



Universidad  
Católica de  
Valencia  
San Vicente Mártir

TFG

**TRABAJO FIN DE GRADO**

---

**GRADO EN  
VETERINARIA**

# **Evaluación del estrés en conejos silvestres mediante la determinación de la concentración de corticosterona.**

Alumna: Marta Zapata Pascual  
Tutora: Alba Rodríguez Mengod  
Curso académico: 2023/2024



Facultad de Veterinaria  
y Ciencias Experimentales  
Universidad Católica de Valencia  
San Vicente Mártir

Marta Zapata Pascual

Evaluación del estrés en conejos silvestres  
mediante la determinación de la concentración de corticosterona.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han guiado y apoyado durante la realización de este Trabajo Final de Grado.

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento a mi tutora, Alba Rodríguez, por haber confiado en mí y por su paciencia, orientación y apoyo constante durante toda la realización de este trabajo.

En segundo lugar, a los profesores Iris García y Jose Sansano por su ayuda en la recolección de las muestras y datos necesarios para llevar a cabo el estudio, y a Carlos Minguez por su asesoramiento en el análisis estadístico.

En tercer lugar, a mis amigos por su constante motivación y comprensión a lo largo de la carrera.

Y por último, a Pablo y a mi familia por su amor incondicional, paciencia y apoyo constante. Sin ellos, no hubiera sido posible terminar esta carrera tan bonita.

Marta Zapata Pascual

Evaluación del estrés en conejos silvestres  
mediante la determinación de la concentración de corticosterona.

## Índice de contenidos.

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 El conejo europeo. ....	3
1.2 Amenazas del conejo europeo en España.....	5
1.2.1 La mixomatosis.....	6
1.2.2 La enfermedad vírica hemorrágica. ....	6
1.2.3 La caza.....	7
1.2.4 La depredación. ....	9
1.3 El bienestar animal y el estrés en el conejo. ....	9
1.3.1 El bienestar animal.....	10
1.3.2 El estrés.....	10
1.4 Evaluación del estrés en el conejo.....	12
1.5 Determinación de la corticosterona en suero para evaluar el estrés.....	14
2. OBJETIVOS .....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	16
3.1 Población de estudio.....	16
3.2 Muestreo .....	16
3.3 Método de análisis .....	18
3.4 Análisis estadístico. ....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
4.1 Influencia del tipo de captura en la concentración de corticosterona. ....	27
4.2 Influencia de la estación del año en la concentración de corticosterona. ....	29
4.3 Influencia del año de captura en la concentración de corticosterona. ....	30
4.4 Influencia de la mixomatosis y la EVH en la concentración de corticosterona. ....	31
4.5 Influencia de la zona geográfica en la concentración de corticosterona.....	34
4.6 Influencia del sexo en la concentración de corticosterona.....	36
4.7 Influencia de la edad en la concentración de corticosterona. ....	36
5. CONCLUSIONES .....	38
6. BIBLIOGRAFÍA.....	39

Marta Zapata Pascual

Evaluación del estrés en conejos silvestres  
mediante la determinación de la concentración de corticosterona.

**Índice de figuras.**

<b>Figura 1.</b> .....	3
Ejemplar de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (Villafuerte y Delibes Mateos, 2019). .....	3
<b>Figura 2.</b> .....	4
Distribución del conejo europeo en España. Fuente (miteco.gob.es).....	4
<b>Figura 3.</b> .....	8
Capturas de especies cinegéticas en los últimos 8 años en España. (Estadística Anual de Caza, 2019).....	8
<b>Figura 4.</b> .....	8
Porcentaje de las capturas de especies de caza menor de mamíferos en España. Adaptado de: (Estadística Anual de Caza, 2019) .....	8
<b>Figura 5.</b> .....	11
Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal. Elaboración propia.....	11
<b>Figura 6.</b> .....	12
Indicadores invasivos y no invasivos para medir el estrés en los animales. Adaptado de: (Sanmiguel Plazas et al., 2017) .....	12
<b>Figura 7.</b> .....	16
Mapa de las zonas de muestreo de este estudio. ....	16
<b>Figura 8.</b> .....	18
Esquema del ELISA competitivo directo del estudio. Adaptado de: (Mercader et al., 2020) .....	18
<b>Figura 9.</b> .....	19
Kit ELISA (AB108821) y los reactivos preparados .....	19
<b>Figura 10.</b> .....	21
Agregación de la solución de parada a la microplaca y posterior cambio de color de azul a amarillo. ....	21
<b>Figura 11.</b> .....	21
Diagrama de flujo del procedimiento siguiendo las indicaciones del laboratorio Abcam. ....	21
<b>Figura 12.</b> .....	22
Lectura de las absorbancias en el lector de microplacas.....	22
<b>Figura 13.</b> .....	23
Curva patrón representada en un gráfico de dispersión. ....	23
<b>Figura 14.</b> .....	28
Porcentaje de muestras en función del método de captura. ....	28
<b>Figura 15.</b> .....	29
Porcentaje de muestras en función de la estación del año .....	29
<b>Figura 16.</b> .....	31
Porcentaje de muestras en función del año. ....	31
<b>Figura 17.</b> .....	32
Porcentaje de muestras positivas a mixomatosis en función de la edad. ....	32
<b>Figura 18.</b> .....	33
Porcentaje de muestras positivas a EVH en función de la edad. ....	33
<b>Figura 19.</b> .....	35
Porcentaje de muestras en función de la zona geográfica. ....	35
<b>Figura 20.</b> .....	37
Porcentaje de muestras en función de la edad. ....	37

Marta Zapata Pascual

Evaluación del estrés en conejos silvestres  
mediante la determinación de la concentración de corticosterona.

**Índice de tablas.**

<b>Tabla 1.</b> .....	
Número de muestras en función de cada variable. ....	17
<b>Tabla 2.</b> .....	
Concentración de corticosterona obtenidas de la preparación estándar. ....	20
<b>Tabla 3.</b> .....	
Datos empleados para la obtención de la curva patrón que relacionan la concentración de corticosterona con la absorbancia de las muestras. ....	22
<b>Tabla 4.</b> .....	
Resultados estadísticos del análisis descriptivo de corticosterona .....	25
<b>Tabla 5.</b> .....	
Influencia del tipo de captura en la concentración de corticosterona. ....	27
<b>Tabla 6.</b> .....	
Influencia de la estación del año en la concentración de corticosterona. ....	29
<b>Tabla 7.</b> .....	
Influencia del año de captura en la concentración de corticosterona. ....	30
<b>Tabla 8.</b> .....	
Influencia de la mixomatosis en la concentración de corticosterona. ....	31
<b>Tabla 9.</b> .....	
Influencia de la EVH en la concentración de corticosterona. ....	32
<b>Tabla 10.</b> .....	
Influencia de la zona geográfica en la concentración de corticosterona. ....	34
<b>Tabla 11.</b> .....	
Influencia del sexo en la concentración de corticosterona. ....	36
<b>Tabla 12.</b> .....	
Influencia de la edad en la concentración de corticosterona. ....	36

Marta Zapata Pascual

Evaluación del estrés en conejos silvestres  
mediante la determinación de la concentración de corticosterona.

## **RESUMEN**

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie clave en los ecosistemas mediterráneos de la Península Ibérica. En España, los principales factores de mortalidad para la especie son las enfermedades, la depredación y la caza. Cuando un animal se encuentra en un estado de estrés, se observan unas respuestas fisiológicas típicas, como la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y del sistema nervioso autónomo, lo que a su vez conduce a la liberación de glucocorticoesteroides y catecolaminas. Para evaluar las respuestas fisiológicas al estrés, se utilizan indicadores invasivos y no invasivos. El objetivo del presente trabajo es determinar la concentración de corticosterona en muestras de suero de conejos europeos. Secundariamente, se ha evaluado cómo influyen los diferentes factores en la concentración de corticosterona. Para el análisis de las muestras, se ha utilizado un Kit ELISA y se han obtenido los resultados mediante un análisis estadístico. El valor medio de corticosterona analizado en las 93 muestras ha sido de 4.1138 ng/ml. Se ha observado una discordancia con los valores de referencia. Los parámetros que influyen en la concentración de corticosterona han sido, las zonas geográficas y el método de captura. Los animales capturados por trampeo tienen concentraciones de corticosterona superiores al método de abatimiento. Los parámetros que no influyen han sido la edad, el sexo, el año, la mixomatosis, la enfermedad vírica hemorrágica y la estación del año. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, sería recomendable utilizar un kit ELISA específico y que el número de muestras obtenidas de cada parámetro fuese homogéneo.

**Palabras clave:** *Estrés, bienestar animal, conejo europeo, Oryctolagus cuniculus, corticosterona, ELISA.*

**ABSTRACT**

The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is a keystone species in the Mediterranean ecosystems of the Iberian Peninsula. In Spain, the main mortality factors for the species are diseases, predation, and hunting. In situations where an animal is stressed, typical physiological responses are observed, such as the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the autonomic nervous system, which in turn leads to the release of glucocorticoids and catecholamines. In order to evaluate physiological responses to stress, invasive and non-invasive indicators are used. The aim of the present work is to determine the concentration of corticosterone in serum samples of European rabbits. Secondly, the influence of different factors on corticosterone concentration has been assessed. Consequently, ELISA kit was used to analyse the samples, whereas the results were evaluated by statistical analysis. The mean value of corticosterone analyzed in the 93 samples was 4.1138 ng/ml. Thus, a discrepancy with the reference values was observed. The parameters influencing corticosterone concentration were the geographical areas and the trapping method. Animals captured by trapping had higher corticosterone concentrations than those captured by the trapping method. The parameters not influencing this corticosterone concentration were age, sex, year, myxomatosis, viral hemorrhagic disease, and the time of the year. Taking into account the results obtained, it would be advisable to use a specific ELISA kit and a homogeneous number of samples for each parameter.

**Key words:** *Stress, animal welfare, European rabbit, Oryctolagus cuniculus, corticosterone, ELISA.*

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El conejo europeo.

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie importante en los ecosistemas mediterráneos de la Península Ibérica y se considera una especie ecológicamente plástica, es decir, tiene la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes adversos (Lombardi et al., 2003). Es la presa fundamental de una amplia variedad de depredadores, como el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) y el lince ibérico (*Lynx pardinus*). El conejo contribuye al aumento de la diversidad de las plantas debido a su acción de pastoreo y de dispersión de semillas, crea madrigueras que sirven de refugio para numerosas especies de vertebrados e invertebrados, además de mejorar la calidad del suelo con sus deyecciones (Delibes Mateos y Gálvez Bravo, 2009)

El conejo europeo es un pequeño mamífero de la familia Leporidae, del orden lagomorfos, mide hasta 50 cm y su peso medio es de 2.5 kg, se caracteriza por un pelaje pardo-grisáceo y un rabo corto, con potentes extremidades posteriores para la carrera y grandes orejas, se puede observar en la figura 1. Las crías, los juveniles y los adultos son iguales, excepto por su tamaño. Es una especie exenta de dimorfismo sexual (Gálvez Bravo, 2017).

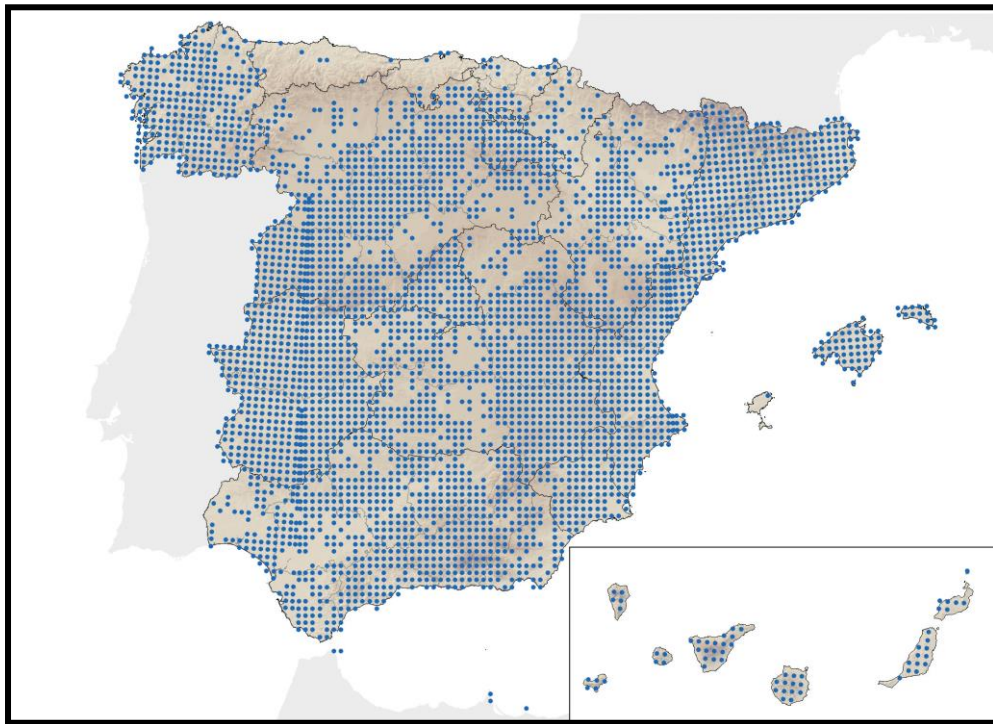
El conejo se distribuye geográficamente por toda la Península Ibérica. Su amplia distribución se debe a sus elevadas tasas de crecimiento poblacional y a su gran capacidad reproductiva (Lombardi et al., 2003).



**Figura 1.**

Ejemplar de *Oryctolagus cuniculus* (Villafuerte y Delibes Mateos, 2019).

La calidad del hábitat para el conejo está determinada por la presencia de áreas cultivadas con un relieve que va desde llano a medianamente ondulado, zonas con una altitud inferior a 1.500 metros y de clima mediterráneo. Este clima está caracterizado por ser árido y cálido, con un sustrato que facilita la formación de madrigueras (Villafuerte y Delibes Mateos, 2019). En la figura 2, se observa la distribución del conejo europeo en España.



**Figura 2.**  
Distribución del conejo europeo en España. (miteco.gob.es)

Los conejos tienen una gran plasticidad a la hora de seleccionar el alimento, adaptándose a la disponibilidad según la estación del año o el hábitat, y seleccionan las plantas según su estado fenológico, es decir, según los cambios estacionales. En invierno y en primavera, los conejos seleccionan las partes vegetativas de las gramíneas y en verano, cuando la vegetación herbácea es escasa, consumen las inflorescencias, frutos o la corteza de los árboles. Estos animales seleccionan las plantas más nutritivas, como las leguminosas, ricas en nitrógeno (Gálvez Bravo, 2017). Los conejos tienen un sistema nutricional llamado cecotrofia, que les permite maximizar la absorción de nutrientes mediante la ingesta de productos microbianos del ciego, heces blandas que se denominan cecotrofos. Mediante la cecotrofia, un conejo obtiene una gran cantidad de aminoácidos y vitaminas hidrosolubles y hasta un 20% de sus necesidades de proteína bruta diarias (Hanieh y Sakaguchi, 2009).

El conejo es un r-estratega, es decir, se considera una especie con altas tasas reproductivas, lo que a su vez compensa las tasas de mortalidad por depredación y/o enfermedades. Las hembras pueden gestar entre 3 y 7 veces al año, y su número medio de crías por camada se encuentra entre 2 y 6 (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente [MAPAMA], 2017) con un periodo de gestación entre 31 y 33 días (Castellini et al., 2010).

Las poblaciones de conejos experimentan cambios a lo largo del año debido a las características de su ciclo reproductivo. El pico de máxima actividad reproductiva ocurre a finales de primavera y a principios de verano, posteriormente, la población va disminuyendo hasta alcanzar los mínimos en otoño. Durante el invierno, las poblaciones se recuperan a medida que comienza el proceso reproductivo (Beltran y Delibes, 1991).

El conejo se encuentra estructurado en complejos grupos sociales poligámicos, con un macho dominante y varias hembras reproductoras, junto con juveniles y otros machos subordinados (MAPAMA, 2017). Aunque ambos sexos defienden el territorio, los machos compiten por el acceso a las hembras y estas por el uso de las madrigueras (Gálvez Bravo, 2017).

En un hábitat favorable, la estructura social de los conejos es más flexible, las jerarquías son menos evidentes y los juveniles tienen una tasa de supervivencia mayor. Cuando el hábitat se vuelve desfavorable y no es capaz de satisfacer las necesidades de la población, los conejos tienen una estructura social más rígida, con una mayor competencia entre los recursos disponibles (J. C. Wilson et al., 2002).

## **1.2 Amenazas del conejo europeo en España.**

La conservación del conejo europeo es bastante singular. Existen zonas donde está considerado una especie amenazada y otras donde es una amenaza exótica y destructiva. Se encuentran dificultades para conservar la especie en su hábitat original y, al mismo tiempo, para erradicarla en zonas donde ha sido introducida (Lees y Bell, 2008).

En España, las enfermedades como la mixomatosis y la enfermedad vírica hemorrágica (EVH), la depredación y la caza son los principales factores de mortalidad para la especie (MAPAMA, 2017). En la última actualización de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), el conejo europeo es catalogado como una especie en peligro de extinción (Villafuerte y Delibes Mateos, 2019).

### **1.2.1 La mixomatosis.**

La mixomatosis es una enfermedad vírica y letal causada por el virus Myxoma, un poxvirus, miembro de la familia *Poxviridae* (Organización Mundial de Sanidad Animal [OMSA], 2017). Afecta a los conejos europeos y a otras especies de lagomorfos como es la liebre europea (*Lepus europaeus*). Cabe destacar que no es una enfermedad zoonótica (MAPAMA, 2022).

Se han identificado dos formas de presentación de la enfermedad: la forma nodular (clásica) y la forma amixomatosa (respiratoria). La mixomatosis nodular aparece principalmente en conejos salvajes, en explotaciones cunícolas pequeñas y en las mascotas. Esta enfermedad está caracterizada por la aparición de lesiones cutáneas junto con una disfunción inmunitaria, e infecciones bacterianas secundarias debido a microorganismos procedentes del tracto respiratorio. La muerte del animal se produce entre el octavo y el quinceavo día tras la infección. La forma amixomatosa presenta una sintomatología sobre todo respiratoria, junto con fiebre y lesiones cutáneas características en el punto de inoculación, aunque más pequeñas que la forma anterior, además de otros signos como la hinchazón palpebral, blefaroconjuntivitis, rinitis y el edema perineal. Esta forma es más destacada en conejos de producción (OMSA, 2017). La transmisión de la enfermedad puede ser, por vía directa, a través del contacto entre animales enfermos y susceptibles, o por vía indirecta por medio de artrópodos hematófagos que actúan como vectores (MAPAMA, 2022).

### **1.2.2 La enfermedad vírica hemorrágica.**

La EVH, es una hepatitis muy contagiosa de lepóridos, causada por un calicivirus de la familia Caliciviridae. El conejo europeo es la única especie hospedadora y susceptible de este virus, cabe destacar que no es una enfermedad zoonótica. Está caracterizada por una alta morbilidad y mortalidad (OMSA, 2023).

El periodo de incubación de la EVH varía entre 1 y 3 días. Los principales signos clínicos son, en los casos agudos, una fiebre alta (>40 °C) junto con chillidos terminales como únicos signos clínicos, seguidos de un colapso rápido y muerte en las 12 a 36 horas posteriores a su aparición. La EVH crónica es subclínica, caracterizada por ictericia generalizada, letargo y pérdida de peso. Los conejos suelen morir la primera o segunda semana postinfección, pero algunos sobreviven después de la seroconversión. En los conejos menores de 4 a 6 semanas de edad, la infección es subclínica. La transmisión es por contacto directo a través de conejos infectados o vectores mecánicos (insectos, aves o humanos) o utensilios y equipos contaminados (OMSA, 2023).

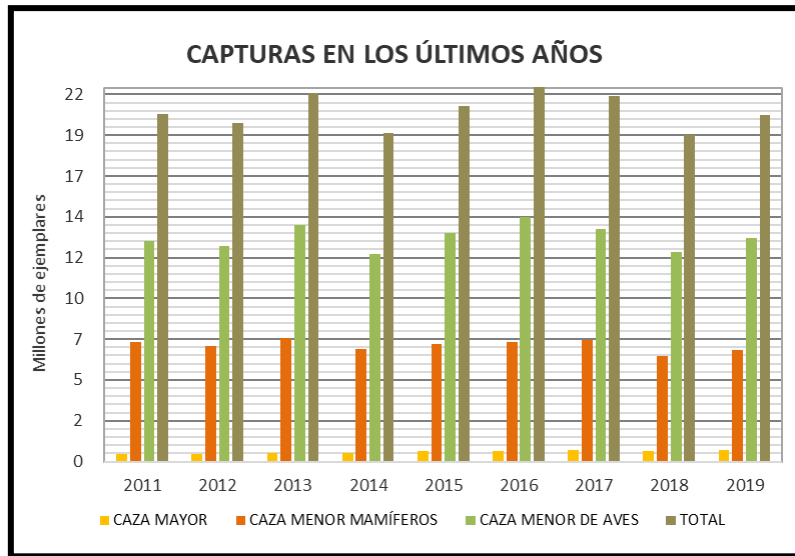
### 1.2.3 La caza.

El conejo constituye un componente fundamental de la dieta de los habitantes de la Península Ibérica desde el Paleolítico hasta la actualidad. Es una de las principales especies de caza menor junto con la perdiz roja (*Alectoris rufa*). A pesar de que existe un declive poblacional, es una de las especies con mayor número de individuos abatidos en España (Delibes Mateos y Gálvez Bravo, 2009).

La actividad cinegética es una forma de explotación de la fauna, ya sea como una fuente de alimento o como ocio. Se considera un recurso natural y renovable (Arroyo et al., 2013), además de uno de los principales sustentos de la economía rural en España. Las comunidades autónomas gestionan los cotos y reservas de caza, además de proporcionar las licencias necesarias para cazar (Estadística Anual de Caza, 2019).

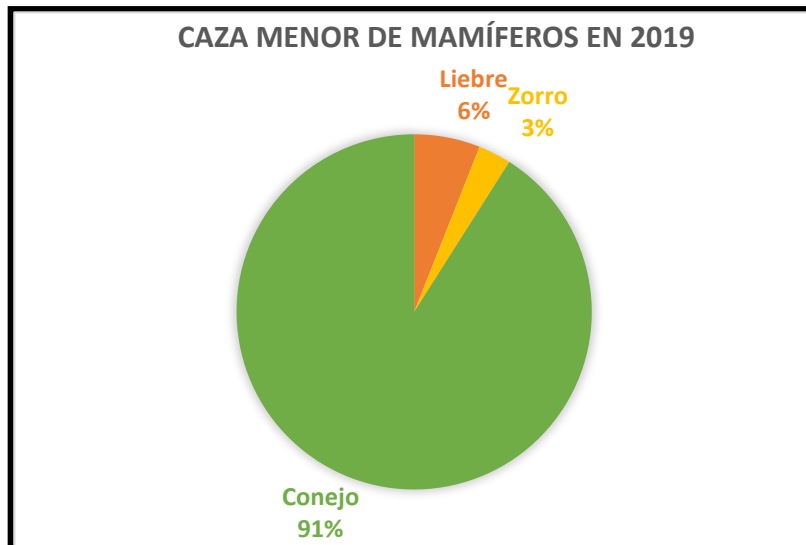
Cada comunidad autónoma emite anualmente una autorización de caza, donde se determina el inicio y fin de la temporada de caza, así como los días de la semana en los que está permitida esta actividad. La temporada de caza del conejo y otras especies de caza menor ocurre entre otoño y principios de invierno. Dependiendo de la comunidad autónoma, puede existir una temporada estival de caza de conejos, considerándose un método de control poblacional para evitar daños en los cultivos (Ríos-Saldaña et al., 2013). Para garantizar una caza sostenible, existen los planes técnicos cinegéticos, elaborados por los cazadores y revisados cada 4 o 5 años por las direcciones provinciales de caza, las cuales aprueban todas las normas cinegéticas y las medidas de gestión propuestas por los cazadores (Piorno et al., 2020).

Las principales modalidades que se practican en la caza del conejo son la caza en mano, al salto, el descaste en verano (sin perro), con hurón o de espera (Real Federación Española de Caza, 2023). En la figura 3, se muestra cómo han evolucionado las capturas de animales según el tipo de caza: caza mayor, caza menor de mamíferos como el conejo y caza menor de aves, desde el año 2011 hasta el 2019. Se observa, respecto a 2018, un aumento en la caza mayor y en la caza menor de mamíferos y de aves (Estadística Anual de Caza, 2019). En la figura 4, se observa que la mayoría de las capturas de caza menor corresponden al conejo (91%), seguidas de la liebre (6%) y, por último, del zorro (3%).



**Figura 3.**

Capturas de especies cinegéticas en los últimos 8 años en España. (Estadística Anual de Caza, 2019)



**Figura 4.**

Porcentaje de las capturas de especies de caza menor de mamíferos en España. Adaptado de: (Estadística Anual de Caza, 2019)

#### **1.2.4 La depredación.**

El conejo es una especie clave de la Península Ibérica y constituye una presa básica para muchos depredadores (Piorno et al., 2020), siendo muy gratificante debido a su apropiado tamaño para grandes carnívoros y a su relativa facilidad de captura (Fernández de Simón et al., 2014). En España, la mayoría de los depredadores son diurnos y visibles (Tobajas et al., 2024), aunque también hay nocturnos como el búho real (Fernández de Simón et al., 2014), lo que genera un riesgo de depredación constante para el conejo, que disminuye en las últimas horas del día. Los conejos son capaces de regular su conducta según el tipo de riesgo de depredación que perciben, ya sea por aire o desde el suelo (Tobajas et al., 2024).

Es difícil saber cómo afecta la depredación de forma aislada en las poblaciones de especies presa, porque la reproducción y la supervivencia dependen de una gran variedad de factores, como el estado del hábitat, la calidad del alimento o las enfermedades. Se debe tener en cuenta que la depredación afecta a la abundancia de presas y a cómo evoluciona una especie. Si existe una disminución muy significativa de una población, la depredación podría limitar su recuperación (Tobajas et al., 2020).

#### **1.3 El bienestar animal y el estrés en el conejo.**

Cuando un animal se encuentra en un estado de estrés, la homeostasis se ve amenazada y se produce un desequilibrio entre el entorno ideal que debería tener el animal y su entorno real. Además, se pueden observar respuestas fisiológicas típicas a los factores estresantes, como son la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y del sistema nervioso autónomo, lo que a su vez conduce a la liberación de glucocorticoesteroides y catecolaminas. En cambio, si el animal se encuentra en un estado de bienestar, es capaz de adaptarse a los cambios fácilmente y se encuentra en un estado de adaptación sin sufrimiento. Cuando el bienestar es escaso, el animal comienza a tener dificultades para poder afrontar la situación. Ambos conceptos están relacionados, pero hay que tener en cuenta que el bienestar animal no se puede considerar si existen condiciones de estrés y viceversa (Veissier y Boissy, 2007).

### **1.3.1 El bienestar animal.**

Según la OMSA (2024) se considera que existe bienestar animal cuando un animal tiene las cinco libertades cubiertas: está exento de hambre, sed y desnutrición. El animal no tiene temor ni angustia, no sufre molestias físicas ni térmicas y, por tanto, no tiene dolor, ni lesiones, ni enfermedades. Además, es capaz de manifestar de forma libre su comportamiento natural.

En los últimos años, el interés por el bienestar de los conejos ha aumentado en la mayoría de los profesionales relacionados con la especie cunícola. Para estudiar la etología de la especie, se utiliza la forma silvestre como “modelo ideal de comportamiento”. Esta situación no se observa en ninguna de las otras especies de abasto, como aves o cerdos. Los parámetros más destacados para medir el bienestar animal en un sistema de producción de reproductoras son la cría en grupo, el tamaño de la jaula, la influencia de la temperatura en la producción y la sustitución de los tratamientos hormonales en la inseminación artificial (López, 2002).

Existen otras formas de valorar el bienestar animal, evaluando las respuestas fisiológicas al estrés, el sistema inmunológico o los cambios en su comportamiento al intentar afrontar diferentes situaciones (Hemsworth et al., 2014). Es muy útil observar si es capaz de expresar su comportamiento natural, evaluando si presenta signos de dolor o estereotipias (Zomeño et al., 2017).

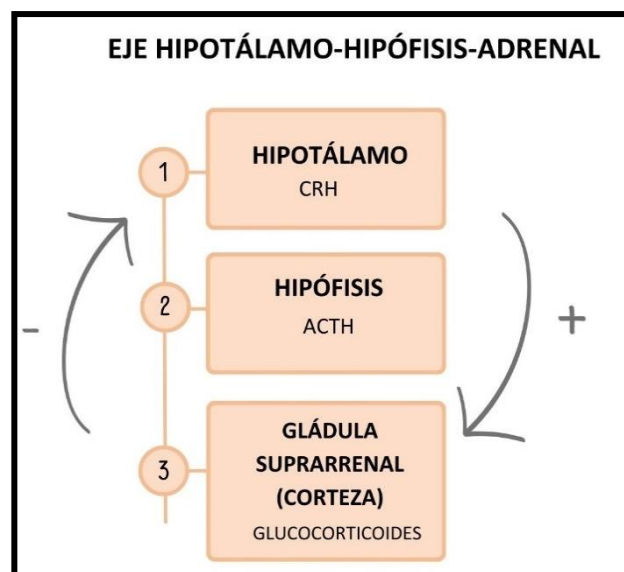
### **1.3.2 El estrés.**

El estrés se puede definir como una respuesta inespecífica del cuerpo ante un desafío externo, un patógeno o un entorno desfavorable. Cualquier proceso estresante puede desencadenar una respuesta inespecífica y necesaria para recuperar la normalidad (Veissier y Boissy, 2007).

El conejo es una especie que se estresa fácilmente debido a su exposición constante a la depredación de numerosas especies de mamíferos y rapaces, lo que condiciona su actividad diaria, ya que necesita un lugar para refugiarse. Se le considera una especie muy vulnerable a su entorno (MAPAMA 2017). Otro factor estresante para los conejos es la temperatura ambiental. Es importante, porque son considerados animales homeotérmicos, es decir, su temperatura corporal debe mantenerse dentro de un rango estrecho, generalmente entre 38.5 °C y 39.5 °C, para permitir un funcionamiento óptimo de los procesos biológicos y de las actividades vitales (Villagrà, Blanes, y Torres, 2004).

La respuesta del organismo al estrés no tiene que ser intrínsecamente negativa, ya que ayuda a hacer frente a su entorno y a situaciones desafiantes (Palme, 2012). La constante exposición a estresores agudos provoca un deterioro biológico en los animales, que lleva a un estado prepatológico o patológico. El estrés crónico conduce al organismo a un deterioro de los sistemas inmunológicos y reproductivos (Buijs et al., 2011).

En todos los animales, las respuestas fisiológicas al estrés son necesarias para poder adaptarse al ambiente. Esto da lugar a la activación de la respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) por la actividad neuroendocrina. La actividad del eje HHA implica la liberación de glucocorticoides (GC), los cuales activan procesos homeostáticos en el metabolismo energético y la función neurobiológica. El eje HHA consta de tres componentes: el hipotálamo, la hipófisis anterior y la corteza de la glándula suprarrenal. El hipotálamo sintetiza la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual llega a los receptores de la hipófisis anterior, liberando la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) a la sangre (Heimbürge et al., 2019). En la zona fascicular de la corteza suprarrenal, la ACTH estimula la secreción de glucocorticoides, principalmente cortisol y corticosterona, ambos tienen efectos muy similares (Buijs et al., 2011), (figura 5). El cortisol es el glucocorticoide que predomina en mamíferos de un tamaño mediano a grande, también en peces y en humanos. En cambio, la corticosterona es el glucocorticoide primario en aves y pequeños mamíferos (Millspaugh y Washburn, 2004). Después de la respuesta del organismo al estímulo estresante, se activa una respuesta de retroalimentación negativa, en la cual los niveles sanguíneos de glucocorticoides desencadenan que se deje de secretar ACTH en la hipófisis y CRH en el hipotálamo, lo que provoca que dejen de secretarse las catecolaminas (Rivier y Rivest, 1991). (figura 5).



**Figura 5.**

Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal. Elaboración propia.

El cortisol y la corticosterona tienen numerosas funciones en el organismo. Se encuentran involucrados en la movilización de reservas energéticas a través de la actividad lipolítica y proteolítica. Forman parte de la gluconeogénesis, suprimen las reacciones inmunitarias y tienen efectos neurobiológicos (Heimbürge et al., 2019).

#### **1.4 Evaluación del estrés en el conejo.**

La evaluación y la monitorización de las respuestas fisiológicas al estrés son esenciales para mejorar y comprender la salud y el bienestar de los animales (Mo et al., 2006). Se puede llevar a cabo a través de diferentes indicadores, como se muestran en la figura 6, existiendo indicadores no invasivos e invasivos. Los métodos de muestreo invasivos generan estrés porque es necesaria la captura y restricción del animal para poder obtener la muestra, lo cual compromete la evaluación precisa del estrés (Millsbaugh y Washburn, 2004), algunos ejemplos son la evaluación de parámetros hematológicos, la química sanguínea, el análisis del cortisol o de corticosterona en muestras de suero ante mortem. Los métodos de muestreo no invasivos o mínimamente invasivos son aquellos que no afectan a las libertades del animal de manera prolongada en el tiempo (Heimbürge et al., 2019), algunos ejemplos son la evaluación de parámetros etológicos, productivos, fisiológicos o el nivel de cortisol o corticosterona en saliva, orina, heces y pelo.

INDICADORES NO INVASIVOS	INDICADORES INVASIVOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PARÁMETROS ETOLÓGICOS</li> <li>• PARÁMETROS PRODUCTIVOS</li> <li>• PRUEBAS DE MIEDO</li> <li>• PARÁMETROS FISIOLÓGICOS</li> <li>• NIVEL DE CORTICOESTERONA EN SALIVA, ORINA, HECES Y PELO</li> <li>• NIVEL DE CORTICOESTERONA EN SUERO POST-MORTEM</li> <li>• TEST DE TESTOSTERONA SALIVAL</li> <li>• CATECOLAMINAS URINARIAS</li> <li>• VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDIACA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CALIDAD DE LA CANAL POST SACRIFICIO</li> <li>• PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS</li> <li>• QUÍMICA SANGUÍNEA</li> <li>• CORTICOESTERONA EN MUESTRAS DE SUERO</li> <li>• RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL EN MUESTRA DE SUERO</li> <li>• TELEMETRÍA</li> <li>• EXPRESIÓN DE GENES</li> <li>• BIOMARCADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO</li> </ul>

**Figura 6.**

Indicadores invasivos y no invasivos para medir el estrés en los animales. Adaptado de: (Sanmiguel Plazas et al., 2017)

Se puede medir el nivel de glucocorticoides o de ciertos metabolitos de forma no invasiva a través de muestras de heces y de pelo para evaluar el estado de estrés de conejos (Zomeño et al., 2017). El cortisol y los metabolitos obtenidos de muestras de saliva, orina, heces y pelo son un metabolito de la hormona. Por lo tanto, es necesario estandarizar, analizar e interpretar los resultados para la especie concreta que se desee estudiar (Ma et al., 2005). Este tipo de muestras también tienen otros inconvenientes, sobre todo si se trata de animales de vida silvestre como el conejo europeo. Los resultados de las muestras de saliva pueden verse alterados si el animal ha bebido o comido antes de su recogida. La recolección de muestras de heces en el medioambiente es un método complicado para poder asignar la muestra a un individuo concreto. La recolección de orina es difícil y a veces no se puede llevar a cabo. Para analizar muestras de pelo se debe tener un protocolo estandarizado con los diferentes factores que puedan interferir en los resultados, como son la edad, el sexo, el estado reproductivo, la región del cuerpo dónde se recoge el pelo, el color de la muestra y las posibles contaminaciones externas (Heimbürge et al., 2019). Estas muestras se utilizan para evaluar el estrés crónico, a diferencia de las muestras de sangre (Sanmiguel Plazas et al., 2017).

El método convencional para cuantificar el nivel de glucocorticoides es la analítica de sangre (Mo et al., 2006). La extracción de sangre in vivo para un análisis de suero o plasma se considera un método invasivo, pero ofrece la ventaja de poder evaluar la respuesta suprarrenal ayudando a comprender el estado adrenocortical del animal (Millspaugh y Washburn, 2004).

Existen diversos factores que se deben tener en cuenta para la obtención de muestras con el fin de mejorar la interpretación de los resultados posteriores. El lugar y el proceso de muestreo no deben interferir con el indicador de estrés (Heimbürge et al., 2019). Es importante considerar que la proporción y la composición de los glucocorticoides circulantes en el torrente sanguíneo varía según la especie (Millspaugh y Washburn, 2004). Los glucocorticoides en los conejos tienen una secreción pulsátil y un ritmo circadiano, lo que significa que los niveles de cortisol y corticosterona pueden variar dependiendo del momento del día. Se considera crucial considerar el momento de la recolección de muestras y los diferentes factores estresantes del entorno (Buijs et al., 2011).

### **1.5 Determinación de la corticosterona en suero para evaluar el estrés.**

Los kits de ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) son un método que permite detectar cuantitativamente un antígeno o un anticuerpo en una muestra. Existen cuatro tipos principales de ELISA: directo, indirecto, competitivo y tipo sándwich. Se utilizan ampliamente para cuantificar los niveles de corticosterona (Rod et al., 2017). Deben ser validados previamente para la especie que se quiera investigar (Otten et al., 2010) y permiten analizar una gran variedad de muestras, entre las que se encuentran, el sobrenadante de cultivo celular, la saliva, la leche, la orina, el suero y el plasma. En los conejos, los ELISA se emplean para valorar el nivel de corticosterona en muestras de suero (Massányi et al., 2020).

La medición del cortisol o la corticosterona utilizando estas técnicas tiene sus limitaciones y sus ventajas. Por un lado, los kits comerciales, aunque efectivos, suelen tener un coste elevado y su uso requiere de equipos especializados, como un espectrofotómetro de 96 celdas (Sanmiguel Plazas et al., 2017). Por otro lado, se considera una técnica con una sensibilidad y especificidad muy alta, no requiere de radioisótopos como el radioinmunoensayo (RIA) ni es muy compleja. Debido a sus beneficios se considera una técnica muy adecuada para la evaluación de corticosterona en suero y otras muestras (Velasco Santamaría y Cruz Casallas, 2007).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal del presente trabajo final de grado es determinar la concentración de corticosterona en muestras de suero de conejos europeos para evaluar el nivel de estrés de estos animales.

El objetivo secundario es conocer si diferentes factores como la edad, el sexo, el año, la localización geográfica, la estación del año, el método de captura o ser positivos a mixomatosis y/o enfermedad hemorrágica del conejo están relacionados con las concentraciones de corticosteroides obtenidas. Los resultados alcanzados en la investigación contribuirán a enriquecer el conocimiento existente en la comunidad científica con respecto al bienestar de la fauna silvestre.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Población de estudio.

La zona de estudio del presente trabajo se localiza en las comarcas de Ribera Alta, Vall d'Albaida y Utiel-Requena. En Ribera Alta en el municipio de Turís, en Vall d'Albaida en los municipios de Pobladeuc, Montaverner y Cuatrecerdas y en Utiel-Requena en los municipios de Requena y San Antonio, todos ellos pertenecientes a la Comunitat Valenciana. La distribución de las zonas de muestreo se observa en la figura 7.

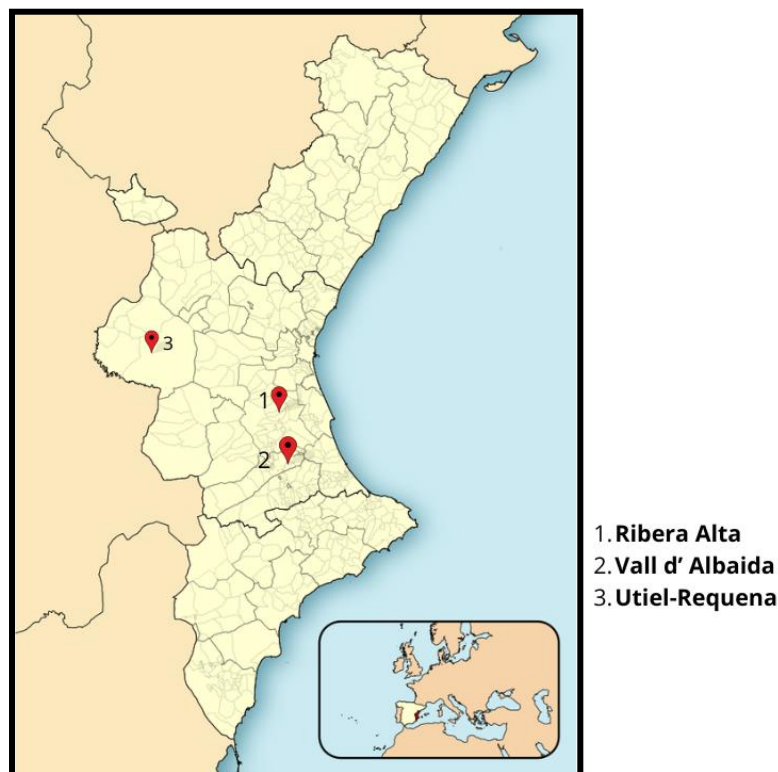


Figura 7.

Mapa de las zonas de muestreo de este estudio.

#### 3.2 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo mediante la captura de conejos de la especie *Oryctolagus cuniculus* en las diferentes ubicaciones descritas. Los animales fueron obtenidos de dos formas diferentes: caza con hurón y abatimiento por cazadores, o mediante el trampeo en cajas y posterior dislocación cervical. Este último método se realiza en áreas cercanas a las vías del tren de alta velocidad AVE, debido a que los conejos de la zona generan problemas por la situación de su refugio. Las muestras de esta zona se encuentran identificadas como ADIF.

Los cadáveres fueron conservados en un congelador a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , lo que proporcionó un mayor número de animales para analizar al mismo tiempo. La necropsia y la toma de muestras tras la descongelación fueron realizadas en la Universidad Católica de Valencia. Durante el proceso se obtuvieron muestras de sangre entera, se centrifugaron para obtener el suero y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación.

En la selección de sueros se procuró que el número de muestras fuese equitativo en función de cada variable. En cuanto al año de recolección, tal y como se observa en la tabla 1, 31 muestras fueron recogidas en 2016, 45 en 2018 y 20 en 2019. Respecto a la estación del año, 22 muestras fueron obtenidas en primavera, 25 en verano, 21 en otoño y 25 en invierno. Y en cuanto al sexo de los conejos, 52 eran machos y 41 eran hembras. Esta equidad no sucede siempre, ya que, en otras variables como el método de captura, la diferencia es considerable. El número de muestras recopiladas en los últimos años tipo ADIF fue menor que el número de muestras de los animales abatidos. Resultando que 78 conejos fueron obtenidos por abatimiento y solamente 15 por ADIF. Respecto a las zonas geográficas, los municipios en los que recogieron más animales fueron: Requena con un total de 30 muestras, Cuatretonda con 22 y Ribera Alta con 20 conejos. En cambio, en Montaverner se obtuvieron 10 muestras, en Pobra de Duc 8 y solamente 3 en San Antonio. Respecto a la edad, también existe una desigualdad en el número de muestras. Se registraron 64 adultos, 20 juveniles y 9 gazapos. Las enfermedades, mixomatosis y EVH, fueron analizadas únicamente en 33 conejos del total de las muestras, resultando 19 positivos y 14 negativos a mixomatosis y 18 positivos y 15 negativos a la EVH.

**Tabla 1.**

Número de muestras en función de cada variable.

MÉTODO DE CAPTURA		AÑO			ESTACIÓN				MIXOMATOSIS		EVH	
ADIF	Abatido	2016	2018	2019	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
15	78	31	42	20	22	25	21	25	19	14	18	15
ZONA GEOGRÁFICA						SEXO		EDAD				
Requena	Pobra de Duc	Montaverner	Ribera alta	San Antonio	Cuatretonda	Macho	Hembra	Gazapo	Juvenil	Adulto		
30	8	10	20	3	22	52	41	9	20	64		

### 3.3 Método de análisis

Para el análisis de las muestras se utilizó el Kit ELISA (AB108821, abcam, UK), el cual consiste en un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas diseñado para medir de forma cuantitativa los niveles de corticosterona en la muestra. Este ensayo es de tipo competitivo directo. Las placas del ELISA están formadas por 96 pocillos recubiertos de un anticuerpo específico de corticosterona. En primer lugar, se añade la muestra y un antígeno marcador: la proteína de corticosterona biotinilada. Se produce una competición por los sitios de unión entre la corticosterona de la muestra y la corticosterona biotinilada. En el caso de que la muestra sea positiva, la corticosterona se une al anticuerpo específico. Sin embargo, si la muestra es negativa, será el antígeno marcador el que se une al anticuerpo específico. Posteriormente, se añade un conjugado: estreptavidina-peroxidasa. La estreptavidina se une al antígeno marcador que está unido al anticuerpo de la placa. Al añadir el sustrato para visualizar la reacción enzimática, la peroxidasa del conjugado cataliza la reacción del sustrato y genera un cambio de color a azul que, tras añadir la solución de parada, cambia a amarillo. Al ser un ELISA competitivo, la coloración amarilla es inversamente proporcional a la cantidad de corticosterona presente en la muestra (ver figura 8).

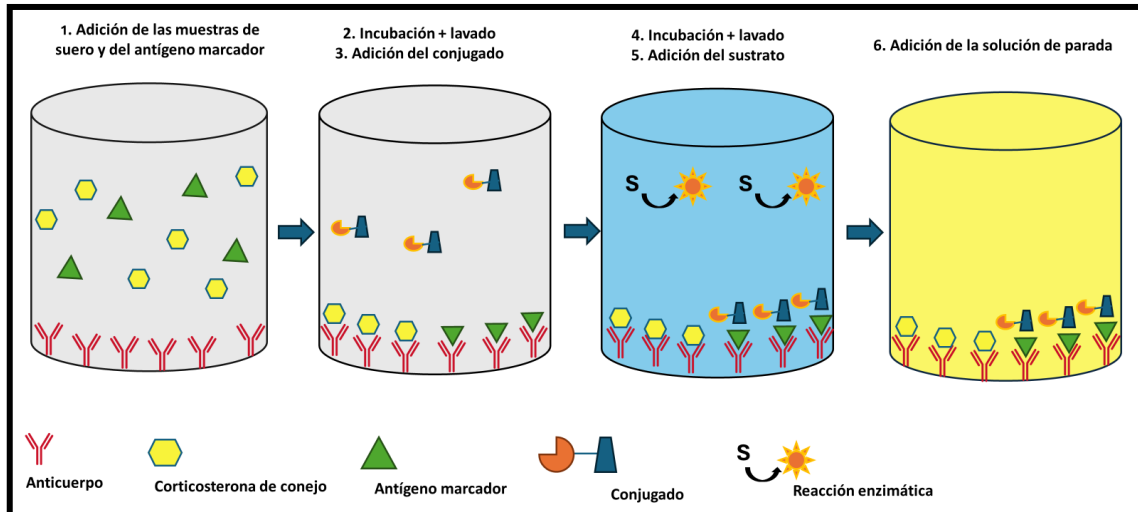


Figura 8.

Esquema del ELISA competitivo directo del estudio. Adaptado de: (Mercader et al., 2020)

El ELISA utilizado tiene capacidad de analizar una gran variedad de muestras, entre las que destacan el plasma, el suero, la orina, la saliva, la leche y el sobrenadante de cultivo celular. Las especies para las que está indicado el ELISA son el ratón, la rata, el mandril y el ser humano. Se requieren 3 horas para completar el ensayo. Su sensibilidad es de 0.32 ng/ml, lo que indica que el ELISA es capaz de detectar concentraciones bajas de corticosterona en las muestras analizadas. Un valor de 0.32 ng/ml indica una gran sensibilidad, por lo que un valor por debajo indica menor fiabilidad. Su rango de medición oscila entre 0.18 ng/ml y 19.7 ng/ml, correspondiendo a los límites mínimos y máximos dentro de los cuales el kit puede medir la corticosterona. El valor de recuperación de la muestra oscila entre 96% y 107%, siendo la media 101%, y permite saber qué cantidad de corticosterona es capaz de recuperar y detectar el ELISA del total de la muestra, lo cual indica que el ELISA tiene una buena precisión y exactitud. El coeficiente de variación porcentual total (CV%), es la variabilidad relativa de los resultados obtenidos en la prueba y se mide a través de dos valores: Valor intraensayo, hace referencia a los resultados obtenidos al realizar múltiples repeticiones de la misma muestra dentro del mismo ensayo, los cuales varían un 6.3% en torno a la media en este kit ELISA. Y el valor interensayo, que evalúa la variabilidad de los resultados cuando se realiza el mismo ensayo en diferentes momentos, con diferentes lotes o reactivos, siendo el valor interensayo del 10.6%.

Antes de comenzar se preparó el Kit ELISA y los reactivos, como se observa en la figura 9, siguiendo las indicaciones del fabricante.

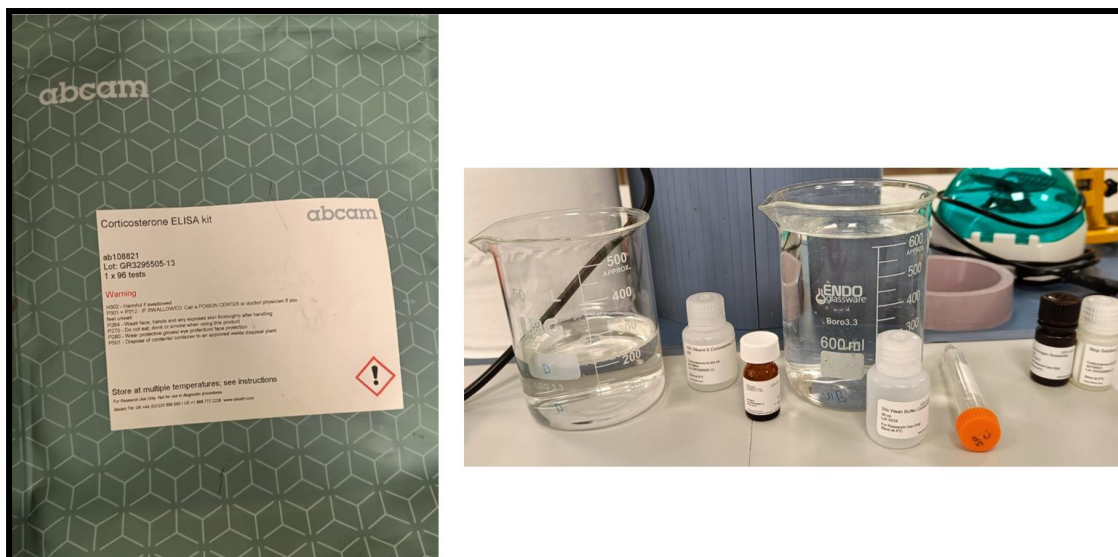


Figura 9.

Kit ELISA (AB108821) y los reactivos preparados

Se realizó la preparación del estándar a partir de un vial de corticosterona a 100 ng/ml, el cual corresponde al tubo número 1, y un diluyente que corresponde al tubo 13 con 0 ng/ml de corticosterona. Se realizaron las diluciones seriadas hasta obtener un total de 13 tubos con diferentes concentraciones de corticosterona, como se observa en la tabla 2.

**Tabla 2.**

Concentración de corticosterona obtenidas de la preparación estándar.

<b>TUBOS</b>	<b>Concentración de corticosterona (ng/ml)</b>
<b>1</b>	100
<b>2</b>	50
<b>3</b>	16.6
<b>4</b>	12.5
<b>5</b>	5.53
<b>6</b>	5
<b>7</b>	3.12
<b>8</b>	2.5
<b>9</b>	1.563
<b>10</b>	0.75
<b>11</b>	0.391
<b>12</b>	0.0977
<b>13</b>	0

Se prepararon las muestras de suero homogeneizándolas en el vórtex durante 10-15 segundos. En la microplaca de 96 pocillos se agregaron 25  $\mu$ l de la preparación estándar o de las muestras de suero junto con 25  $\mu$ l de la proteína de corticosterona biotinilada. Se golpeó la placa con suavidad para asegurar que el contenido estuviera correctamente mezclado y se rompieron las burbujas que se hubiesen formado. Se dejó incubando durante 2 horas con los pocillos cubiertos con una cinta de sellado. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó 5 veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado. Posteriormente, se incorporaron 50  $\mu$ l del conjugado a cada pocillo y se repitieron los pasos anteriores. Se golpeó la placa y se eliminaron las burbujas. La placa se incubó durante 30 minutos. Mientras tanto, se preparó el lector de microplacas y se configuró el programa con anticipación. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó la microplaca y se añadieron 50  $\mu$ l del sustrato cromogénico por pocillo, luego se incubó a luz ambiente durante 25 minutos hasta que desarrolló la densidad de color azul óptima. Para finalizar, se incorporaron 50  $\mu$ l de la solución de parada a cada pocillo, el color cambió de azul a amarillo (figura 10). En la figura 11, se muestra un esquema de cada paso del proceso de forma más concisa.

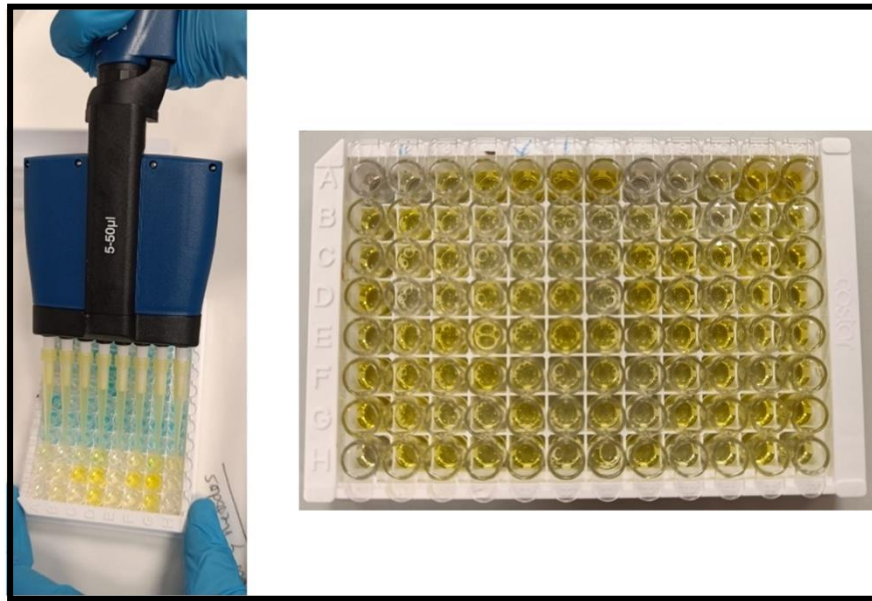


Figura 10.

Agregación de la solución de parada a la microplaca y posterior cambio de color de azul a amarillo.

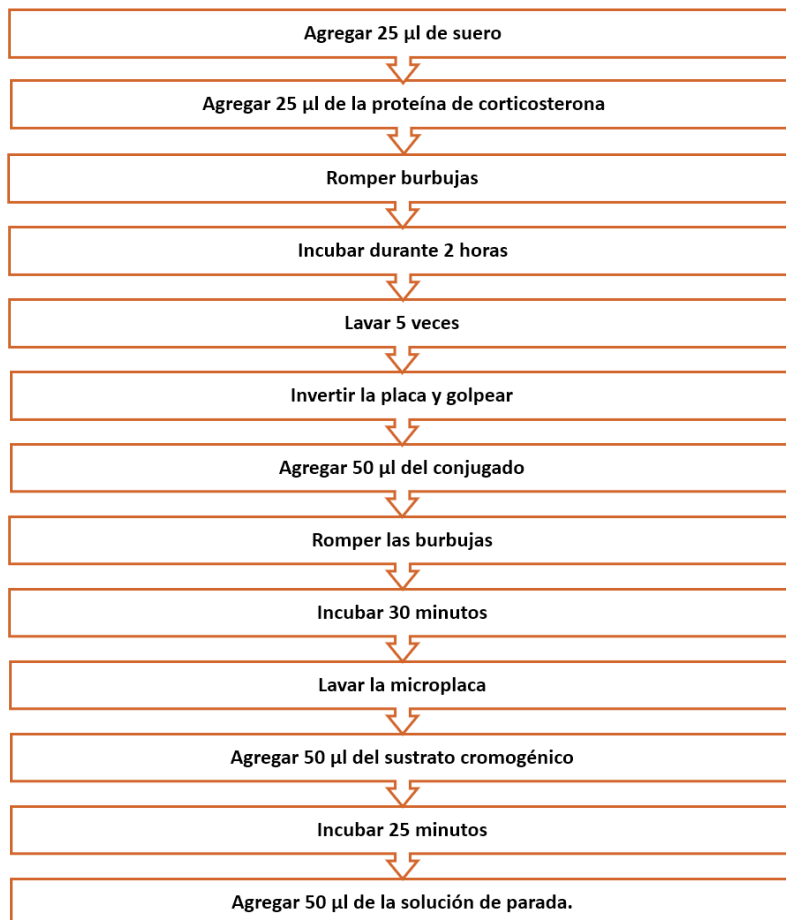


Figura 11.

Diagrama de flujo del procedimiento siguiendo las indicaciones del laboratorio Abcam.

Una vez terminado el procedimiento, se realizó la lectura de las absorbancias en un lector de microplacas (SU 031011, Thermo Scientific™ VLBATD2, Madrid, España) y con el Software SkanIt, a una longitud de onda de 450 nm y a 570 nm, para posteriormente corregir las imperfecciones ópticas restando las lecturas de 570 nm a las de 450 nm. Ver figura 12.



**Figura 12.**

Lectura de las absorbancias en el lector de microplacas.

Se realizó una curva patrón para establecer una relación cuantitativa entre las absorbancias medidas en el lector de microplacas y las concentraciones conocidas de corticosterona (ver tabla 3). Esta relación se expresa en forma de una ecuación matemática. Para realizar la curva patrón de este estudio, se utilizó la media de las absorbancias y el logaritmo neperiano de las concentraciones de corticosterona. Se eliminaron las concentraciones más extremas: 100 ng/ml y 0 ng/ml, debido a que permite ajustar la curva patrón y obtener una mayor precisión.

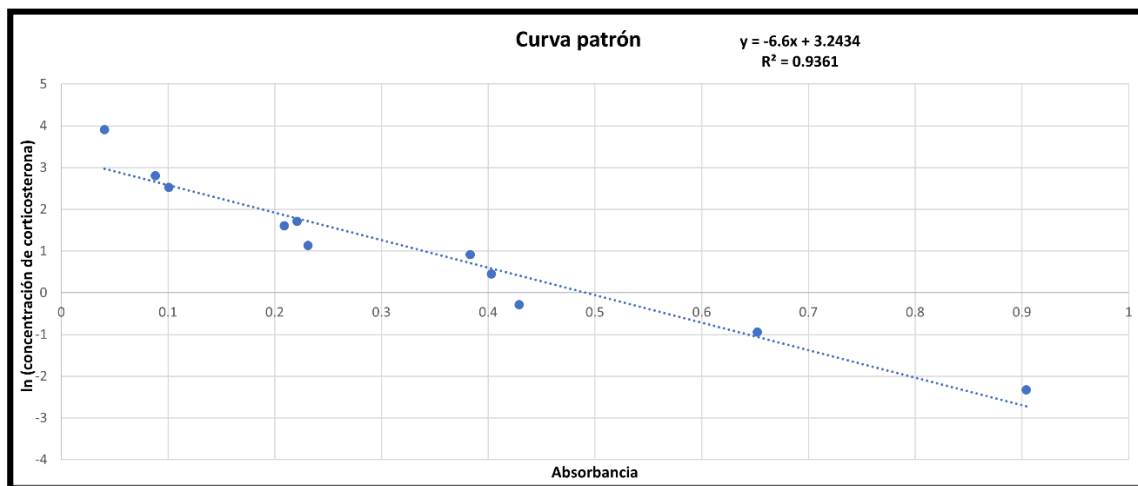
**Tabla 3.**

Datos empleados para la obtención de la curva patrón que relacionan la concentración de corticosterona con la absorbancia de las muestras.

Concentración de corticosterona (ng/ml)	Logaritmo neperiano de la corticosterona (ln)	Media de las absorbancias de las muestras
50	3.912023005	0.04055
16.6	2.809402695	0.088
12.5	2.525728644	0.1007
5.53	1.710187816	0.2208
5	1.609437912	0.2089
3.12	1.137833002	0.2311
2.5	0.916290732	0.383
1.563	0.446607051	0.403
0.75	-0.287682072	0.429
0.391	-0.939047719	0.652
0.0977	-2.32585372	0.9039

El logaritmo neperiano de la concentración de corticosterona fue utilizado para facilitar la interpretación y el análisis de los datos en el gráfico de dispersión, lo que permite transformar los datos para que sigan una relación lineal.

El uso del logaritmo neperiano permite obtener una representación de la curva patrón en línea recta, lo que aumenta la precisión. Además, amplía el intervalo de valores, permite representar concentraciones de corticosterona con valores más bajos, lo que aumenta la sensibilidad del modelo. Otra ventaja es que permite homogeneizar la varianza, haciendo que la dispersión de los datos sea más uniforme en todo el rango de concentraciones, reduciendo el impacto de los valores extremos en el ajuste de la curva patrón (figura 13).



**Figura 13.**

Curva patrón representada en un gráfico de dispersión.

La curva patrón fue representada en un gráfico de dispersión a través del programa Excel (Microsoft Corporation, 2021), (figura 13), donde el eje de las X representa la absorbancia de las muestras y el eje de las Y representa el logaritmo neperiano de la concentración de corticosterona. Además, se obtiene la ecuación de la recta que representa la relación entre la absorbancia de las muestras y la concentración corticosterona.

Siendo la ecuación:

$$y = -6.6x + 3.2434$$

$$R^2 = 0.9361$$

A través de la ecuación de la recta se obtuvo la concentración de corticosterona (Y) de los sueros de conejo, sustituyendo la X de la ecuación por las absorbancias obtenidas. Con la Y se realizó la función exponencial del logaritmo neperiano:  $e^Y$ , para obtener la concentración real de corticosterona.

El otro término de la ecuación es la R cuadrado ( $R^2$ ), denominado el coeficiente de determinación, representa cómo se adapta la línea de regresión a los datos reales. El valor puede oscilar entre 0 y 1. Un valor de  $R^2 = 0.9361$  indica que la línea de regresión se ajusta muy bien a los datos.

### **3.4 Análisis estadístico.**

Para evaluar los resultados del estudio, se realizó un análisis estadístico a través de un modelo de regresión para definir la relación entre la variable dependiente (corticosterona) y las variables independientes: la captura, el año, la estación, la zona geográfica, el sexo, la edad, la mixomatosis y la enfermedad vírica hemorrágica.

Con el fin de validar las mediciones duplicadas de corticosterona, se calculó la correlación Pearson, lo que permitió mejorar la fiabilidad y precisión del ensayo.

Para llevar a cabo el estudio estadístico, se utilizó el programa R Project (R Core Teams, 2021)

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al final del estudio, se obtuvo la concentración de corticosterona de 93 muestras de suero de conejo a través del kit ELISA. Se realizó por duplicado el análisis en 54 de las 93 muestras. Con los resultados obtenidos, se llevó a cabo un estudio estadístico y se calculó la correlación de corticosterona entre los sueros duplicados, siendo el valor de 0.95. Se considera un resultado favorable, ya que permite establecer la fiabilidad y precisión de los datos obtenidos. Se utilizó un único valor de corticosterona de aquellas muestras con valores duplicados para realizar el análisis estadístico.

En la tabla 4 se observan los resultados del estudio descriptivo de la concentración de corticosterona. El valor mínimo de corticosterona analizado fue de 0.0646 ng/ml. Hay que tener en cuenta que aquellos valores por encima de 0.32 ng/ml son más precisos, pero considerando que solamente 3 de las muestras de suero dieron valores por debajo de 0.32 ng/ml, se decidió mantenerlas en el estudio.

El valor del 1º cuartil (1st Qu) fue de 1.4027 ng/ml, lo que significa que el 25 % de las muestras de suero tienen un valor de corticosterona superior a este. La mediana es de 2.9975 ng/ml, indica que la mitad de las muestras analizadas tienen valores por debajo y la otra mitad tienen valores por encima, representando el punto medio. La media de corticosterona de todos los sueros analizados fue de 4.1138 ng/ml. El valor del 3º cuartil (3rd Qu) fue de 5.5902 ng/ml, lo que señala que el 75 % de las muestras de suero se encuentran por encima de este valor. El valor máximo de corticosterona analizado fue de 15.3519 ng/ml.

**Tabla 4.**

Resultados estadísticos del análisis descriptivo de corticosterona

	<b>Corticosterona (ng/ml)</b>
<b>Mínima</b>	0.0646
<b>1st Qu</b>	1.4027
<b>Mediana</b>	2.9975
<b>Media</b>	4.1138
<b>3rd Qu</b>	5.5902
<b>Máximo</b>	15.3519

En este estudio, se analizó la corticosterona, ya que es el principal glucocorticoide suprarrenal secretado por el conejo silvestre, como señala Cabezas et al. (2007). Según Kurtz y Travlos (2017) y Washington y Van Hoosier (2012), el valor de referencia de corticosterona en un conejo en edad adulta es de 1.54  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Sin embargo, al cambiar las unidades de medida ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) a las utilizadas en el estudio ( $\text{ng}/\text{ml}$ ), el valor equivalente corresponde a 15.4  $\text{ng}/\text{ml}$ . Hay que destacar que en la literatura faltan valores de referencia de corticosterona para conejos silvestres en condiciones libres de estrés.

Se observó una discordancia entre los resultados de la concentración de corticosterona de las muestras de suero analizadas en el estudio y los valores de referencia de la bibliografía consultada. Esto puede deberse a varios motivos. El Kit Elisa está diseñado para analizar la corticosterona en el ratón, la rata, el mandril y el ser humano, ya que utiliza un anticuerpo específico de corticosterona para las especies en las que se encuentra indicado. A pesar de que el suero tiene valores de corticosterona puros, al ser de conejo podría no adherirse de forma tan eficiente al ELISA. Esto puede afectar a los resultados finales, obteniendo valores más bajos de corticosterona (Ma et al., 2005). Por otro lado, los valores de referencia son obtenidos de muestras de sangre de conejos vivos de edad adulta, sin especificar su raza y que se encuentran en un laboratorio. En el presente estudio, los datos se obtuvieron de muestras descongeladas que pertenecen a cadáveres de conejos silvestres, de diferentes edades y de diferentes situaciones ambientales. Por lo tanto, una posible explicación es que la concentración de corticosterona, que se encuentra en los cadáveres de los conejos, sea menor que la concentración en muestras procedentes de conejos vivos y de laboratorio. Hay que matizar que faltan investigaciones que evalúen cómo puede afectar la obtención de las muestras de suero post mortem al análisis de corticosterona.

En futuras investigaciones, se podría considerar extraer sangre de conejos vivos para evitar la degradación post mortem de la corticosterona. Sin embargo, se debería tener en cuenta que el método dejaría de ser no invasivo y se volvería invasivo, lo que generaría un estado de estrés agudo al animal, incrementado los niveles de corticosterona.

Además, se debe considerar que la secreción de la hormona corticosterona es pulsátil y sigue ritmos diurnos y estacionales. Se ve influenciada por factores como el consumo de alimentos, las condiciones ambientales, la edad del animal y su estado fisiológico. Existiendo diferencias entre razas e incluso individuos, lo que confirma la influencia significativa de los factores genéticos y ambientales (Mormède et al., 2007).

Medir la concentración de corticosterona en muestras de suero permite evaluar el nivel de estrés del animal en el momento de la toma de muestras. Para evaluar de forma más completa el bienestar animal, se deberían considerar, en la toma de muestras, otros parámetros como la condición corporal del animal, además de analizar diferentes factores ambientales como la distribución del alimento y el agua, la presencia de depredadores o si la zona es un coto de caza.

A pesar de la discrepancia entre los valores de referencia consultados en la bibliografía y las muestras analizadas en el estudio, los resultados son respaldados con el valor de R cuadrado cercano a 1,  $R^2 = 0.9361$ , que establece la precisión de la curva patrón e indica que el modelo se ajusta a los datos. Además, de la correlación en las muestras duplicadas, que indica que hay concordancia entre el valor que detecta el kit ELISA y la concentración de corticosterona en las muestras.

Al final del estudio, se obtuvieron los resultados del análisis estadístico por mínimos cuadrados y el error estándar. Estos resultados son esenciales para analizar la relación entre la concentración de corticosterona en el suero analizado y los diferentes parámetros de los conejos muestreados. Considerar un conjunto de parámetros fisiológicos y conductuales al realizar el estudio permite obtener una evaluación del estrés más completa y exhaustiva. Los parámetros utilizados en el estudio no son variables numéricas, por lo tanto, no se realizó el estudio descriptivo de cada una de ellas.

#### **4.1 Influencia del tipo de captura en la concentración de corticosterona.**

**Tabla 5.**

Influencia del tipo de captura en la concentración de corticosterona.

<b>Método de captura</b>	<b>ADIF</b>	<b>ABATIDO</b>
	$6.69 \pm 2.089^a$ ng/ml	$2.82 \pm 0.771^b$ ng/ml

*Nota:* <sup>a y b</sup> Las medias en la misma fila con el mismo superíndice no difieren significativamente. Diferencia significativa  $\alpha=0,05$ . Se muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.

En la tabla 5 se observa cómo influye el tipo de captura en la concentración de corticosterona. Cuando los conejos fueron capturados mediante el método ADIF, la media de la concentración de corticosterona fue  $6.69 \pm 2.080$  ng/ml, en cambio, cuando los conejos se capturaron por abatimiento, la concentración de corticosterona fue de  $2.82 \pm 0.771$  ng/ml. El resultado indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos de captura utilizados en el estudio. Se observa que la concentración media de corticosterona en las muestras ADIF es superior al otro método utilizado. Para una mejor interpretación de los

resultados, se tiene en cuenta el porcentaje de muestras en función del método de captura. El método de captura por abatimiento representa el 84% de todas las muestras recogidas. En cambio, el método ADIF constituye el 16% (ver figura 14).

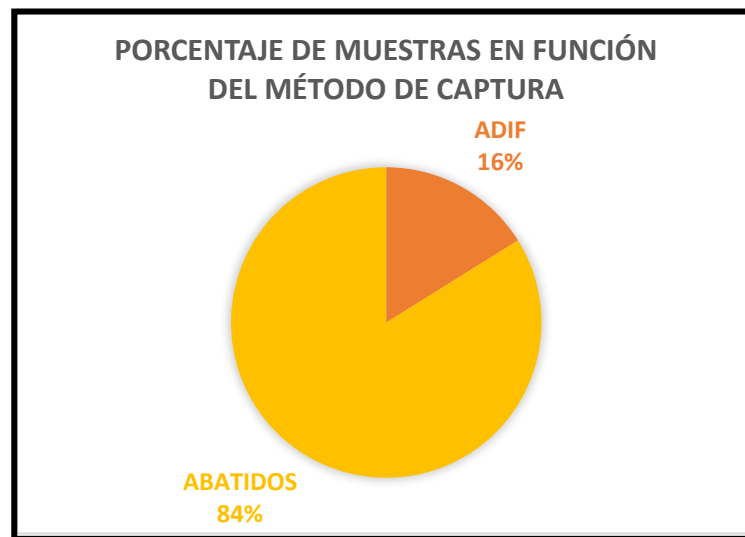


Figura 14.

Porcentaje de muestras en función del método de captura.

Para que la comparación entre ambos métodos de caza sea más objetiva, se debería aumentar el número de muestras obtenidas con el método de caza ADIF.

En un estudio realizado por Liste et al. (2009), se determinó que la permanencia a corto o largo plazo en un matadero tenía efecto sobre los indicadores de estrés plasmáticos. Se demostró que el tiempo de espera de un animal estabulado tiene influencia significativa sobre el bienestar animal. Se observó que el nivel de corticosterona en un tiempo de espera prolongado, más de 8 horas, era menor que el nivel de corticosterona después de un periodo corto de tiempo, menos de 3 horas. Esto se debe a que el animal se adapta y se recupera del estrés en un tiempo prolongado.

Los conejos del método ADIF han sido capturados en trampas y se encuentran en ellas durante un máximo de 24 horas antes de ser sacrificados. En este método de captura, los animales alcanzan niveles de corticosterona muy altos en las primeras horas de ser capturados. Posteriormente, ese pico de corticosterona disminuye. Aun así, se observa una concentración de corticosterona superior en comparación con el método de abatimiento. El método de captura por abatimiento es un procedimiento mucho más rápido de llevar a cabo.

Para próximos estudios, sería interesante considerar las horas en las que se realiza la toma de muestras durante el proceso de abatimiento. De esta manera, se consideraría la influencia del ritmo circadiano en los niveles de corticosterona. Por ejemplo, entre las 7.00 h y

las 9.00 h, los valores de corticosterona están más bajos en el conejo y por tanto podría influir en los resultados del estudio (Szeto et al., 2004).

#### **4.2 Influencia de la estación del año en la concentración de corticosterona.**

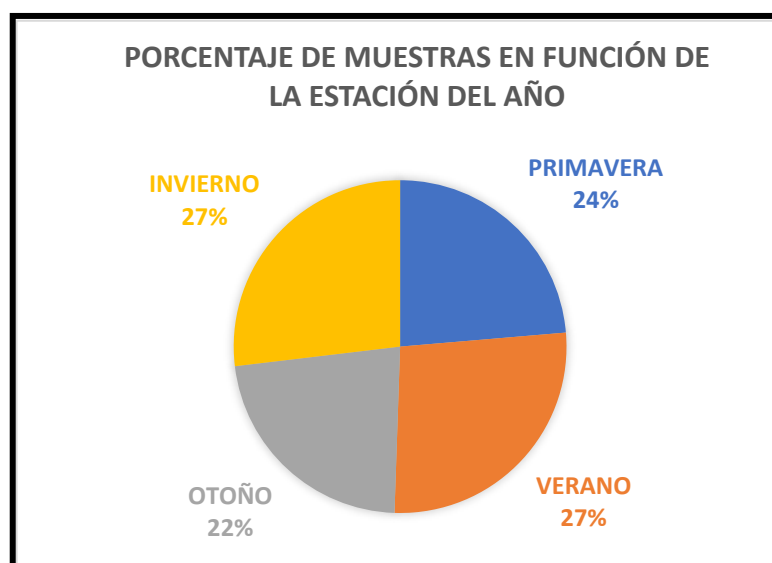
**Tabla 6.**

Influencia de la estación del año en la concentración de corticosterona.

Estación del año	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
	3.18 ± 0.922 <sup>a</sup> ng/ml	2.74 ± 0.896 <sup>a</sup> ng/ml	2.49 ± 1.135 <sup>a</sup> ng/ml	6.98 ± 1.095 <sup>a</sup> ng/ml

*Nota:* <sup>a</sup> Las medias en la misma fila con el mismo superíndice no difieren significativamente. Diferencia significativa  $\alpha=0,05$ . Se muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.

En la tabla 6 se muestra la influencia de la estación del año en la concentración media de corticosterona. En primavera, el valor medio en la concentración de corticosterona fue 3.18 ± 0.922 ng/ml, en verano la media fue 2.74 ± 0.896 ng/ml y en otoño la media de corticosterona fue muy similar, siendo de 2.49 ± 1.135 ng/ml. En invierno, la media fue un poco más elevada, con un valor de 6.98 ± 1.095 ng/ml de corticosterona. Estos resultados indican que no existe una diferencia estadísticamente notable entre las diferentes estaciones del año en las que se recogieron las muestras. Se observa una tendencia en invierno a tener una concentración de corticosterona superior al resto de las estaciones. En la figura 15, se observa cómo las muestras fueron recogidas de forma equitativa entre las 4 estaciones del año, ya que en invierno fueron recogidas el 27% de las muestras, en primavera el 24%, en otoño el 22% y en verano el 27%.



**Figura 15.**

Porcentaje de muestras en función de la estación del año

El conejo, como se menciona en apartados anteriores del trabajo, es un animal homeotermo influenciado por el clima. Para poder llevar a cabo sus actividades y procesos vitales con normalidad, debe mantener su temperatura corporal entre 38.5°C y 39.5°C. Además, tiene una zona de neutralidad térmica definida por una temperatura crítica inferior de 15°C y una temperatura crítica superior de 30°C. Este rango de temperaturas permite que las pérdidas de calor no dependan de la temperatura ambiental (Villagrà, Blanes, y Torres, 2004).

En la Comunitat Valenciana, la temperatura media durante los 3 años en los que se tomaron las muestras fue de 24.5°C en verano y de 9.2°C en invierno. Tanto el invierno como el verano fueron más cálidos que otros años anteriores (AEMET, 2024). Durante el invierno, la temperatura quedó por debajo del límite crítico inferior, por lo tanto, los conejos activan respuestas fisiológicas y comportamentales como mecanismo contra el frío (Villagrà, Blanes, y Torres, 2004). Esto podría explicar el aumento de los niveles de corticosterona en invierno, ya que los animales destinan parte de su energía a adaptarse a las condiciones climáticas.

#### **4.3 Influencia del año de captura en la concentración de corticosterona.**

**Tabla 7.**

Influencia del año de captura en la concentración de corticosterona.

<b>Año</b>	<b>2016</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>
	4.68 ± 0.679 <sup>a</sup> ng/ml	4.27 ± 0.718 <sup>a</sup> ng/ml	2.60 ± 1.480 <sup>a</sup> ng/ml

*Nota:* <sup>a</sup> Las medias en la misma fila con el mismo superíndice no difieren significativamente. Diferencia significativa  $\alpha=0,05$ . Se muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.

En la tabla 7 se aprecia cómo influyen los diferentes años analizados en el valor medio de la corticosterona. En 2016, la media en la concentración de corticosterona fue de 4.68 ± 0.679 ng/ml. En el 2018, la media fue muy similar, siendo de 4.27 ± 0.718 ng/ml y en el año 2019, el valor medio en la concentración de corticosterona disminuyó ligeramente, siendo de 2.60 ± 1.480 ng/ml. A pesar de ello, los resultados indican que no existe una diferencia notable entre los años en los que se recogieron las muestras. En la figura 16, representa el número de las muestras analizadas en función del año. En el 2016 se muestreó un 33% de los sueros utilizados. En el 2018, un 45% y en el 2019, el 22%.

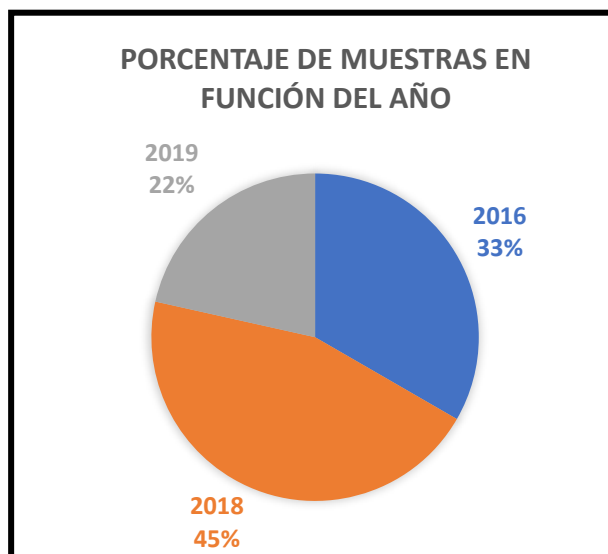


Figura 16.

Porcentaje de muestras en función del año.

Existen múltiples factores que afectan a la calidad de vida de los conejos silvestres y que pueden variar a lo largo de los años. El clima es uno de ellos, los conejos son más abundantes en los lugares más cálidos y disminuye su densidad poblacional cuando aumentan las precipitaciones. Otros factores influyentes son los depredadores y la caza, la presencia de cultivos, el relieve del suelo o la distribución del alimento y el agua (MITECO, 2006).

Para futuros estudios se deberían tener en cuenta todos los factores que influyen en la calidad de vida del conejo y estudiarlos en un periodo de tiempo más prolongado, ya que tres años parecen insuficientes para poder ver una influencia significativa del año sobre la concentración de corticosterona.

#### **4.4 Influencia de la mixomatosis y la EVH en la concentración de corticosterona.**

Tabla 8.

Influencia de la mixomatosis en la concentración de corticosterona.

Mixomatosis	Positivo	Negativo
	$1.28 \pm 2.76^a$ ng/ml	$2.17 \pm 3.22^a$ ng/ml

*Nota:* <sup>a</sup> Las medias en la misma fila con el mismo superíndice no difieren significativamente. Diferencia significativa  $\alpha=0,05$ . Se muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.

En la tabla 8 se observa la relación entre la mixomatosis y la concentración de corticosterona analizada. Se obtuvo una concentración de corticosterona en conejos positivos a mixomatosis de  $1.28 \pm 2.76$  ng/ml y en los animales negativos, la concentración de corticosterona fue de  $2.17 \pm 3.22$  ng/ml. Los resultados muestran que no hay diferencia

estadísticamente notable entre un animal positivo o negativo a mixomatosis. Un 58% de los conejos analizados eran positivos a mixomatosis y un 42% eran negativos, por lo que existe homogeneidad entre los animales positivos y negativos a la enfermedad.

La mixomatosis es una enfermedad que afecta a conejos de cualquier edad. Los conejos adultos desarrollan la forma crónica y menos virulenta de la enfermedad. Actualmente, se consideran resistentes a ella. Los juveniles desarrollan cuadros agudos con mortalidades más elevadas. Y los gazapos adquieren anticuerpos de la leche materna (MAPAMA, 2017). En la figura 17 se observa el porcentaje de muestras positivas a mixomatosis en función de la edad. Los adultos representan el 68% de los conejos positivos mixomatosis. Los gazapos representan el 11%. Los juveniles positivos a la enfermedad representan un 21% del total de las muestras.

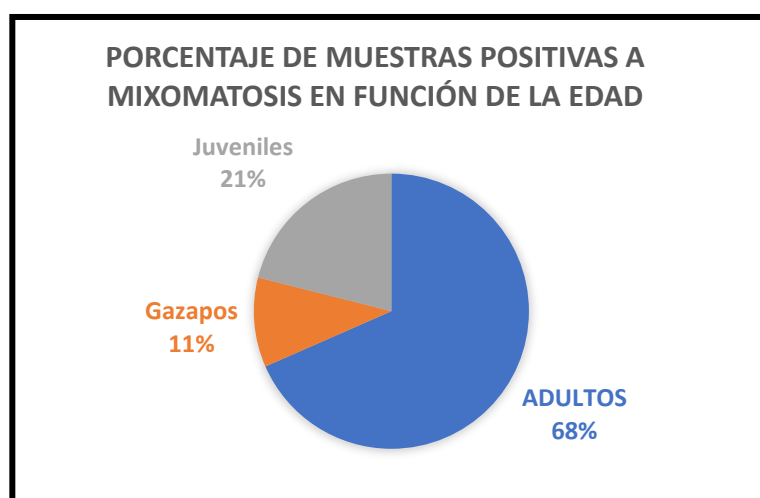


Figura 17.

Porcentaje de muestras positivas a mixomatosis en función de la edad.

Tabla 9.

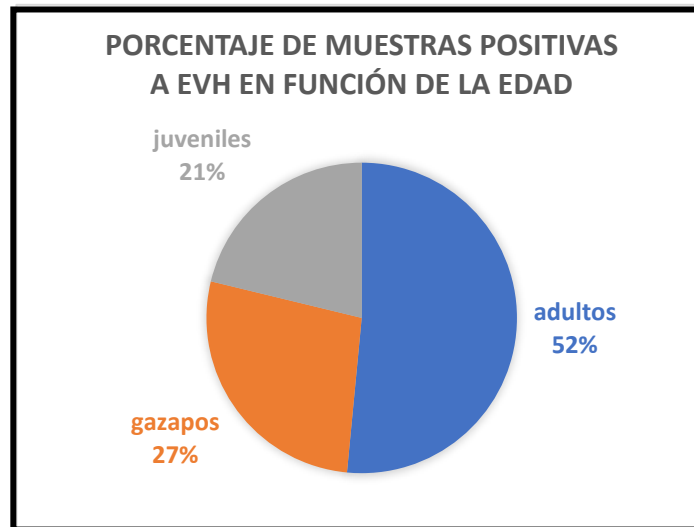
Influencia de la EVH en la concentración de corticosterona.

EVH	Positivo	Negativo
	0.786 ± 3.21 <sup>a</sup> ng/ml	2.671 ± 2.81 <sup>a</sup> ng/ml

*Nota:* <sup>a</sup> Las medias en la misma fila con el mismo superíndice no difieren significativamente. Diferencia significativa  $\alpha=0,05$ . Se muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.

En la tabla 9 se observa la relación entre la EVH y la concentración de corticosterona. Los conejos positivos a EVH tuvieron una concentración de corticosterona de 0.786 ± 3.21 ng/ml, siendo similar a la concentración de los animales negativos, que fue de 2.671±2.81 ng/ml. Estos resultados indican que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre un animal positivo o negativo a EVH. Existe una equidad entre las muestras positivas a EVH y las negativas, siendo el 55% de los conejos positivos a EVH y el 45% negativos.

Las cepas clásicas de EVH generan inmunidad en los gazapos a las pocas semanas. Los adultos mueren casi en el 100% de los casos. Las nuevas cepas generan una inmunidad maternal limitada a 6-8 semanas (MAPAMA, 2017). En la figura 18, se observa el porcentaje de muestras positivas a EVH en función de la edad. Los adultos representaron el 52% de las muestras, los gazapos un 27% y los juveniles representan un 21%.



**Figura 18.**

Porcentaje de muestras positivas a EVH en función de la edad.

En los resultados del estudio, no se observaron diferencias notables en la concentración de corticosterona entre los animales positivos a mixomatosis y EVH y los animales negativos. Esto podría deberse a la inmunidad que presentan los conejos en función de su edad. Los conejos juveniles son más propensos a desarrollar la enfermedad con graves efectos y representan el 21% de las muestras positivas a mixomatosis. En el caso de EVH, los resultados pueden estar influenciados por el desequilibrio en las edades de los conejos muestreados y por la cepa específica que genere la infección. Para poder evaluar la influencia de la mixomatosis y EVH en la concentración de corticosterona en próximos estudios, se recomienda que las muestras sean lo más homogéneas posibles en función de la edad, o que todos los animales analizados en el estudio tengan la misma edad.

Por otro lado, si la infección causada por la mixomatosis y/o EVH es capaz de generar estrés crónico, los pequeños cambios en las concentraciones de los glucocorticoides no se pueden detectar mediante un análisis de sangre. En el estudio realizado por Buijs et al. (2011) se evalúa la concentración de los metabolitos de glucocorticoides fecales para poder medir el estrés crónico en conejos. En otros estudios, como el llevado a cabo por Heimbürge et al. (2019), se utilizan muestras de pelo para evaluar de forma no invasiva el estrés crónico en diferentes

animales. Por lo tanto, sería recomendable para evaluar la influencia de la mixomatosis y EVH en la concentración de corticosterona, analizar otro tipo de muestras como heces o pelo.

#### **4.5 Influencia de la zona geográfica en la concentración de corticosterona.**

**Tabla 10.**

Influencia de la zona geográfica en la concentración de corticosterona.

ZONA	Ribera alta	Pobla de Duc	Montaverner	Cuatretonda	Requena	San Antonio
	8.22 ± 0.865 <sup>b</sup>	4.81 ± 1.182 <sup>ab</sup>	3.58 ± 1.084 <sup>a</sup>	5.33 ± 0.835 <sup>a</sup>	5.57 ± 0.555 <sup>ab</sup>	4.55 ± 1.808 <sup>ab</sup>

*Nota:* <sup>a y b</sup> Las medias en la misma fila con el mismo superíndice no difieren significativamente. Diferencia significativa  $\alpha=0,05$ . Se muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.

En la tabla 10 se aprecia cómo influyen las diferentes zonas geográficas en la concentración de corticosterona. En las muestras de conejos de Ribera Alta, se observó un valor de corticosterona superior a los otros municipios, siendo de  $8.22 \pm 0.865$  ng/ml. En los municipios de Vall d' Albaida, la concentración de corticosterona fue en Poble de Duc de  $4.81 \pm 1.182$  ng/ml, en Montaverner fue de  $3.58 \pm 1.084$  ng/ml y en Cuatretonda el valor fue de  $5.33 \pm 0.835$  ng/ml. En Requena, el valor medio en la concentración de corticosterona fue de  $5.57 \pm 0.555$  ng/ml y en San Antonio el valor fue  $4.55 \pm 1.808$  ng/ml.

Los resultados estadísticos indican que solo existe una diferencia significativa en la concentración de corticosterona entre Cuatretonda y Montaverner con Ribera alta. Poble de Duc, Requena y San Antonio no tienen una diferencia estadísticamente significativa con el resto de las zonas. En la figura 19, se observa el porcentaje de muestras en función de la zona geográfica muestreada. Un 30% de las muestras fueron recogidas en Requena, un 24% en Cuatretonda, un 21% en Ribera alta, un 11% en Montaverner, un 9% en Poble de Duc y un 3% en San Antonio.

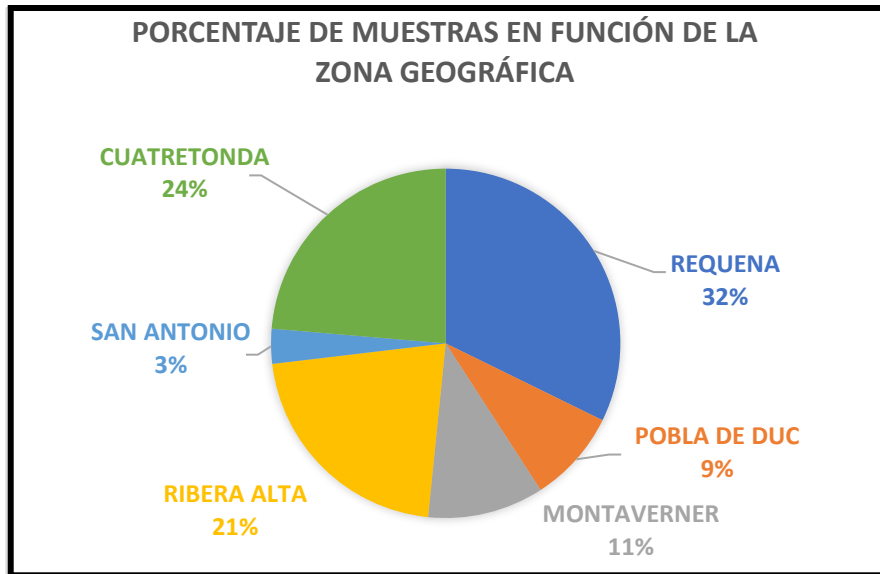


Figura 19.

Porcentaje de muestras en función de la zona geográfica.

Los resultados indican que la concentración de corticosterona es notablemente mayor en la zona de Ribera Alta. Todas las muestras recogidas en Ribera Alta fueron en 2019, por el método de abatimiento y en invierno. En el estudio se ha observado que no existe diferencia estadísticamente significativa en la concentración de corticosterona, ni en el año de muestreo, ni en la estación del año. Por otro lado, los animales capturados por abatimiento tienen concentraciones de corticosterona menores. No se observa una relación de los parámetros estudiados con el aumento de la concentración de corticosterona en Ribera Alta. Los resultados se pueden atribuir a factores del entorno no analizados en este estudio.

Para evaluar la influencia de las zonas geográficas en la concentración de corticosterona en próximos estudios, se recomienda evaluar los diferentes factores ambientales y ecológicos que afectan a la densidad poblacional. Estos serían, la disponibilidad de recursos como el alimento y el agua, la presencia o ausencia de depredadores en la zona, las condiciones climáticas adversas, las actividades humanas como la agricultura y la calidad del hábitat. Este último depende de la disponibilidad de refugio, de la cobertura vegetal y del tipo de suelo que hay en la zona (MITECO, 2006).

#### **4.6 Influencia del sexo en la concentración de corticosterona.**

**Tabla 11.**

Influencia del sexo en la concentración de corticosterona.

SEXO	Macho	Hembra
	5.42 ± 0.697 <sup>a</sup> ng/ml	5.27 ± 0.675 <sup>a</sup> ng/ml

*Nota:* <sup>a</sup> Las medias en la misma fila con el mismo superíndice no difieren significativamente. Diferencia significativa  $\alpha=0,05$ . Se muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.

En la tabla 11, se observa la influencia del sexo de los conejos en la concentración de corticosterona. En los machos el promedio de corticosterona fue de  $5.42 \pm 0.697$  ng/ml y en las hembras la media fue de  $5.27 \pm 0.675$  ng/ml. Los resultados muestran que no existe una diferencia estadística entre ambos sexos. Existe homogeneidad en las muestras analizadas, ya que el 56% de los conejos eran machos y el 44% eran hembras.

Cabezas et al. (2007), realizan un estudio donde se evalúa el nivel sérico de corticosterona y los metabolitos fecales de glucocorticoides en conejos europeos. En sus resultados, no existe diferencia en los niveles séricos de corticosterona entre machos y hembras, respaldando los resultados de este estudio.

#### **4.7 Influencia de la edad en la concentración de corticosterona.**

**Tabla 12.**

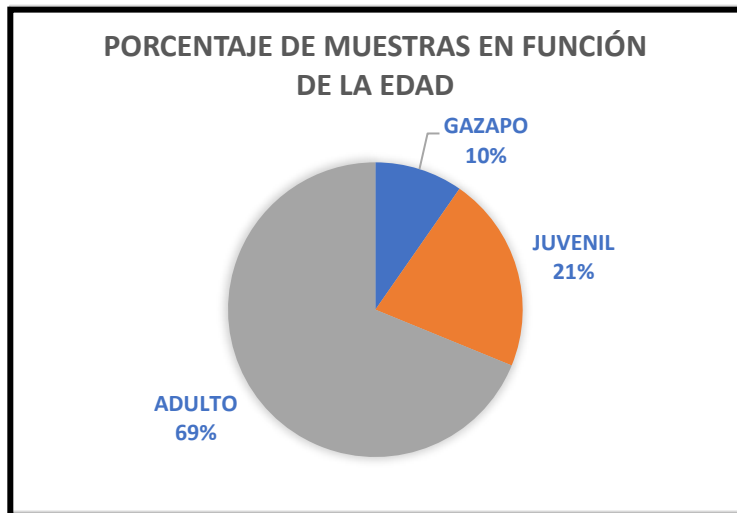
Influencia de la edad en la concentración de corticosterona.

EDAD	Adulto	Juvenil	Gazapo
	5.03 ± 0.756 <sup>a</sup> ng/ml	5.25 ± 0.826 <sup>a</sup> ng/ml	5.75 ± 1.126 <sup>a</sup> ng/ml

*Nota:* <sup>a</sup> Las medias en la misma fila con el mismo superíndice no difieren significativamente. Diferencia significativa  $\alpha=0,05$ . Se muestra la media de mínimos cuadrados y el error estándar.

En la tabla 12, se observa la influencia que tienen las diferentes edades del conejo en la concentración de corticosterona analizada. La media en las tres edades analizadas fue muy similar. La concentración de corticosterona de los conejos adultos fue de  $5.03 \pm 0.756$  ng/ml. En los conejos juveniles fue  $5.25 \pm 0.826$  ng/ml. Los gazapos tenían un valor de  $5.75 \pm 1.126$  ng/ml de corticosterona. Estos resultados indican que no existe una diferencia estadística entre las distintas edades analizadas.

Es importante considerar que la distribución de las muestras recogidas no fue uniforme. El 69% de las muestras pertenecen a conejos adultos, el 21% a juveniles y el 10% corresponde a gazapos (ver figura 20). Es necesario aumentar el número de muestras de conejos juveniles y gazapos para obtener una representación equitativa de las distintas edades en el estudio. La comparación sería más precisa y objetiva.



**Figura 20.**  
Porcentaje de muestras en función de la edad.

## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente Trabajo Final de Grado son:

1. El valor medio de corticosterona analizado en las 93 muestras es de 4.1138 ng/ml. El análisis de la corticosterona en muestras de suero permite obtener información sobre el estrés agudo de los conejos silvestres.

Se propone, para nuevos estudios, utilizar el Kit ELISA específico para la especie estudiada. Esto permite obtener unos valores de corticosterona más precisos. Registrar la hora del día en la que se toman las muestras para tener en cuenta la influencia de los ritmos circadianos en los niveles de corticosterona. Además, se podría considerar analizar por duplicado el 100% de las muestras para aumentar la exactitud de los resultados.

2. De todos los factores analizados, los parámetros que influyen en la concentración de corticosterona son el método de captura y las zonas geográficas. Los animales capturados por trampeo tienen concentraciones de corticosterona superiores al método de abatimiento. Las muestras de Ribera Alta presentan concentraciones de corticosterona más altas que las otras localidades. Los factores que no influyen en la concentración de corticosterona son la edad, el sexo, el año, la mixomatosis, la EVH y la estación del año.

Hay que destacar que existen pocos estudios similares, lo que hace difícil la comparación e interpretación de los datos con otras investigaciones.

Se propone, para nuevos estudios, que el número de muestras en función de cada parámetro sea homogéneo. Se deben considerar otros factores del entorno no estudiados, como el alimento, el agua, la caza, los depredadores, la agricultura o el refugio. Además, se debe analizar la concentración de corticosterona en muestras de heces y de pelo para poder evaluar el estrés crónico. Esto permitirá una evaluación más completa del bienestar animal de los conejos silvestres analizados.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo, B., Delibes Mateos, M., Caro, J., Estrada, A., Mougeot, F., Díaz-Fernández, S., Casas, F., y Viñuela, J. (2013). Efecto de la gestión para las especies de caza menor sobre la fauna no cinegética. *Ecosistemas*, 22(2), 27-32.
- Beltrán, J.F., y Delibes, M. (1991). Ecología trófica del lince ibérico en Doñana durante un periodo seco. *Doñana, Acta Vertebrata*, 18 (1), 113-122.
- Buijs, S., Keeling, J., Rettenbacher, L., Maertens, L., y Tuytens, A. M. (2011). Glucocorticoid metabolites in rabbit faeces. Influence of environmental enrichment and cage size. *Physiology & Behavior*, 104, 469–473.
- Cabezas, S., Blas, J., Marchant, T. A., y Moreno, S. (2007). Physiological stress levels predict survival probabilities in wild rabbits. *Hormones And Behavior*, 51(3), 313-320.
- Castellini, C., Bosco, A. D., Arias-Álvarez, M., Lorenzo, P., Cardinali, R., y Rebollar, P. G. (2010). The main factors affecting the reproductive performance of rabbit does: A review. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 174-182.
- Delibes-Mateos, M., y Gálvez-Bravo, L. (2009). El papel del conejo como especie clave multifuncional en el ecosistema mediterráneo de la Península Ibérica. *Ecosistemas*, 18(3), 14-25.
- Densidades relativas de conejos en España. (2006). *Ministerio Para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico* (MITECO).
- Estadística Anual de Caza. (2019). *Ministerio Para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico*.
- Fernández de Simón, J., Díaz-Ruiz, F., Cirilli, F., Tortosa, F. S., Villafuerte, R., y Ferreras, P. (2014). Role of prey and intraspecific density dependence on the population growth of an avian top predator. *Acta Oecologica*, 60, 1-6.

- Gálvez Bravo, L. (2017). Conejo - *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758). *Instituto de Investigación En Recursos Cinegéticos (IREC, CSIC-UCLM-JCCM)*.
- Hanieh, H., y Sakaguchi, E. (2009). Effect of D-mannitol on feed digestion and cecotrophic system in rabbits. *Animal Science Journal*, 80(2), 157-162.
- Heimbürge, S., Kanitz, E., y Otten, W. (2019). The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General And Comparative Endocrinology*, 270, 10-17.
- Hemsworth, P., Mellor, D. J., Cronin, G. M., y Tilbrook, A. J. (2014). Scientific assessment of animal welfare. *New Zealand Veterinary Journal*, 63(1), 24-30.
- Kurtz, D. M., y Travlos, G. S. (2017). The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. *En CRC Press eBooks*, 58-66.
- Lees, A. C., y Bell, D. (2008). A conservation paradox for the 21st century: the European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*, an invasive alien and an endangered native species. *Mammal Review*, 38(4), 304-320.
- Liste, G., Villarroel, M., Chacón, G., Sañudo, C., Olleta, J., García-Belenguer, S., Alierta, S., y María, G. (2009). Effect of lairage duration on rabbit welfare and meat quality. *Meat Science*, 82(1), 71-76.
- Lombardi, L., Fernández, N., Moreno, S., y Villafuerte, R. (2003). Habitat-related differences in rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*) abundance, distribution, and activity. *Journal Of Mammalogy*, 84(1), 26-36.
- López, M. (2002). El bienestar de la especie cunícola. *Boletín de Cunicultura*, 120(25). Recuperado:[https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf\\_CUNI%2FCUNI\\_2002\\_120\\_completa.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_CUNI%2FCUNI_2002_120_completa.pdf)
- Ma, D., Hernández-Jáuregui, B., Galindo, F., Pérez, R. A. V., Pardo, M. R., y De Aluja, A. S. (2005). Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Veterinaria México*, 36 (3), 325-337.

- Massányi, M., Kohút, L., Argente, M. J., Halo, M., Kováčik, A., Kováčiková, E., Ondruška, Ľ., Formicki, G., y Massányi, P. (2020). The effect of different sample collection methods on rabbit blood parameters. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 27(11), 3157-3160.
- Mercader, J. V., Abad-Somovilla, A., Agulló, C., y Abad-Fuentes, A. (2020). Aproximaciones inmunoanalíticas para el control de xenobióticos y biotoxinas en alimentos. *Arbor*, 196 (795), 542.
- Microsoft Corporation. (2021). Microsoft Excel (Versión 16.0). *Microsoft*. Recuperado de: <https://www.microsoft.com/excel>
- Millspaugh, J. J., y Washbun, B. E. (2004). Use of Fecal glucocorticoid Metabolite Measures in Conservation Biology Research: Considerations for Application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology*, 138, 189-199.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2017). El conejo silvestre en España: Biología, gestión y fomento de sus poblaciones.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Medio Ambiente. (2022). Situación de brote de mixomatosis en liebre ibérica. *Agencia de Gobierno*, 1-4.
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. *Agencia Espacial de Meteorología (AEMET)* (2024). Recuperado de: <https://www.aemet.es/es/portada>
- Mo, C., Ni, S., Cortopassi, E., F., y Ca, O. (2006). Assessment of the physiologic stress response by quantification of fecal corticosteroids. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 45(3), 8-11.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guemene, D. D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., Van Reenen, C., Richard, S., y Veissier, I. (2007). Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*, 92(3), 317-339.

- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2017). Capítulo 3.6.1 Mixomatosis. *Manual Terrestres de la OIE*, 1-20.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2023). Capítulo 3.7.3 Enfermedad Hemorrágica del conejo. *Manual Terrestres de la OMSA*, 1-21.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2024). *Bienestar Animal*. Recuperado de: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/bienestar-animal/>
- Otten, W., Kanitz, E., Couret, D., Veissier, I., Prunier, A., y Merlot, E. (2010). Maternal social stress during late pregnancy affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter systems in pig offspring. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(3), 146-156.
- Palme, R. (2012). Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Animal Welfare*, 21(3), 331-337.
- Piorno, V., Arroyo, B., Delibes-Mateos, M., Castro, F., y Villafuerte, R. (2020). European rabbit hunting: Management changes and inertia in the governance system in a period of population fluctuations. *Journal For Nature Conservation*.
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing (Versión 4.0.5). *R Foundation for Statistical Computing*. Recuperado: <https://www.r-project.org>
- Real Federación Española de Caza. (2023). *Especies cinegéticas*. Recuperado de: <https://www.fecaza.com/caza/especies-cinegeticas/>
- Ríos-Saldaña, C. A., Delibes-Mateos, M., Castro, F., Martínez, E., Vargas, J. M., Cooke, B. D., y Villafuerte, R. (2013). Control of the European rabbit in central Spain. *European Journal Of Wildlife Research*, 59(4), 573-580.

- Rivier, C., y Rivest S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biology of reproduction*, 45, 523-532.
- Rod, A., Harkestad, N., Jellestad, F. K., y Murison, R. (2017). Comparison of commercial ELISA assays for quantification of corticosterone in serum. *Scientific Reports*, 7(1).
- Sanmiguel Plazas, R., Plazas Hernández, F., Trujillo Piso, D., Pérez Rubio, M., Peñuela Sierra, L., y DiGiacinto, A. (2017) Requerimientos para la medición de indicadores de estrés invasivos y no invasivos en producción animal. *Revista de investigación veterinaria Perú*, 29 (1), 15-30.
- Szeto, A., Gonzales, J., Spitzer, S., Levine, J., Zaias, J., Saab, P., Schneiderman, N., y McCabe, P. (2004). Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 861-866.
- Tobajas, J., Descalzo, E., Villafuerte, R., Jiménez, J., Mateo, R., y Ferreras, P. (2020). Conditioned odor aversion as a tool for reducing post-release predation during animal translocations. *Animal Conservation*, 24(3), 373-385.
- Tobajas, J., Ferreira, C., Delibes-Mateos, M., Villafuerte, R., y Zufiaurre, C. R. (2024). Adaptive anti-predatory responses of European rabbits exposed to different predation pressure. *Mammalian Biology*.
- Veissier, I., y Boissy, A. (2007). Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiology & Behavior*, 92(3), 429-433.
- Velasco-Santamaría, Y. M., y Cruz-Casallas, P. E. (2007). Methodology for determination of plasma cortisol in fish using competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *MVZ Córdoba*, 12 (1), 869-877.

Villafuerte, R. (2024). *Oryctolagus cuniculus*. Inventario Español de Especies Terrestres.

Recuperado de:

[https://www.miteco.gob.es/content/dam/mitesco/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/ieet\\_mami\\_oryctolagus\\_cuniculus\\_tcm30-99858.pdf](https://www.miteco.gob.es/content/dam/mitesco/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/ieet_mami_oryctolagus_cuniculus_tcm30-99858.pdf)

Villafuerte, R., y Delibes Mateos, M. (2019). *Oryctolagus cuniculus*. European Rabbit. *The IUCN Red List Of Threatened Species*.

Villagr a, A., Blanes, V., y Torres, A. (2004). Fisiolog a ambiental y bioclimatolog a del conejo. *Asociación Española de Cunicultura (ASESCU)*, 7-16.

Washington, I. M., y Van Hoosier, G. (2012). Clinical Biochemistry and Hematology. *Elsevier eBooks*, (66).

Wilson, J. C., Fuller, S., y Mather, P. B. (2002). Formation and maintenance of discrete wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) population systems in arid Australia: Habitat heterogeneity and management implications. *Austral Ecology*, 27(2), 183-191.

Zomeño, C., Xiccato, G., Filiou, E., Birolo, M., Bertotto, D., Zuffellato, A., Trocino, A. (2017). Comportamiento, miedo y estrés en conejos de engorde: resultados en condiciones de alojamiento inadecuadas. *Asociación Española de Cunicultura (ASESCU)*, 100-105.