatz & Palme 2001). Una vez re-suspendidos se retorna la concentración de metanol al 80% ya que esto permite la mejor recuperación de metabolitos después de la administración de los esteroides biotinados (Palme 2005). Se añadieron 100  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O y nuevamente fueron mezcladas a 1300 rpm en el termo-mezclador a 30°C durante 15 minutos hasta que todo el material sea homogenizado.

La cuantificación de metabolitos se realizó mediante el método estandarizado del inmunoensayo enzimático sugerido por Palme (2014) para medir metabolitos de esteroides fecales con placas de microtitulación utilizando esteroides biotinilados como marcadores. Se prepararon los estándares para ser incubados con las muestras y los controles. Tres soluciones stock fueron preparadas previamente en el laboratorio: con anticuerpos, con el indicador esteroide biotinilado y estándar. Se separó en porciones de 0.05 ml y cada uno contiene 25000 pg de su respectivo esteroide. Los estándares son preparados a partir de 0.15 ml de buffer de ensayo con 0.05 ml de estándar a 25000 pg y diluido 1:2.5 siete veces para obtener concentraciones de desde 500 pg hasta 2 pg por 10  $\mu$ l. Las muestras fueron diluidas 1:10 (50  $\mu$ l de muestra con 450  $\mu$ l de solución buffer de ensayo), se añadieron 100  $\mu$ l del stock de esteroide biotinado y 100  $\mu$ l del stock del anticuerpo.

Se colocaron en las microplacas 50  $\mu$ l y se incubó a bajo ligero movimiento constante durante una noche a 4 °C. Se incubaron las muestras con dos distintos marcadores con biotina: 72T (11-oxoetiocholanolone) y Cortisol.

- 11-oxoetiocholanolone [Standard: 11-oxoeticholanolone (5 $\beta$ -androstane-3 $\alpha$ -ol-11, 17-dione) rango: 2 – 500 pg/pocillo; Anticuerpo: 11-oxoeticholanolone-17-CMO:BSA (1:6000; Ak 3199/6/96); Marcador: 11-oxoeticholanolone-17-CMO-biotinyl-3, 6, 9-trioxaundecanediamin (biotinyl-LC, 1:2x10<sup>6</sup>, EL 71)].
- Cortisol [Standard: cortisol (4-prefnene-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-3,20-dione) rango: 0.33 – 80 pg/pocillo; Anticuerpo: cortisol-3-CMO:BSA (1:20,000); Marcador: cortisol-3-CMO-DADDO-biotin (1:100,000)].

La microplaca es leída por medio de absorbancia utilizando ELx808 Lector de Absorbancia (BIO-TEK Instruments) a 450 nm e interpretados por medio del software GEN 5™ Data Analysis (BIO-TEK Software).

Se repitió el procedimiento con una dilución de 1:100 con el anticuerpo 11-oxoetiocholanolone pero se conservó la dilución 1:10 para la incubación con cortisol. Los resultados producidos por el software GEN 5™ Data Analysis (BIO-TEK Software) nos provee datos de la concentración de los esteroides no marcados con biotina y el porcentaje de variación entre los duplicados.

Por medio de la ecuación 1 se puede obtener los nano gramos de esteroide no biotinado por cada gramo de muestra fecal.

$$\frac{\text{ng (esteroide)}}{\text{g (heces)}} = \frac{\text{pg} \times \text{volumen de extracto} \times \text{factor de dilución}}{\text{peso de muestra fecal} \times \text{volumen de muestra} \times 1000} \quad (\text{Ec. 1})$$

**pg** = pico gramos de esteroide establecidos por el EIA

**Volumen de extracto** = mg de muestra fecal +  $\mu\text{l}$  de solvente para la extracción. Estos dos factores son sumados y analizados como uno solo dado que la muestra es una suspensión.

**Factor de dilución incubado** = 1:10 para Cortisol; 1:100 para 72T

**Peso de muestra fecal** = volumen utilizado para la extracción ( $\pm 0.5$  g)

**Volumen de muestra**= volumen incubado en el EIA en  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{l}$ )

**x 1000** = factor de conversión de pico a nano gramos

### 3.4 Análisis y estadística

Se realizó un análisis de grupos para establecer diferencias en los niveles de glucocorticoides entre las dos poblaciones. Con ayuda del programa Input Analyzer se determinó que los datos seguían una distribución exponencial, por lo que fueron normalizados mediante el cálculo de logaritmo natural. Se realizó un T-Student para comparar la media de las dos poblaciones.

## 4. RESULTADOS

El inmunoensayo enzimático (EIA) demostró una diferencia significativa entre los dos indicadores analizados. No se encontraron rastros cuantificables de cortisol en las heces en

ambas poblaciones (dilución 1:10; N = 80; promedio = 0.011 pg). Mientras que las concentraciones de 11-oxoaetiocholanolone fueron cuantificables e incubables incluso a menor dilución (1:100).

La colonia de Punta Pitt presentó valores más elevados de ng/g en comparación a El Malecón (Fig. 1). El intervalo de valores del indicador 72T (11-oxoaetiocholanolone) de la colonia control Punta Pitt (N=40) fue de 36.3-7405.5 ng(esteroide)/g(heces) con un promedio general de 840.90 ng(esteroide)/g(heces); mientras que en la colonia experimental El Malecón (N=40) se obtuvieron intervalos de 3.96-1601.5 ng(esteroide)/g(heces) con promedio de 371.61 ng(esteroide)/g(heces) (Fig.2).

Los valores de ng(esteroide)/g(heces) del indicador 72T (11-oxoaetiocholanolone) presentaron distribución normal para ambas colonias (Punta Pitt W=0.981; p=0.738; Fig. 3a. Malecón W=0.922; p=0.008; Fig.3b).

La prueba T-Student (Fig. 4) encontró diferencias significativas en los valores de ng(esteroide)/g(heces) del indicador 72T (11-oxoaetiocholanolone) de las diferentes colonias (t=2.875; p=0.0051).

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que fue posible identificar un metabolito fecal de cortisol que puede servir como indicador para la validación biológica. La mayoría de esteroides, particularmente los GC, son intensamente metabolizados por la flora intestinal, por esta razón las concentraciones de cortisol, corticosterona, progesterona y testosterona es nula

en heces (Palme 2005). Sin embargo el esqueleto esteroide del cortisol es excretado en forma de metabolitos que si pueden conjugados con indicadores ser identificables (Möstl et al. 1997). El anticuerpo 72T (11-oxoaetiocholanolone) fue reconocido para *Z. wollebaeki* como un potencial indicador.

Las diferencias en las concentraciones de GC en ambas poblaciones puede ser consecuencia de distintos factores relacionados con el método de análisis. El número de muestras para el tamaño de las colonias es estadísticamente significativa pero a su vez reducido para establecer un patrón general de población. La variación entre las concentraciones puede además estar relacionada con la reactividad cruzada de los anticuerpos en el EIA que reconoce otros sustratos de metabolitos, principalmente de hormonas sexuales (Möstl & Palme 2002; Palme 2005).

Debido a que fueron escasas las muestras identificables, se optó por la técnica anónima de muestreo al azar y no fue posible atribuir una muestra a un individuo específico, no hubo identificación de sexos y edades. Estas son variables que pueden alterar la concentración de 11-oxoaetiocholanolone por reactividad cruzada de los anticuerpos y porque las concentraciones pueden alterar por distintos factores naturales, fisiológicos, sexuales y ambientales.

No existen niveles críticos de GC previamente identificados para esta especie y la validación biológica esta en proceso de análisis. Sin la validación biológica no se puede saber si el identificador 11-oxoaetiocholanolone responde ante un estrés o una situación de estrés específica. Al observar una variación en el tiempo se puede comprender como un cierto factor altera la respuesta neurofisiológica y en qué magnitud. Aquí se han obtenido las concentraciones basales de GC únicamente y no pueden ser atribuidos a un factor

específico. De todas formas, es evidente que existe una tendencia a una reducida concentración de GC en la colonia “El Malecón” que puede estar relacionada con la presencia humana.

La reducida concentración de GC en la colonia “El Malecón” sugiere que esta población presenta señales de atenuación a los GC que pueden ser consecuencia del estrés crónico. Una reducida concentración de GC se puede atribuir a la pérdida de afinidad de los receptores GR a los GC ocasionados por la misma prolongación de una elevada concentración de hormonas adrenocorticales (Mizoguchi et al. 2003). Esto genera daños en la respuesta de retroalimentación negativa porque algunos receptores dejan de competir con los MR que permiten el retorno a la homeostasis (Moisan & Le Moal 2012). Alteraciones de las concentraciones de GC basales se han encontrado en ratones (Kotelevtsev et al. 1997) y humanos con depresión y estrés pos-traumático (Pariante & Miller 2001; Seckl & Meaney 2006).

Esto puede generar cambios en el comportamiento ya que el sistema autónomo nervioso ya no responde igual ante un repetido estímulo provocando habituación. Romero & Wikelski (2002) reportan resultados similares con Iguanas marinas, asimismo Walker et al. (2006) con los pingüinos de Magallanes, atribuyendo esto a la visitación turística regular y prolongada. La atenuación se refiere a la capacidad fisiológica mientras que la habituación se refiere a modificaciones en el comportamiento para facilitar la adaptación; y tanto las concentraciones de GC como el comportamiento de los lobos en las dos colonias es significativamente distinta (Fietz 2012; Obs. Personal), sin embargo esto requiere de mayor investigación.

Romero & Wikelski (2002) sugieren que a fin de amortiguar los efectos de la liberación excesiva de GC, las iguanas en el sitio turístico deben regular algunos aspectos de la vía de retroalimentación negativa y así evitar los efectos del estrés crónico. Eso se ve reflejado en reducidas concentraciones basales de cortisol y el tiempo de duración de la respuesta, frente a un estímulo agudo también es reducido (Romero & Wikelski 2010; Walker et al. 2006). Esto afecta la capacidad de los individuos a responder adecuadamente a nuevos factores impredecibles en términos fisiológicos y etológicos (Moisan & Le Moal 2012; Romero & Wikelski 2002; 2010). La atenuación ante los GC producen cambios en el comportamiento que afectan a la capacidad de la memoria de corto plazo y están relacionados con un incremento del miedo y en la agresividad (Fietz 2012; Mizoguchi et al. 2000).

Frente a la atenuación a los GC, muchos de los efectos patológicos se pueden revelar días, semanas o años *a posteriori*. (Moisan & Le Moal 2012). Las poblaciones silvestres en las Islas Galápagos, sin importar su nivel de exposición humana, son particularmente susceptibles a cambios ambientales. Las amenazas naturales pueden amplificar las consecuencias negativas del impacto humano (Montero-Serra et al. 2014).

Se ha reportado una secreción de GC es atenuada frente a la exposición de contaminantes mixtos: metales pesados, contaminantes organoclorados persistentes e hidrocarburos aromáticos poli-halogenados en los peces: *Perca flavescens* y *Esox lucius* (Hontela 1998); así como residuos de combustión de carbón en ranas como *Bufo terrestris* (Hopinks et al. 1999). Estos compuestos comparten las características de ser bio-acumulables, bio-magnificables y que incluso están ya presentes en distintas poblaciones de *Z.wollebaeki* a lo largo del archipiélago (Alava et al. 2011; Alava & Gobas 2012). La

contaminación en mares y océanos es facilitada a nivel global por el movimiento de las corrientes y Galápagos a pesar de su aislamiento, no está exento de recibir contaminantes globales.

A pesar de que los individuos no expresen señales visibles de padecimiento, su bienestar puede estar comprometido (Broom 1991) y esto puede verse reflejado en respuestas inmunológicas, índices de reproducción, supervivencia, patología y otros parámetros fisiológicos. Parámetros sanguíneos de hemoglobina, neutrófilos y monocitos de juveniles entre las mismas dos poblaciones han demostrado ser significativamente distintos y relacionados con la cohabitación humana (Brock et al. 2012; Martínez 2014). Brock et al. (2012) demostraron que la población de lobos marinos en Puerto Baquerizo Moreno tiene niveles elevados de anticuerpos comparados a una población aislada presente en la isla Santa Fe, que está aislada de un asentamiento humano.

Cuando el bienestar de un organismo se ve comprometido a menudo resulta en la iniciación de la inmunosupresión (Broom 1991, 2006; Griffin 1989). La prolongada exposición a elevadas concentraciones de GC reduce la concentración de leucocitos y linfocitos circulantes (Bennet et al. 2012; Broom 2006). Característica que es consistente con los parámetros sanguíneos observados por Martínez (2014) entre las mismas dos colonias. Así mismo, Guevara (2011) detectó presencia de *Leptospira*, asociado con el fracaso reproductivo (Burek 2005), en los lobos de Puerto Baquerizo Moreno. Levy et al. (2008) encontraron presencia de varios patógenos en gatos y perros domésticos en la isla de Isabela, entre ellos el virus del moquillo canino (CDV - por sus siglas en inglés) y otras infecciones por morbillivirus que han causado un alto número de mortalidades en distintas especies de pinnípedos (Alava & Salazar 2006; Osterhaus et al. 1989; Seguel et al.

2011) y se ha encontrado transmisión a varios mamíferos acuáticos (Visser et al. 1993). Ante un sistema inmune comprometido la presencia persistente y no correctamente controlada de contaminantes persistentes y patógenos introducidos presenta una amenaza grave al manejo de esta especie en peligro de extinción.

## 6. CONCLUSIONES

- Se logró identificar un metabolito indicador de Glucocorticoides Fecales de Cortisol para *Z.wollebaeki*: 72T (11-oxoaetiocholanolone) en ambas poblaciones.
- Las concentraciones nulas de cortisol efectivamete demuestran que este indicador no puede ser cuantificable en heces *Zalophus wollebaeki*.
- Diferencias en los niveles de ng(esteroide)/g(heces). entre las dos poblaciones sugiere que existe una variación en la respuesta fisiológica de los GC ante la presencia humana.

## 7. TABLAS

**Tabla 1 – Promedios de las concentraciones pg de Cortisol y 72T – Punta Pitt y el Malecón**

	Cortisol	72T
Punta Pitt	0	54.53
Malecón	0.02	20.2

**Tabla 2 – Prueba T-Student de logaritmos naturales de ng(esteroide)/g(heces) Punta Pitt y el Malecón.**

		Shapiro-Wilk normality test		Welch Two Sample t-test			95% Confidence Interval	
72T	N	W	Sig.	t	df	Sig.	Lower	Upper
Punta Pitt	40	0.981	0.738	2.875	77.992	0.0051	0.2161	1.1883
Malecón	40	0.922	0.008					

## 8. FIGURAS

Figura 1 – Histograma de pg Cortisol y 72T - Punta Pitt y el Malecón

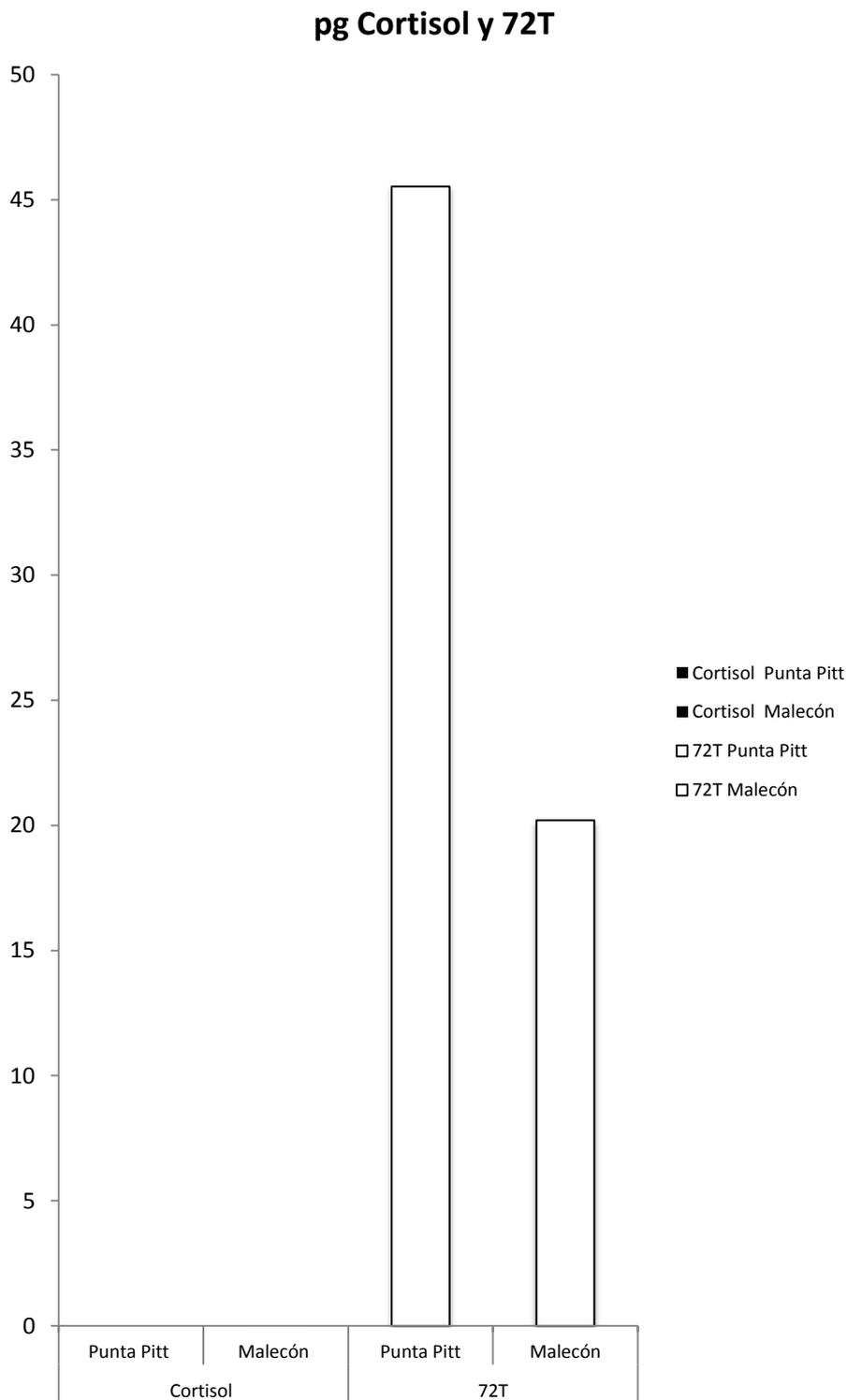


Figura 2 – Histograma de ng(esteroide)/g(heces) Punta Pitt y el Malecón

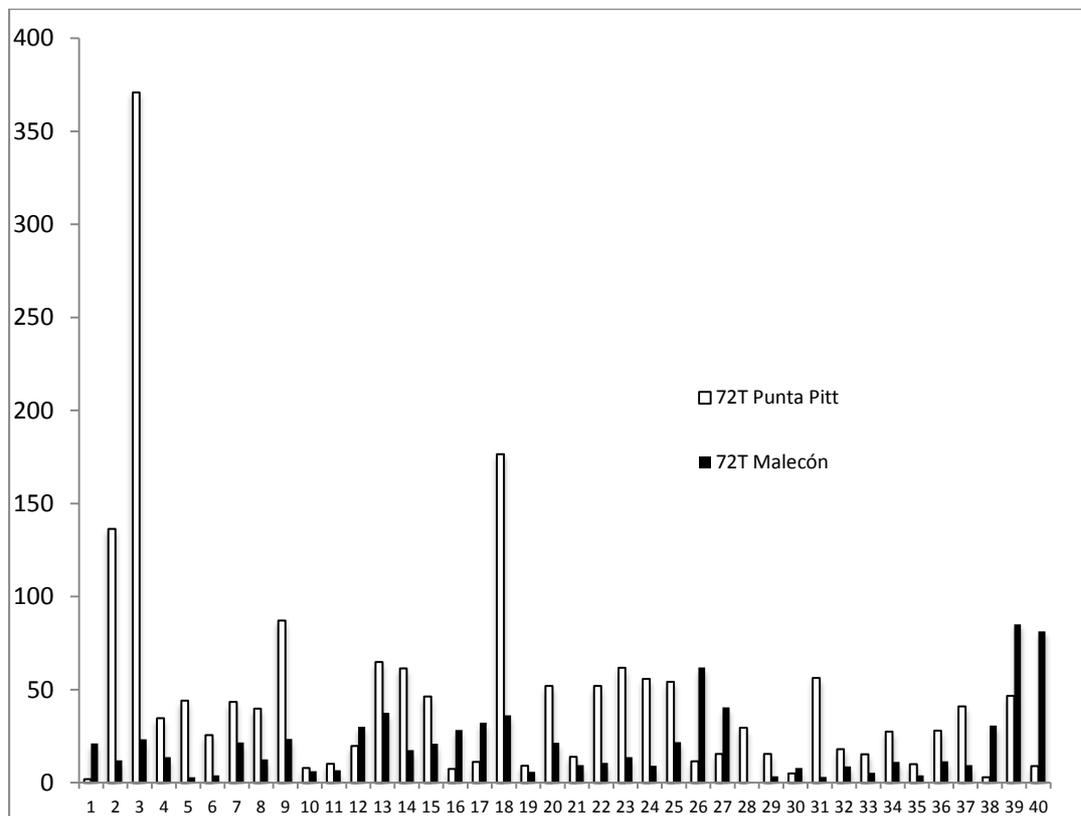


Figura 3a – Histograma de logaritmos naturales de  $\text{ng}(\text{esteroide})/\text{g}(\text{heces})$

**Punta Pitt**

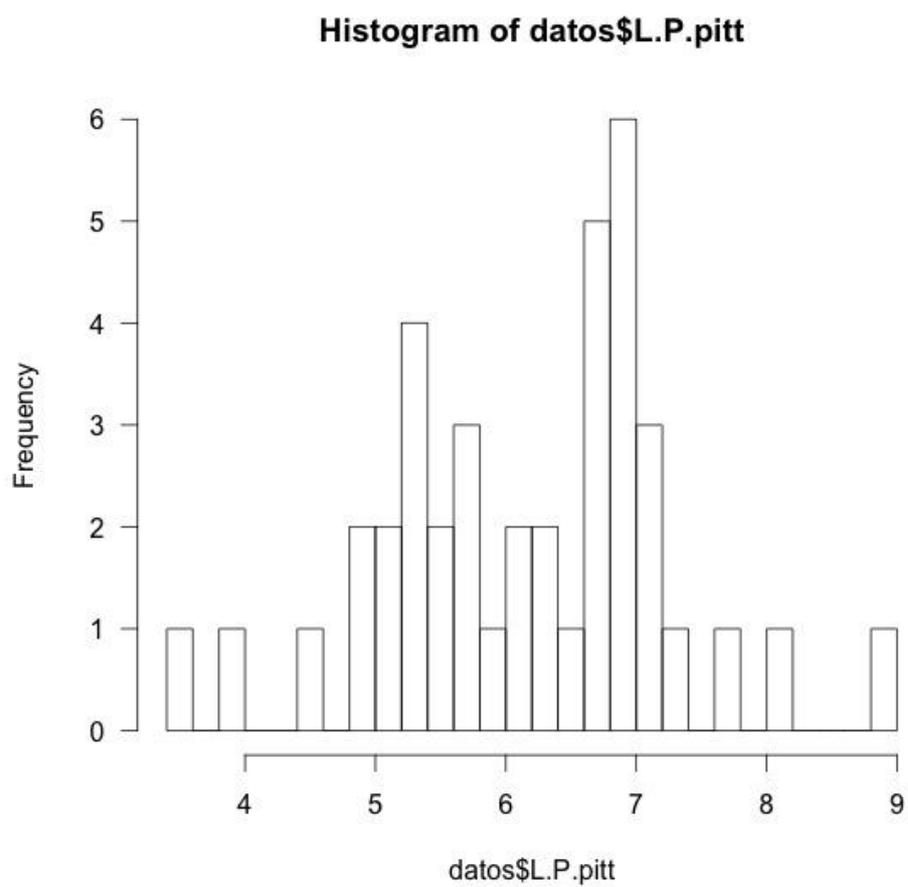


Figura 3b – Histograma de logaritmos naturales de ng(esteroide)/g(heces) el

Malecón

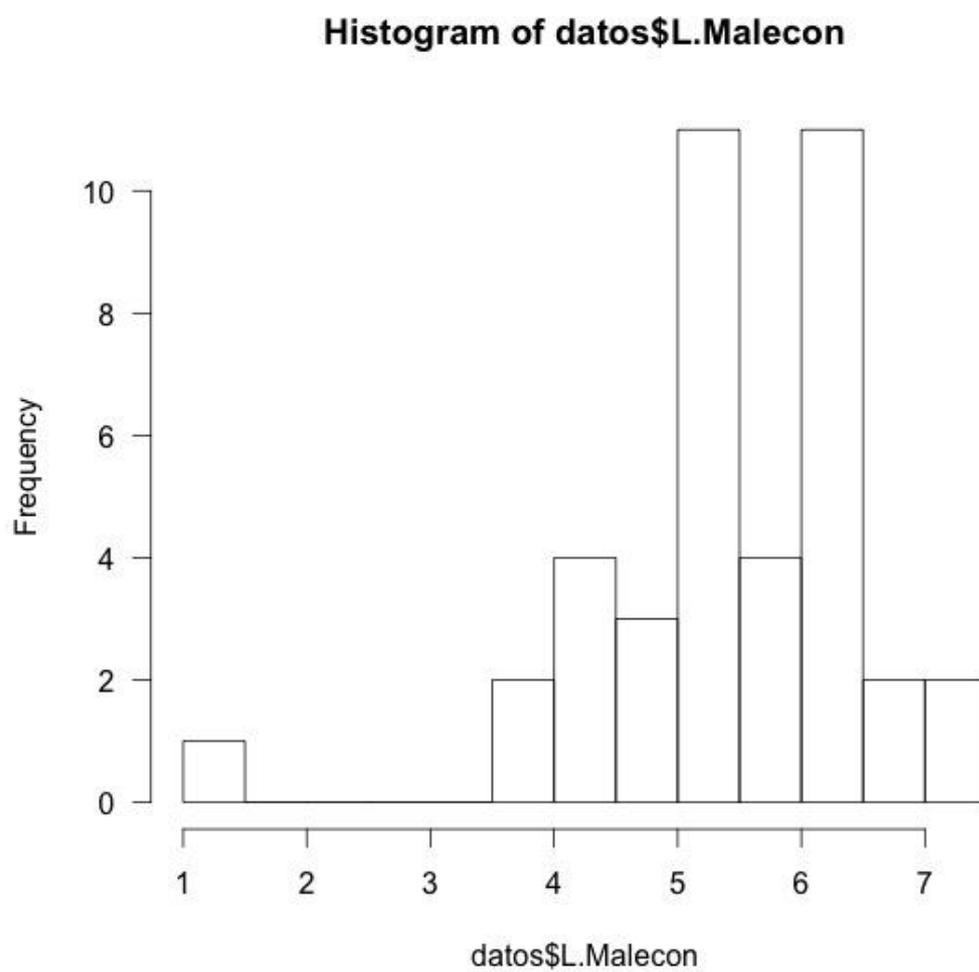
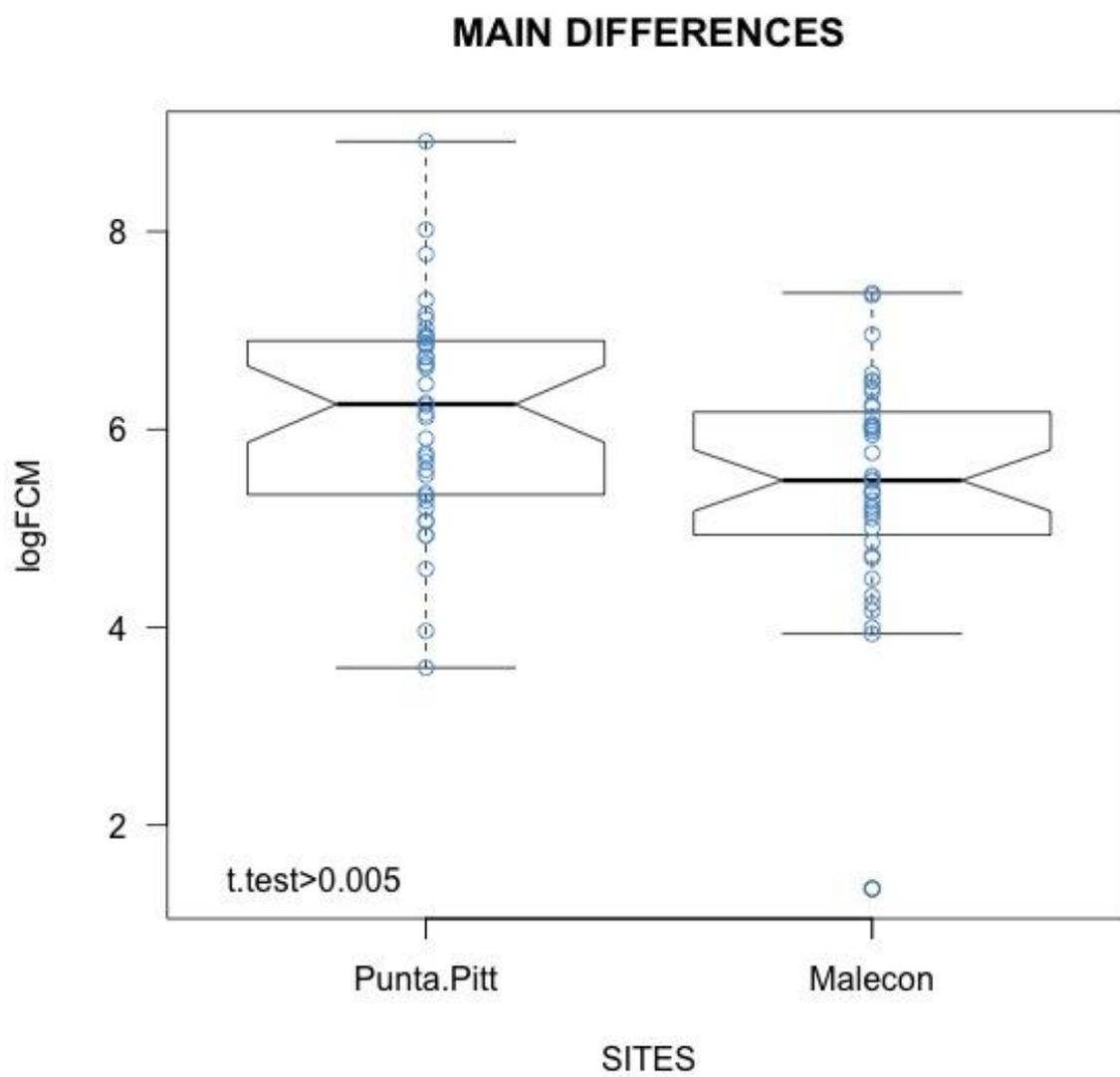
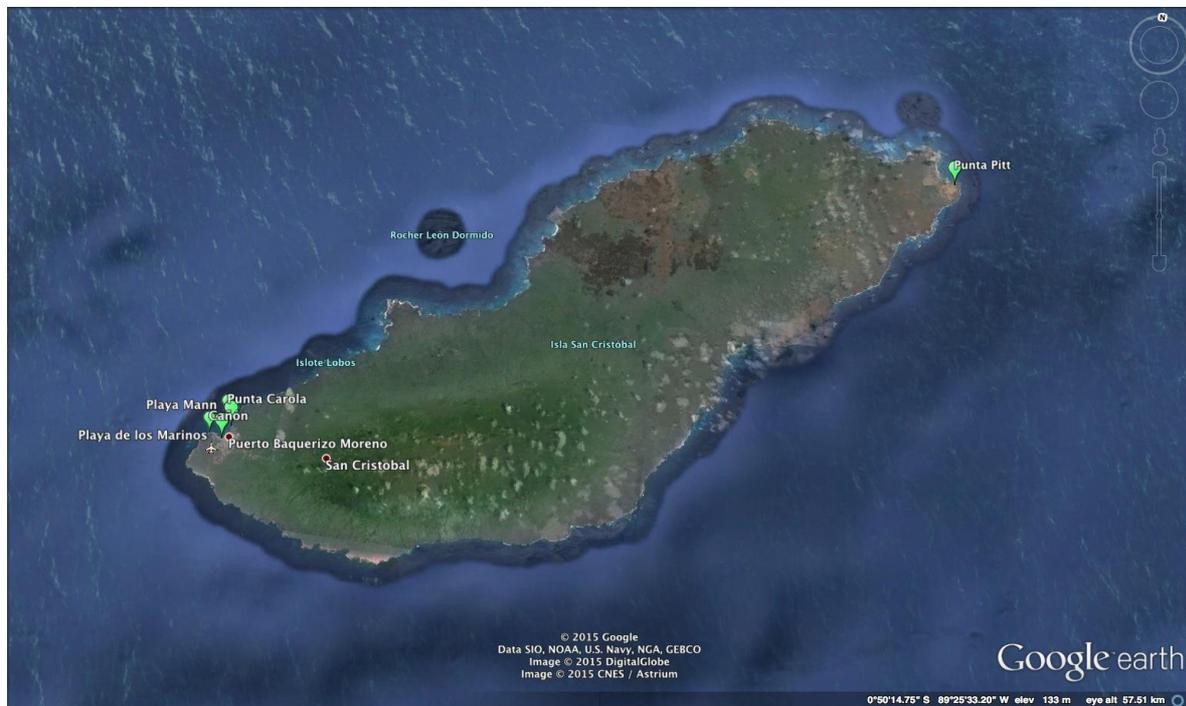


Figura 4 – Boxplot de logaritmos naturales de ng(esteroide)/g(heces) Punta Pitt y el Malecón



## 9. ANEXOS

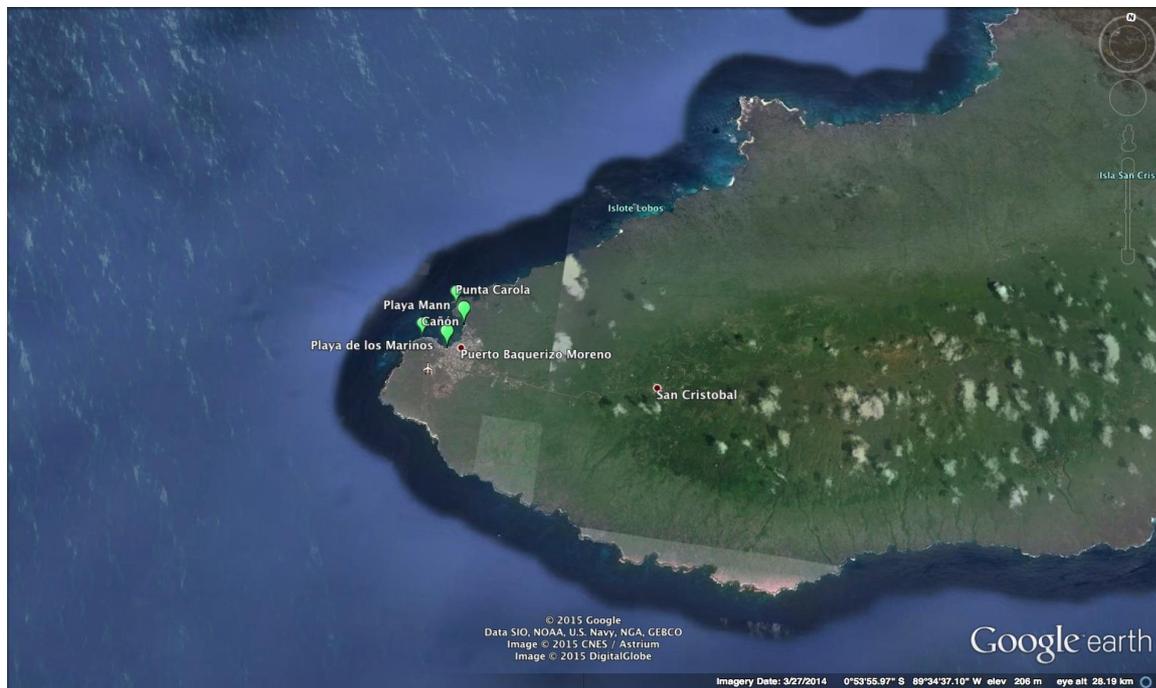
### Anexo 1 - Isla San Cristóbal.



### Anexo 2 - Mapa de Punta Pitt (Páez-Rosas 2015)



### Anexo 3 - Puerto Baquerizo Moreno y 4 localidades de toma de muestras



## 10. REFERENCIAS

Alava, J.J. & Gobas. 2012. Chapter 4: Assessing Biomagnification and Trophic Transport of Persistent Organic Pollutants in the Food Chain of the Galapagos Sea Lion (*Zalophus wollebaeki*): Conservation and Management Implications. Dr. Aldemaro Romero (Ed.). New Approaches to the Study of Marine Mammals, ISBN: 978-953-51-0844-3, InTech, DOI: 10.5772/51725. <http://www.intechopen.com/books/new-approaches-to-the-study-of-marine-mammals/assessing-biomagnification-and-trophic-transport-of-persistent-organic-pollutants-in-the-food-chain->. Consultado 23 Octubre 2015.

Alava, J.J. & Salazar, S. 2006. Status and Conservation of the Otariids in Ecuador and the Galápagos Islands. Sea Lions of the World. AK-SG-06-01. Pp. 495-519.

Alava, J.J., Palomera, C., Bendell, L. & Ross, P.S. 2014. Chapter 12: Pollution as an Emerging Threat for the Conservation of the Galapagos Marine Reserve: Environmental Impacts and Management Perspectives. Denkinger, J. & Vinueza, L. (Eds.) 2014. The Galapagos Marine Reserve, Social and Ecological Interactions in the Galapagos Islands. Pp. 247-293. Springer Science+Business Media. New York.

Bale, T.L., Baram, T.Z., Brown, A.S., Goldstein, J.M., Insel, T.R., McCarthy, M.M., Nemeroff, C.B., Reyes, T.M., Simerly, R.B., Susser, E.S. & Nestler, E.J. 2010. Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders. *Biological Psychiatry*. 68(4): 314-319.

BIO-TEK. 2015. ELx808 Absorbance Reader. [http://www.biotek.com/products/microplate\\_detection/elx808\\_absorbance\\_microplate\\_reader.html](http://www.biotek.com/products/microplate_detection/elx808_absorbance_microplate_reader.html). Consultado 29 Septiembre 2015.

Bennett, K.A. Moss, S.E.W., Pomeroy, P., Speakman, J.R. & Fedak, M.A. 2012. Effects of Handling Regime and Sex on Changes in Cortisol, Thyroid Hormones and Body Mass in Fasting Grey Seal Pups. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* (161): 69-76.

Brock, P.M., Hall, A.J., Goodman, S.J., Cruz, M. & Acevedo-Whitehouse, K. 2012. Applying the Tools of Ecological Immunology to Conservation: A test case in the Galapagos Sea Lion. *Animal Conservation*. doi:10.1111/j.1469-1795.2012.00567.x

Broom, D.M. 1991. Animal Welfare: Concepts and Measurement. *Journal of Animal Science*. 49:4167-4175.

Broom, D.M. 2006. Behaviour and Welfare in Relation to Pathology. *Applied Animal Behaviour Science*. 97:73-83.

Burbano, D.V., Mena, C.F., Guarderas, P., Vinueza, L. & Rec, G. 2014. Chapter 11: Shifting Baselines in the Galapagos White Fin Fishery, Using Fisher's Anecdotes to Reassess Fisheries Management: The Case of the Galapagos Grouper. Denkinger, J. & Vinueza, L. (Eds.) 2014. The Galapagos Marine Reserve, Social and Ecological Interactions in the Galapagos Islands. Pp. 227-246. Springer Science+Business Media. New York.

Burek, K.A., Gulland, F.M.D., Sheffield, G., Beckmen, K.B., Keyes, E., Spraker, T.R., Smith, A.W., Skilling, D.E., Evermann, J.F., Stott, J. L., Saliki, J.T. & Trites, A.W. 2005. Infectious Disease and the Decline of Steller Sea Lion (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA: Insights From Serologic Data. *Journal of Wildlife Diseases*. 41(3): 512-524.

Carenzi, C. & Verga, M. 2009. Animal Welfare: Review of the Scientific Concept and Definition. *Italian Animal Science*. 8(1):21-30.

Creel, S., Dantzer, B., Goymann, W. & Rubenstein, D.R. 2013. The Ecology of Stress: Effects of the Social Environment. *Functional Ecology*. 27:66-80.

Dantzer, B., McAdam, A.G., Palme, R., Fletcher, Q.E., Boutin, S., Humphries, M.M. & Boonstra, R. 2010. Fecal Cortisol Metabolite Levels in Free-Ranging North American Red Squirrels: Assay Validation and the Effects of Reproductive Condition. *General and Comparative Endocrinology*. 176:279-286.

DPNG-Dirección del Parque Nacional Galápagos. 2014. Statistics of Visitors in Galápagos. [http://www.galapagospark.org/onecol.php?page=turismo\\_estadisticas](http://www.galapagospark.org/onecol.php?page=turismo_estadisticas). Consultado 12 Octubre 2015.

Fietz, K. 2012. General Behavioural Patterns and Human Impact on Behaviour of the Galápagos Sea Lion (*Zalophus wolfebaeki*) on San Cristóbal, Galápagos. MSc. thesis Department of Animal Ecology and Conservation at the University of Hamburg, Germany.

Filipovic, D., Zlatkovic, J., Gass, P. & Inta D. 2013. The Differential Effects of Acute vs. Chronic Stress and their Combination on Hippocampal Parvalbumin and Inducible Heat Shock Protein 70 Expression. *Neuroscience*. 236:47-54.

González, J.A., Montes, C., Rodríguez, J. & Tapia, W. 2008. Rethinking the Galápagos Islands as a Complex Social-Ecological System: Implications for Conservation Management. *Ecology and Society* 13(2):13. <http://www.ecologyandsociety.org/vol13/iss2/art13/>. Consultado 13 Octubre 2015.

Goymann, W., Möstl, E., Van't Hof, T., East, M.L. & Hofer, H. 1999. Noninvasive Fecal Monitoring of Glucocorticoids in Spotted Hyenas, *Crocuta crocuta*. *General and Comparative Endocrinology*. 114:340-348.

Griffin, J.F.T. 1989. Stress & Immunity: A Unifying Concept. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 20:263-312.

Hill, S.P. & Broom, D.M. 2009. Measuring Zoo Animal Welfare: Theory and Practice. *Zoo Biology*. 28:531-544.

Hontela, A. 1998. Interrenal Dysfunction in Fish from Contaminated Sites: In Vivo and In Vitro Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17(1):44-48.

Hopkins, W.A., Mendonça, M.T. & Congdon, J.D. 1999. Responsiveness of the Hypothalamic-Pituitary-Interrenal Axis in an amphibian (*Bufo terrestris*) exposed to coal combustion wastes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 122(2):191-196.

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.

Kotelevtsev, Y., Holmes, M.C., Burchell, A., Houston, P.M., Schmoll, D., Jamieson, P., Best, R., Brown, R., Edwards, C.R.W., Seckl, J.R. & Mullins, J.J. 1997. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Knockout Mice Show Attenuated Glucocorticoid-Inducible Response and Resist Hyperglycemia on Obesity or Stress. *PNAS-Physiology*. 94:14924-14929.

Levy, J.K., Crawford, P.C., Lappin, M.R., Dubovi, E.J., Levy, M.G., Alleman, R., Tucker, S.J. & Clifford, E.L. 2008. Infectious Diseases of Dogs and Cats on Isabela Island, Galapagos. *Journal of Veterinary Medicine*. 22(1):60-65. Wiley Online Library. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2007.0034.x/full>. Consultado 23 Octubre 2015.

McLean, M. & Smith, R. 2001. Corticotrophin-releasing Hormone and Human Parturition. *Reproduction*. 121:493-501. <http://www.reproduction-online.org/content/121/4/493.long>. Consultado 30 Octubre 2015.

Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., Chui, D-H. & Tabira, T. 2000. Chronic Stress Induces Impairment of Spatial Working Memory Because of Prefrontal Dopaminergic Dysfunction. *Neuroscience*. 20(4):1568-1574.

Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M. & Tabira, T. 2003. Chronic Stress Attenuated Glucocorticoid Negative Feedback: Involvement of the Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Neuroscience*. 119:887-897.

Moisan, M-P. & Le Moal, M. 2012. Le Stress Dans Tous Ses États. *Médecine/Sciences*. 28:612-617. <http://www.medecinesciences.org/articles/medsci/pdf/2012/08/medsci2012286-7p612.pdf>. Consultado 12 Noviembre 2015.

Montero-Serra, I., Páez-Rosas, D., Murillo, J.C., Vegas-Vilarrúbia, T., Fietz, K. & Denzinger, J. 2014. Environment-Driven Changes in the Terrestrial Habitat Use and Distribution of the Galápagos Sea Lion. *Endangered Species Research*. 24:9-19.

Möstl, E., Messmann, S., Bagu, E., Robia, C. & Palme, R. 1997. Measurement of Glucocorticoid Metabolite Concentration in Faeces in Domestic Livestock. *Journal of Veterinary Medicine*. 46:621-631.

Möstl, E. & Palme, R. 2002. Hormones as Indicators of Stress. *Domestic Animal Endocrinology*. 23:67-74.

Osterhaus, A.D.M.E., Groen, J., Uytdehaag, F.G.C.M., Visser, I.K.G., Bildt, M.W.G.V.D., Bergman, A. & Klingeborn, B. 1989. Distemper Virus in Baikal Seals. *Nature*. 228:209-210.

Páez-Rosas, D. 2008. Diversificación de Dietas en Tres Colonias de Lobo Marino de Galápagos, *Zalophus wollebaeki*, evaluada con Análisis de Excretas e Isotopos Estables de C y N. Instituto Politécnico Nacional.  
<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/13910>. Consultado 3 Abril 2016.

Pariante, C.M. & Miller, A. 2001. Glucocorticoid Receptors in Major Depression: Relevance to Pathophysiology and Treatment. *Biological Psychiatry*. 49(5):391-404.

Palme, R. 2005. Measuring Fecal Steroids – Guidelines for Practical Application. *Annals of New York Academy of Sciences*. 1046:75-80.

Palme, R. 2014. Measuring Faecal Steroid Metabolites with Enzyme Immunoassay (EIA) on Microtitre Plates using Biotinylated Steroids as labels. Documento otorgado por Dr. R Palme en el Dept. Biomed. Sciences/Physiology. Veterinärplatz. Vienna, Austria.

Petrauskas, L., Atkinson, S., Gulland, F., Mellish, J. & Horning, M. 2008. Monitoring Glucocorticoid Response to Rehabilitation and Research Procedures in California and Steller Sea Lions. *Journal of Experimental Zoology*. 309A:73-82.

Romero, L.M. & Wikelski, M. 2002. Exposure to Tourism Reduces Stress-Induced Corticosterone Levels in Galápagos Marine Iguanas. *Biological Conservation*. 108:371-374.

Romero, L.M. & Wikelski, M. 2010. Stress Physiology as a Predictor of Survival in the Galápagos Marine Iguana. *Proceedings of the Royal Society*. 227:3157-3162.

Seguel, M., Pavés, H.J., Paredes, E. & Schlatter, R. 2011. Causes of mortality in South American Fur Sea Lions (*Arctocephalus australis gracilis*) at Guafo Island, Southern Chile (2004-2008). *Marine Mammal Science*. 29(1):36-47.

Sapolsky, R.M., Krey, L.C. & McEwen, B.S. 1986. The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis. *Endocrine Reviews*. 7(3):284-301.

Sapolsky, R.M., Romero, M. & Munck, A.U. 2000. How Do Glucocorticoids Influence Stress Response? Integrating Permissive, Suppressive Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews*. 21(1): 55-89.

Schatz, S. & Palme, R. 2001. Measuring Faecal Cortisol Metabolites in Cats and Dogs: A Non-Invasive Method for Evaluating Adrenocortical Function. *Veterinary Research Communications*. 25:271-287.

Seckl, J.R. & Meaney, M.J. 2006. Glucocorticoid "Programming" and PTSD Risk. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1071:351-378.

Seguel, M., Pavés, H.J., Paredes, E. & Schlatter, R. 2011. Causes of mortality in South American Fur Sea Lions (*Arctocephalus australis gracilis*) at Guafo Island, Southern Chile (2004-2008). *Marine Mammal Science*. 29(1):36-47.

Sigma-Aldrich. 2015. Protein A from *Staphylococcus aureus*. P-7837. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p7837?lang=en&region=EC>. Consultado 27 Septiembre 2015.

Sigma-Aldrich. 2015. Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 Flat Plate. M9410. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m9410?lang=en&region=EC>. Consultado 27 Septiembre 2015.

Sigma-Aldrich. 2015. Streptavidin-POD-Conjugate. Roche 11089153001. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11089153001?lang=en&region=EC>. Consultado 29 Septiembre 2015.

Smith, S.M. & Vale, W.W. 2006. The Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Neuroendocrine Responses to Stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 8(4):383-395. NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3181830/>. Consultado 21 Noviembre 2015.

Taylor, J.E., Dyer, G.A., Stewart, M., Yunez-Naude, A. & Ardila, S. 2003. The Economics of Ecotourism: A Galápagos Islands Economy-Wide Perspective. *Economic Development and Social Change*. 51(4):977-997.

Touma, C. & Palme, R. 2005. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. *Annals of New York Academy of Sciences*. 1046:54-74.

Trillmich, F., Jeglinski, W.E., Meise, K. & Piedrahita, P. 2014. Chapter 3: The Galapagos Sea Lion: Adaptation to Spatial and Temporal Diversity of Marine Resources Within the Archipelago. Denkinger, J. & Vinuesa, L. (Eds.) 2014. *The Galapagos Marine Reserve, Social and Ecological Interactions in the Galapagos Islands*. Pp. 61-70. Springer Science+Business Media. New York.

Trillmich, F. 2015. *Zalophus wollebaeki*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T41668A45230540 <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T41668A45230540.en>. Consultado 12 October 2015.

UNESCO. 2014. Convention Concerning the Protection of the World Cultural and Natural Heritage. World Heritage Committee. WHC-14/38.COM/7B. Pp. 136-138. <http://whc.unesco.org/archive/2014/whc14-38com-7B-en.pdf>. Consultado 13 Octubre 2015.

UNESCO. 2015. The Galápagos Islands. World Heritage Convention. <http://whc.unesco.org/en/list/1>. Consultado 12 Octubre 2015.

Visser, I.K.G., van Bressema, M.f., Barrett, T. & Osterhaus, A.D.M.E. 1993. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Vet Res.* 24:169-178.

Walker, B.G., Boersma, P.D. & Wingfield, J.C. 2006. Habituation of Adult Mallegenic Penguins to Human Visitation as Expressed through Behaviour and Corticosterone Secretion. *Conservation Biology.* 20(1):146-154.

Walsh, S.J., McCleary, A.L., Heumann, B.W. & Brewington, L. 2010. Community Expansion and Infrastructure Development: Implications for Human Health and Environmental Quality in the Galápagos Islands of Ecuador. *Journal of Latin American Geography* 9(3):137-159.