



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

“Análisis de los niveles de estrés en aves rapaces mediante la medición invasiva y no invasiva de corticosteroides”

Septiembre 2023

Tesis para obtener el grado de licenciado en Biología

Presenta: Lizandro Olarte Zenteno

Director de Tesis: Dra. Dolores López Morales

Codirector de Tesis: Dr. Andrés Eduardo Estay Stange



Índice

1. Resumen
2. Introducción
3. 2.1 Bienestar animal
4. 2.2 Parámetros para monitoreo de bienestar animal
5. 2.3 Metodologías no invasivas
 6. 2.3.1 Parámetros etológicos
 7. 2.3.2 Parámetros fisiológicos
 8. 2.3.3 Cortisol en saliva, orina, heces y pelo
 9. 2.3.4 Catecolaminas urinarias
- 2.4 Metodologías invasivas
 10. 2.4.1 Parámetros hematológicos
 11. 2.4.2 Hematocrito
 12. 2.4.3 Relación neutrófilos/linfocitos (N/L)
 13. 2.4.4 Proteínas de fase aguda
 - 2.4.5 Cortisol sérico
- 14.2.5 Fisiología del estrés
- 15.2.6 Glucocorticoides como parámetro bioquímico de estrés
 - 2.7 Tráfico de fauna silvestre e importancia de la recuperación y liberación de fauna silvestre
- 16.2.8 Aves rapaces
17. Antecedentes
18. Objetivo general
 - 19.4.1 Objetivos particulares
20. Justificación
21. Hipótesis
22. Materiales y Métodos

- 23.7.1 Obtención y preservación de la muestra
 - 7.1.1 Suero
- 24. 7.1.2 Plumas
- 25. 7.1.3 Heces fecales
- 26.7.2 Cuantificación de corticosteroides
- 27.7.3 Material y métodos para cuantificación de corticosteroides
- 28.Resultados
- 29.8.2 Resultados de pruebas de cortisol
 - 30. 8.2.1 Suero
 - 31. 8.2.2 Plumas
 - 32. 8.2.3 Heces fecales
- 33. 8.3 Análisis estadístico
- 34.Discusión
- 35.Conclusión
- 36.Bibliografía
- 37.Anexo
- 38.12.1 Reactivos y material para metodología
 - 39. 12.1.1 Lista de reactivos para la toma de muestra
 - 40. 12.1.2 Material requerido para la cuantificación de corticosteroides
 - 41. 12.1.3 Análisis estadístico
- 42.12.2 Evidencia fotográfica

1.- Resumen

El estrés se ha utilizado como una medida de monitoreo para el bienestar animal debido a que produce cambios medibles en los niveles funcionales en sistemas como el nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo, específicamente altera la homeostasis interna produciendo cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo y el eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA). El bienestar animal se basa en la relación armoniosa de un animal con el medio en el que se desarrolla. La medición de parámetros bioquímicos se ha considerado como una estrategia invasiva debido a que para obtener la muestra se suele hacer una manipulación especial a los animales. Sin embargo, la medición de hormonas puede llevarse a cabo en muestras cuya obtención no les genere algún dolor y estrés a los animales, lo que los convierte en pruebas no invasivas. Actualmente uno de los grupos amenazados por las tasas de extinción son las aves rapaces, esto debido al tráfico ilegal de especies que ha ido en aumento en las últimas décadas tanto en México como en otras partes del mundo. Este estudio tuvo como propósito evaluar los niveles de bienestar animal a través de la medición de corticosteroides a través de metodologías invasivas y no invasivas en tres especies de aves rapaces, aguililla de Harris (*parabuteo unicinctus*), búho cornudo (*bubo virginianus*) y aguililla cola roja (*buteo jamaicensis*), los cuales se encontraban en condiciones de cautiverio y rehabilitación en el centro de conservación UMA Konkon. Se realizaron análisis de niveles de cortisol en tres tipos de muestras en las aves, suero, plumas y heces fecales. Se utilizó un inmunoensayo absorbente de kit comercial (Mexlab) para la cuantificación de los niveles de cortisol en los tres tipos de muestras. En un total de 18 individuos, los resultados de las pruebas de niveles de cortisol por especie comparando entre los tres tipos de muestras mostraron que en aguililla de Harris los valores de suero y plumas presentan valores similares y relativamente normales (9.495 a 39.431 ng/ul), mientras los valores encontrados en heces fecales resultaron altos (57.841 a 60.807 ng/ul). En el búho cornudo hubo una mayor variación entre los tres tipos de muestras, a excepción de los niveles en plumas donde hubo una mayor estabilidad de los valores (38.584 a 41.316 ng/ul), contrastando a los niveles

de valores de heces donde si existió mayor diferencia (0.074 a 58.519 ng/ul). En la aguililla cola roja los valores más altos de cortisol se dieron en las muestras de suero (40.844 a 54.117 ng/ul) con excepción de un solo individuo (2.152 ng/ul), los niveles en heces resultaron bajos (1.656 a 7.192 ng/ul) y en plumas fueron normales (33.526 a 37.454 ng/ul). En la comparación por tipo de muestra entre las tres especies mostró que en suero los niveles más altos se dieron en aguililla cola roja (49.599 a 54.117 ng/ul), mientras que en aguililla de Harris y búho cornudo se mantuvieron en niveles normales, en las muestras de plumas los niveles de cortisol fueron similares entre las tres especies mostrando niveles normales (25.31 a 41.316 ng/ul) y en las muestras fecales los niveles de cortisol hubo clara diferencia ya que en aguililla de Harris fueron valores altos (57.841 a 60.807 ng/ul) y en aguililla cola roja fueron muy bajos (1.656 a 10.186 ng/ul). Los altos valores de cortisol en suero se pueden explicar de manera pertinente, ya que se le considera una metodología invasiva, caso contrario a los niveles en plumas y heces fecales, donde los niveles fueron más estables, ya que no existió mayor variación, con excepciones en algunos pocos individuos. La variación entre las tres especies también puede interpretarse como una adaptación adecuada a la vida en cautiverio, y ésta puede darse de manera diferente de acuerdo a los individuos de cada especie. Los resultados de esta investigación son relevantes y se pueden tomar como referencia para futuras investigaciones en el campo del bienestar animal, específicamente en grupos de aves rapaces.

2.- Introducción

2.1 Bienestar animal y estrés

El bienestar animal (BA) se basa en la relación armoniosa del animal con el medio en el que se desarrolla. Las alteraciones en esta relación inciden directamente en el estado físico y psicológico del organismo, así como en su capacidad de activar los mecanismos de reparación y defensa del mismo, de forma que las condiciones ambientales adversas producen una respuesta inespecífica que incluye ajustes fisiológicos y metabólicos, con efectos sobre el sistema nervioso central, endócrino e inmune, lo que comúnmente conocemos como estrés. Animales con pobre BA tienden a sufrir inmunodepresión, disminución de la eficiencia reproductiva y cambios en el comportamiento (Romero *et al.*, 2011; Sordillo & Aitken, 2009).

El estrés ha sido utilizado como una medida de la pérdida de BA debido a que produce cambios medibles en los niveles funcionales de los sistemas como el nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo; en especial, altera la homeostasis interna induciendo cambios en la actividad del sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical-HPA (Stockman *et al.*, 2011).

En el ámbito de la producción animal existe una serie de prácticas e interacciones humano-animal que se requieren para el manejo y la mejora de producción animal y la eficiencia de un tratamiento, tales como la manipulación, estrategias nutricionales, medicina preventiva, técnicas quirúrgicas, empleo de corrales y jaulas, y mecanismos y medios de transporte, entre otros. Esto puede implicar incomodidad o incluso dolor para los animales, lo cual puede generar estrés y, por consiguiente, cambios comportamentales y fisiológicos que conllevan a la disminución de su bienestar (Sanmiguel *et al.*, 2018).

2.2 Parámetros para el monitoreo de BA

Los parámetros fisiológicos proporcionan información útil sobre el bienestar animal, los métodos más utilizados son los que miden la actividad del eje hipotalámico-

pituitaria-adrenal (HPA), ya que la respuesta de estrés involucra la activación de este eje y que resulta en una secreción incrementada de glucocorticoides. La concentración de glucocorticoides se puede medir en diversas muestras biológicas, como el plasma, saliva, heces, pelo o pluma, que son las que más se utilizan en este tipo de estudios. Otras medidas fisiológicas como la concentración de oxitocina, longitud de los telómeros, proporción heterófilo:linfocito y proteínas de fase aguda también se utilizan como indicadores de bienestar animal (Stubsjoen *et al.* 2015).

La medición de parámetros bioquímicos tradicionalmente se ha considerado como una estrategia invasiva debido a que la obtención de la muestra suele requerir de manipulación especial de los animales que genera algún tipo de incomodidad o dolor como la extracción de sangre, uso de electrodos de aguja, cateterización, cirugías y biopsias. Sin embargo, la evaluación de hormonas puede realizarse en muestras cuya obtención no implique la manipulación del animal, como es el caso de pelo o heces, lo que los convierte en pruebas no invasivas (Sherif *et al.* 2010)

2.3 Metodologías no invasivas

Los indicadores de estrés no invasivos proporcionan datos que facilitan la repetición de muestreos, puesto que para su colecta no afectan de manera prolongada o permanente las libertades de los animales de acuerdo con los conceptos del Farm Animal Welfare Council (FAWC, 1979). Esta institución, considera que el estado de bienestar de un animal debe cumplir cinco aspectos o libertades: ausencia de hambre y sed, ausencia de incomodidad física y térmica, ausencia de dolor, lesión o enfermedad, ausencia de miedo y estrés, y capacidad para desplegar la conducta normal de la especie (Sanmiguel *et al.*, 2018).

2.3.1 Parámetros etológicos

Condiciones generadoras de estrés promueven respuestas psico endocrinas (Charmandani *et al.*, 2005), donde los animales afrontan cambios comportamentales, muchas veces estereotipados, inherentes a la amortiguación de la respuesta fisiológica. La libertad de miedo es considerada dentro de las cinco

libertades en las pruebas que miden el miedo como indicadores del bienestar animal (Elrom, 2000).

2.3.2 Parámetros fisiológicos

La temperatura corporal, termografía y frecuencia respiratoria pueden funcionar como indicadores de estrés o infección, ya que un cambio de temperatura y frecuencia respiratoria en un organismo indica un cambio homeostático. Para la toma de temperatura corporal es necesario un termómetro infrarrojo para capturar datos en horas específicas del día, de acuerdo con los objetivos de la investigación y teniendo en cuenta el ritmo circadiano del animal (Sharma et al., 2013). La termografía ocular y del dorso también ha sido usada para evaluar estrés en animales de producción. Para medir la frecuencia respiratoria se necesita contar los movimientos torácicos en el transcurso de un minuto utilizando un cronómetro.

2.3.3 Cortisol en saliva, orina, heces y pelo

El cortisol que se mide en muestras de saliva, orina, heces y pelo son metabolitos procesados de la hormona, por lo tanto, no es una muestra pura de cortisol secretada por las glándulas suprarrenales; por consiguiente, su estandarización, interpretación y análisis debe ser especie específica (Hernández-Jauregui et al., 2005). Para cualquiera de las muestras a evaluar, es necesario considerar que los kits comerciales para la medición de cortisol y sus metabolitos deben ser validados con la muestra de la especie objeto de estudio, ya sea mediante radioinmunoensayo o de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA). En aves, los glucocorticoides se producen como corticosterona y el 75% es excretado mediante la orina. Por esta razón el muestreo de heces es útil para identificar corticosterona mediante radioinmunoanálisis, posterior a la separación de la porción blanca y líquida de las heces aviares (Rettenbacher et al., 2004).

2.3.4 Catecolaminas urinarias

Concentraciones urinarias de epinefrina, norepinefrina y dopamina son consideradas indicadores de bienestar animal. Una vez colectada la orina, se

conserva con HCl para estabilizar y conservar las catecolaminas urinarias y se almacenan a -70°C . El análisis se hace mediante un método de fase sólida de intercambio catiónico y determinada mediante cromatografía líquida (O'Neil et al., 2012).

2.4 Metodologías Invasivas

Los indicadores de estrés invasivos requieren manipulación especial de los animales sometidos al experimento que generan algún tipo de incomodidad o dolor como la extracción de sangre, uso de electrodos de aguja, cateterización, cirugías y biopsias, entre otros. Por esta razón se debe tener en cuenta que los datos obtenidos están sujetos a los cambios fisiológicos que generan el estrés agudo en la colecta de muestras y la manipulación de los individuos (Sanmiguel et al, 2018).

2.4.1 Parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos son estudios de gran relevancia en la determinación del estado de salud y el equilibrio metabólico en organismos de vida silvestre y organismos en cautiverio. Para la medición de parámetros sanguíneos se requiere tomar muestras sanguíneas por venipuntura en un tubo con anticoagulante (heparina para química sanguínea y EDTA para hematología) y sin anticoagulante para serología (Sanmiguel at al., 2018).

2.4.2 El hematocrito

Como consecuencia de la contracción esplénica provocada por la liberación de catecolaminas frente a un estresor agudo, el hematocrito es afectado, tanto en mamíferos, como en aves y peces. Este parámetro mide la proporción de eritrocitos en la sangre, cuando el organismo es expuesto a estrés por un tiempo prolongado se puede observar un aumento en el nivel de hematocrito y hemoglobina (Wang et al., 2004).

2.4.3 La relación neutrófilos/linfocitos (N/L)

Esta relación es considerada un indicativo indirecto de niveles de estrés, puesto que el incremento en los niveles elevados de cortisol estimula la producción de neutrófilos inmaduros de la médula ósea a la sangre periférica y disminución de linfocitos, un valor alto en la relación neutrófilo/linfocito indicaría un nivel alto de estrés en el organismo de estudio (Akram et al., 2002).

2.4.4 Proteínas de respuesta de fase aguda

La medición de proteínas de fase aguda es calculada como un porcentaje del contenido de proteínas totales de cada muestra. Es necesario determinar la concentración de proteínas séricas totales con un kit comercial de colorimetría y cuantificación basado en el ácido bicinónico. Las proteínas de fase aguda se determinan mediante un kit comercial de electroforesis para detectar albúmina, basado en la separación electroforética de proteínas en un gel agarosa tamponado (Candiani et al., 2008).

2.4.5 Cortisol sérico

El cortisol es una hormona esteroidea que se libera como respuesta a estrés, se puede medir utilizando muestras de suero y plasma. Un organismo puede producir un exceso de esta hormona cuando está expuesto a intensos factores de estrés. Para evaluar el cortisol sérico (o corticosterona sérica en aves) se requiere una muestra de suero sanguíneo y un kit de radioinmunoensayo competitivo de ELISA (Otten et al., 2010;)

2.5 Fisiología del estrés

Es generalmente aceptado que un animal, confrontado con un estresante (físico o emocional), emplea diferentes sistemas (conductual, nervioso autónomo, neuroendocrino e inmune) para provocar respuestas de estrés para hacer frente a la situación amenazante. Sin embargo, el tipo, intensidad y dinámica temporal de un estresor; su imprevisibilidad; y la percepción del evento por el individuo también juega un papel importante que resulta en diferentes respuestas al estrés. Debido a

la naturaleza compleja de las respuestas relacionadas con el estrés, se recomienda medir una amplia variedad de parámetros para evaluar el estrés de los organismos (Stockman et al, 2011). Los ejes simpático-adrenomedular e hipotalámico-pituitario-adrenocortical (SAM y HPA), median rápidamente las respuestas a estresores a través de la producción de catecolaminas (CA) en neuronas del tronco cerebral y de glucocorticoides (GC) en las glándulas suprarrenales, respectivamente, representando la primera línea de respuestas a estresores en mamíferos y aves (Goyman & Möstl, 1999).

La síntesis y la liberación de GC de la corteza suprarrenal están controladas por ACTH pituitaria (hormona adrenocorticotropa), que está regulada por la hormona liberadora de corticotropina hipotalámica (CRH). Sin embargo, los procesos de la regulación de la secreción de glucocorticoides son complejos. Se ha sugerido que los glucocorticoides pueden permitir estimular o suprimir una respuesta de estrés en curso y preparar el cerebro para un estrés posterior. Los glucocorticoides más importantes y biológicamente relevantes son el cortisol y corticosterona. Los glucocorticoides que se secretan predominantemente varían de una especie a otra. En animales, donde existen ambas hormonas, la relación entre los dos puede cambiar durante diferentes etapas de la vida o después de la estimulación con ACTH. Además, los dos glucocorticoides pueden tener diferentes funciones dentro del cuerpo. Por ejemplo, se informó que la corticosterona domina dentro del cerebro, incluso si el glucocorticoide principal en la circulación periférica es cortisol. Curiosamente, las concentraciones plasmáticas de GC también muestran diferencias pronunciadas de especies, además a la variación individual (Möstle, Palme & Rettenbacher, 2005).

Las hormonas esteroideas circulantes son metabolizadas por el hígado y excretadas como conjugados a través de los riñones a la orina o por la bilis al intestino. Aunque los esteroides en el intestino están sujetos en cierta medida a una circulación enterohepática (es decir, reabsorción en el torrente sanguíneo) y se metabolizan intensamente por la microbiota, la estructura esquelética del esteroide no se degrada. Por lo tanto, específicamente los esteroides se pueden detectar en

las heces de los mamíferos y en los excrementos de aves. Cuando existe un retraso temporal en los procesos de secreción hormonal en el plasma, se considera la aparición de la señal respectiva en las heces, este tiempo de retraso, que depende principalmente del tiempo de tránsito intestinal desde el duodeno hasta el recto, es grande, específico de la especie y debe tenerse en cuenta al comparar patrones endocrinos encontrados en plasma y heces. Considerando estos puntos, es posible utilizar los análisis de metabolitos de las hormonas presentes en las heces fecales como una herramienta no invasiva para evaluar varias funciones endocrinas en mamíferos y aves (Touma & Palme, 2005).

2.6 GC como parámetro bioquímico de estrés

En la mayoría de las investigaciones las hormonas esteroideas y los corticosteroides se miden a partir de muestras de sangre que proporcionan una medida de las concentraciones circulantes de esteroides en plasma (Vasconcellos,2011). Sin embargo, este método tiene algunos inconvenientes y desventajas porque los animales deben ser atrapados y manipulados, lo cual es no siempre es factible o deseado. Particularmente en aves pequeñas, la viabilidad de los estudios monetarios a menudo está limitada por la frecuencia y el volumen de muestras de sangre que pueden ser obtenidas (Möstle, Palme & Rettenbacher, 2005). Además, el manejo provoca estrés, que puede influir en la medición de los valores hormonales, por lo tanto, las muestras de sangre deben recogerse inmediatamente después de la captura para medir los niveles hormonales basales. Los niveles de hormonas plasmáticas reflejan el estado hormonal de un individuo en un determinado momento, si el patrón de liberación de la hormona tiene un fuerte componente pulsátil, una sola muestra de sangre puede no ser suficiente para determinar el estado endocrino de un individuo. Además de las técnicas tradicionales de muestreo de sangre, son deseables los métodos no invasivos, como la medición de metabolitos de esteroides en orina y heces de mamíferos y aves (Goymann,2005).

2.7 Tráfico de fauna silvestre e importancia de la recuperación y liberación de fauna silvestre

En la actualidad las especies están inmersas en una extinción global; muchas están desapareciendo o sus poblaciones disminuyendo, y las aves no son la excepción. En México, 294 especies y 98 subespecies de aves se consideran en alguna categoría de riesgo y se calcula que 429 especies tienen poblaciones que se han reducido en los últimos años (Ortiz-Pulido *et al.*, 2016).

Un propósito actual de científicos y conservacionistas es disminuir las tasas de extinción, en un contexto de escasa información precisa sobre las especies amenazadas y su distribución geográfica, y de la escasez generalizada de recursos económicos y humanos. Ante la gravedad del problema, en la última década han cobrado auge las medidas para determinar las especies prioritarias para la conservación, por un lado, y por el otro, definir los sitios prioritarios para la conservación de las especies prioritarias, empleando métodos que maximicen el número de especies.

El rescate, rehabilitación y reubicación de la fauna silvestre representa probablemente la interacción más importante, intensiva y costosa que la mayoría de las personas pueden tener con la vida silvestre. La motivación detrás de esto indudablemente proviene de buenas intenciones, pero la práctica también se ha convertido un tema de mucha controversia y discusión (Tribe & Brown, 2000).

La evaluación de la idoneidad de un animal para la liberación debe realizarse tan pronto como sea admitido por el tratamiento. Puede ser posible tratar una lesión específica, pero decidir si el animal es capaz de sobrevivir en la naturaleza por cualquier período de tiempo después de la liberación requiere una cuidadosa consideración. Con frecuencia se invierte mucho tiempo, esfuerzo y financiación en las fases de tratamiento y crianza manual de rehabilitación con mucha menos atención a las etapas finales de rehabilitación, incluida la liberación y el monitoreo post liberación.

Cuando una especie figura como amenazada o en peligro de extinción, tomar la decisión de liberar un animal discapacitado es muy difícil. La consulta con las

autoridades de vida silvestre es esencial para decidir si hay potencial para que ese animal contribuya al éxito reproductivo de la especie. Algunos animales pueden ser aptos para el cautiverio, ya que los animales en procesos de rehabilitación y los de vida silvestre pueden ser excelentes herramientas educativas para crear conciencia y ayudar a las comunidades a comprender que pueden ser adecuados para proyectos de cría en cautiverio para disminuir las tasas de extinción (Hall, 2005).

2.8 Aves rapaces

Las aves rapaces están en la parte superior de las cadenas de alimenticias, organismos como ratones, ratas de campo, conejos, ardillas y otros roedores, así como peces, insectos, anfibios y reptiles pueden tener años en los que su población explota debido al buen tiempo y un superávit de alimentos y las aves rapaces se encargan de equilibrar el tamaño de estas poblaciones. Los científicos monitorean las poblaciones de aves rapaces para poder llevar un control del número de estas aves, un aumento en el número de aves rapaces dentro de un ecosistema es un indicador de que alguna especie depredada tenga su población en aumento (Ceballos, 2002).

El Aguilla cola roja (*buteo jamaicensis*) es un ave rapaz de la familia *Accipritidae*, esta ave se distribuye desde el Alaska hasta Centroamerica, abarcando países como Canadá, Estados Unidos, México y Panamá. Esta especie se encuentra en todos los climas de la república mexicana; regularmente habita campos abiertos, bosques, llanuras y zonas montañosas, particularmente habita zonas que le proporcione campo abierto para la caza y sitios altos para posarse, incluso pueden llegar habitar zonas urbanizadas (Preston & Beane, 1993).

Actualmente no se cuenta con datos exactos sobre el tamaño poblacional en México, pero se considera el Buteo más común de norte américa ya que se calcula que el número de ejemplares en invierno en Estados Unidos y Canadá es de 350,000 aves aproximadamente.

Debido a su abundancia y amplia distribución geográfica esta especie es considerada como importante en la regulación de las poblaciones de sus especies-

presa, así como de sus especies competidoras. Esta especie se caracteriza por ser de tamaño grande con alas anchas y cola redondeada, además puede llegar a presentar variaciones de colores en su plumaje, aunque una característica distinta de esta especie es el color rojizo en la parte superior de la cola. En cuanto a su etología se considera una especie muy agresiva ya que defiende vigorosamente su nido y territorio atacando a otras aves rapaces (Marti & Kochert, 1995).

El aguililla de Harris (*parabuteo unicinctus*) perteneciente a la familia *Accipitridae* es un ave rapaz de tamaño mediano que habita casi todo el continente americano desde el sur de Estados Unidos hasta Sudamérica en países como Argentina y Chile. Esta especie habita zonas de ríos y bosques, desiertos de cactus, matorrales y también en zonas urbanizadas donde han llegado a adaptarse para poder anidar ahí.

Se caracteriza por un plumaje pardo oscuro y el final de su cola color blanco, llegan a medir 60 cm de longitud y una envergadura alar de 1,2 metros y un peso promedio de 900 gr., existe un dimorfismo sexual ya que las hembras llegan a ser un 10% más grandes que los machos (López-Lanús *et al.*, 2009).

El aguililla de Harris es caracterizada por su comportamiento de cazar en grupos de tres o más aves a comparación de otras especies de aves rapaces que cazan solas. La naturaleza social de esta especie se ha atribuido a su inteligencia, lo que los hace fáciles de entrenar y los ha convertido en un ave popular para su uso en cetrería.

En los últimos años se han ido perdiendo algunas de sus zonas de hábitat, así mismo esta especie se ha visto amenazada en algunas áreas debido a su captura ilegal para la cetrería, por ello se han hecho intentos para volver a introducir esta especie a dichas zonas para aumentar el número de ejemplares de esta especie (Álvarez, Reyes & Azúa, 2006).

El búho cornudo (*bubo virginianus*) es una de las aves rapaces más comunes que se encuentran en América del norte, puede habitar en desiertos, humedales, bosques, pastizales e incluso en zonas urbanas y otros hábitats semiabiertos entre el ártico y el trópico. Estas aves poseen una excelente visión nocturna ya que contienen muchas células bastón en su retina. Además, pueden girar la cabeza más

de 180° grados en cualquier dirección, esto para una mayor eficiencia a la hora de cazar a sus presas. Son depredadores que pueden llegar a capturar presas grandes, como halcones de las praderas y otros búhos, aunque principalmente se alimentan de ranas, roedores y escorpiones. Existe un dimorfismo sexual en esta especie donde la hembra llega a ser de un mayor tamaño que el macho, y a su vez el macho produce cantos más graves que una hembra. El tamaño de la población ha sido estable entre 1966 y 2019 según la Encuesta de Aves Reproductoras de Norte América. La población mundial actual se estima en 5.7 millones de ejemplares lo que indica que es una especie de baja preocupación para la extinción. A pesar de eso es común que el búho cornudo sea blanco de la caza ilegal en varias partes del continente americano, por eso es de gran importancia emplear estrategias para la conservación de esta especie (Artuso *et al.*, 2013).

3.- Antecedentes

Existen evidencias sobre estudios de cuantificación de glucocorticoides fecales para evaluar respuestas al estrés como el de Touma & Palme (2005) donde realizaron la evaluación de glucocorticoides en aves y mamíferos, obtuvieron muestras fecales de los individuos y posteriormente aplicaron un inmunoensayo enzimático, como resultado observaron que los valores de glucocorticoides se diferenciaban entre una especie y otra, también variaban de acuerdo al sexo, hora del día en que se tomó la muestra y su etapa de vida, otros autores como Vasconcellos *et al* (2011) estudió la fisiología y el comportamiento del lobo de crin a través de métodos no invasivos para evaluar los niveles de glucocorticoides en respuesta al estrés en cautiverio, hizo el análisis de glucocorticoides en muestras fecales húmedas y liofilizadas, aplicó una administración exógena de ACTH (hormona adrenocorticotropa) para demostrar una correlación temporal entre los cambios en las glándulas suprarrenales y cambios en las concentraciones fecales de metabolitos, utilizó un radioinmunoensayo de corticosterona y anticuerpos, y para medir el cortisol utilizó un ensayo enzimático, sus resultados indican que la administración de ACTH sí reflejó cambios en la función suprarrenal a través de los niveles de glucocorticoides que presentaron los lobos en sus muestras fecales.

Kim Young *et al* (2004) realizó un estudio de evaluación de estrés en cinco familias del orden carnívora por medio de metabolitos en heces fecales con ayuda de un radioinmunoensayo, a través del cual se obtuvieron valores altos de los metabolitos fecales en algunos individuos los cuales fueron sometidos a factores estresantes, como administración de anestesia, solución salina y obtención de una muestra de sangre, esto indica que la medición de glucocorticoides en metabolitos fecales es efectiva como monitoreo de bienestar animal no invasivo.

Martínez- Mota (2008) evaluó la actividad adrenocortical a través de muestras fecales en monos aulladores negros en etapa adulta, obtuvo muestras sanguíneas después de aplicar al animal una dosis de ketamina para estimular la actividad adrenocortical (10 mg/kg), utilizó un inmunoensayo enzimático de Cortisol para la determinación de metabolitos en heces fecales (EIA de 11-oxoetiocolanolona), en sus resultados observó que los niveles de metabolitos fecales aumentaron después

de aplicar un factor estresante, alcanzando valores máximos hasta las 96 hrs posteriores a la inducción al factor de estrés.

Otros autores como Möstle, Palme & Rettenbacher (2005) han analizado aspectos comparativos sobre el metabolismo, excreción y medición no invasiva en muestras fecales utilizando como modelos a mamíferos y aves.

Costa *et al* (2016) estudiaron los niveles de corticosteroides en heces fecales de loros grises (*psittacus erithacus*) en cautiverio para determinar sus niveles de estrés. Esto debido a que los loros presentaban daños en plumas, lo cual lo asociaron a un alto nivel de estrés debido a sus condiciones de cautiverio; después de organizar a los loros en 3 diferentes grupos de acuerdo al tipo de crianza que se les dio, realizaron el análisis de metabolitos de glucocorticoides en heces, los resultados demostraron que existe una diferencia en los niveles de glucocorticoides entre los 3 grupos, siendo el grupo donde los loros fueron criados en cautiverio sin cuidado parental los que mostraron niveles más altos de glucocorticoides.

Las investigaciones sobre bienestar animal y análisis de glucocorticoides en aves rapaces son muy escasas hoy en día, tanto para condiciones libres y en cautiverio, esto debido a la complejidad que representa trabajar con estas especies, también en parte a los cuidados y tratamientos que requieren los ejemplares, los cuales en su mayoría son rescatados del tráfico ilegal o que son criados en cautiverio.

4.- Objetivo general

Analizar los niveles de estrés en aves rapaces a través de metodologías invasivas y no invasivas para la determinación de los niveles de corticosteroides en las especies *parabuteo unicinctus*, *bubo virginianus*, *buteo jamaicensis*.

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar los niveles de cortisol en heces fecales de aves rapaces como parámetro indicador de estrés.
- Evaluar los niveles de cortisol en plumas de aves como parámetro indicador de estrés.
- Evaluar los niveles de cortisol en suero de aves rapaces para tener un valor de referencia en la investigación.
- Validar la medición de corticosteroides en muestras obtenidas por métodos no invasivos tomando como referencia los niveles de cortisol obtenidos en suero.

5.- Justificación

El tráfico ilegal de aves sigue siendo una problemática a gran escala en el mundo, esto representa un problema grave ya que afecta de gran manera el estado de bienestar animal de las especies afectadas. La recuperación y rescate de aves de tráfico ilegal es una labor que ayuda a la preservación de especies amenazadas o en peligro de extinción., antes, durante y después de un periodo de rehabilitación es necesario llevar a cabo una evaluación del bienestar animal de estas especies a través de la medición no invasiva de parámetros indicadores de estrés para determinar dicho estado de bienestar animal y si este es idóneo para poder reincorporarlo a su hábitat natural o mantenerlo en cautiverio.

6.- Hipótesis

Los niveles de glucocorticoides en aves rapaces de la UMA Konkon que se encuentran en condiciones de cautiverio y rehabilitación medidos a través de metodologías no invasivas son bajos, mostrando así un nivel de bienestar animal idóneo.

7.- Materiales y métodos

7.1 Obtención y preservación de la muestra

Las muestras biológicas de las aves fueron obtenidas gracias al trabajo en conjunto con la UMA Konkon (Unidad de Manejo Ambiental para la conservación de la Vida Silvestre), que es un programa registrado ante la SEMARNAT en colaboración con la PROFEPA, cuyo objetivo es rescatar y rehabilitar aves rapaces diurnas y nocturnas que han sido confiscadas o decomisadas por el gobierno federal. Se utilizaron 5 organismos de la especie *parabuteo unicinctus*, 6 de la especie *bubo virginianus* y 7 de la especie *buteo jamaicensis*.

7.1.1 Suero

Se recolectaron 5 ml de sangre de cada individuo a través de venopunción, posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 2000 rpm, posteriormente se recuperó el suero y se pasó a un nuevo tubo. Se agregaron 1 uL de inhibidor de proteasas a cada tubo con el suero para evitar la degradación de las muestras. Para evitar periodos de descongelamiento y desnaturalización, se preservaron las muestras en el congelador y se guardaron hasta el día del análisis.

7.1.2 Plumas

Se revisaron los métodos de Løsth *et al.* (2019) y de Azevedo *et al.* (2020) para determinar el procedimiento para obtener y procesar las muestras de plumas de las aves rapaces. Se recolectaron plumas mediante la inspección en el área donde vive cada ave durante las mañanas para ver si dejaron caer una pluma durante el transcurso del día anterior, esto durante 3 días, se llevó a cabo de esta manera para no provocarle un estrés a las aves. Se determinó que solo se recolectarían plumas de más 10 cm de largo por 3 de ancho, ya que las de menor tamaño impide un manejo adecuado para el procesamiento de las muestras. Se fueron recolectando las plumas disponibles de las aves, posteriormente se midieron y pesaron para después almacenarlas en bolsas separadas hasta el día del procesamiento. Para el procesamiento de las plumas se lavaron 2 veces con agua destilada y se secaron

con papel absorbente, también se les cortó el cañón, se cortaron las barbas de las plumas en fragmentos pequeños (menores de 3mm), se tomaron 20 mg del total de cada muestra por individuo, se lavaron 2 veces con 2 ml de metanol al 80% mediante agitación en un vórtex durante 30 segundos. Posteriormente se pusieron a secar las muestras en el horno durante 3 horas a 70°C. Una vez secadas las muestras se molieron con ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino. Después se añadieron 500 ul de metanol al 90% y se mantuvieron en agitación por 30 minutos. Por último, se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 1000 rpm, se recogieron los sobrenadantes para pasarlos a tubos nuevos donde se diluyeron las muestras 1:2 con agua destilada para mantenerlas hasta su análisis.

7.1.3 Heces fecales

Para la toma de muestra de heces fecales se utilizaron unas charolas de papel plástico diseñadas para obtener las muestras, éstas se colocaron debajo de la percha de cada ave por las mañanas hasta la tarde (10:00 hrs – 16:00 hrs) por 3 días. Una vez obtenida la muestra fecal en la charola se recuperaban en un tubo de 5 ml con ayuda de una jeringa y una espátula, esto debido al estado húmedo de las muestras. Posteriormente se pesaron las muestras y se agregaron 1 ml de metanol (60%) por cada 0.5 gramos de muestra fecal (en húmedo), después se pusieron a mezclar en el vortex durante 3 minutos. A continuación, se centrifugaron los tubos con las muestras fecales durante 10 minutos a 3000 rpm. Los sobrenadantes se recuperaron y se pasaron a un tubo nuevo para ser resguardados a –20 °C hasta el día de la aplicación de la prueba (Bienboire-Frosini *et al.*, 2018).

7.2 Cuantificación de corticosteroides

En la mayoría de las investigaciones las hormonas esteroideas y los corticosteroides se miden a partir de muestras de sangre que proporcionan una medida de las concentraciones circulantes de esteroides en plasma. Con el objetivo de medir el estrés en aves rapaces en cautiverio se medirá los niveles de cortisol en suero (método invasivo), plumas y metabolitos fecales de aves (método no invasivo) como parámetro indicador de estrés.

7.3 Material y métodos para cuantificación de corticosteroides

Se utilizó un kit de ELISA para la cuantificación de Cortisol en suero o plasma (MexLab), el kit de cortisol ELISA se utiliza para la detección por ensayo inmunoabsorbente de la asociación enzimática para la detección de anticuerpos de cortisol. Las muestras y el conjugado de cortisol son añadidos a los pozos sensibilizados con anticuerpos monoclonales, el cortisol de las muestras compete con el cortisol del conjugado enzimático por los sitios de unión. El cortisol de las muestras y del conjugado que no se hayan unido son desechados en el lavado de pozos. Posteriormente al agregar el substrato, la intensidad de coloración va a ser inversamente proporcional a la concentración de cortisol en las muestras. La curva estándar formada determina la cantidad de cortisol de cada muestra. Este kit se utilizó para los 3 tipos de muestras diferentes (suero, plumas y heces fecales).

PREPARACIÓN DEL CONJUGADO ENZIMÁTICO DE CORTISOL

Se diluyó el conjugado enzimático concentrado de cortisol en un factor de 1:21 con el diluyente del ensayo en un tubo nuevo. Se preparó una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20x) a 475 ml de agua. Posteriormente se conservó a temperatura ambiente (18-26° C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO INMUNOABSORBENTE

Todas las muestras y reactivos que se utilizaron se pusieron a temperatura ambiente (18-23° C) antes de su uso. Se mezclaron todos los reactivos previos a su uso. Se cortaron el número de pozos que se necesitaban. Los pozos restantes se sellaron y resguardaron en refrigeración de 2-8° C. Se dispensaron 25µl de los estándares de Cortisol, control y muestras en los pozos designados. Adicionalmente se agregaron 200µl del conjugado enzimático de Cortisol en cada pozo. Se mezclaron suavemente los pozos en agitador por 20 segundos. Se puso en incubación a temperatura ambiente (18-23° C) por 60 minutos en cámara húmeda. Posteriormente se retiró el líquido de los pocillos con ayuda de la pipeta y se lavaron los pocillos tres veces con 300 uL de solución de lavado 1X, después se golpeó la placa ligeramente sobre el papel absorbente para asegurarse de que se cayera todo el líquido. Después se agregaron 100 µl de sustrato TMB (3,3',5,5'tetrametilbenzidina) en cada pozo y se puso a incubar a temperatura ambiente (18-23° C) por 15 minutos en cámara húmeda. Para frenar la reacción se agregaron 50 µl de Solución de Frenado (H₂SO₄ 0,16M) en cada pozo. Posteriormente se mezclaron los pozos por 30 segundos en agitación. En este momento hubo un cambio en el color azul a amarillo completamente en los pozos. Por último, se leyó la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 20 minutos después de haber agregado la solución de Frenado.

CALCULO DE RESULTADOS

Para construir la curva estándar se calculó el valor del estándar de Cortisol en cada vial estándar. Después de leer la absorbancia de los controles y de cada muestra desconocida, en la curva se registró el valor de cada control o muestra desconocida. Se trazó la absorbancia de los estándares de Cortisol (eje vertical) frente a concentraciones normales de Cortisol (eje horizontal) en el programa estadístico Prisma 8.

8. Resultados

De un total de 18 individuos entre las 3 especies que se tomaron como objeto de estudio se obtuvieron resultados en los 3 tipos de muestras tal como se muestra en la tabla 1.

| Número | Código | Nombre | Especie | Muestra | | |
|--------|--------|--------|-----------------------------|---------|--------|---------------|
| | | | | Suero | Plumas | Heces fecales |
| 1 | spu1 | CJ | <i>parabuteo unicinctus</i> | + | - | - |
| 2 | spu2 | Ebony | <i>parabuteo unicinctus</i> | + | - | + |
| 3 | spu3 | Kobu | <i>parabuteo unicinctus</i> | + | - | + |
| 4 | spu4 | Shina | <i>parabuteo unicinctus</i> | + | + | - |
| 5 | spu5 | Judini | <i>parabuteo unicinctus</i> | + | + | + |
| 6 | sbv1 | Hermes | <i>bubo virginianus</i> | + | + | + |
| 7 | sbv2 | Midas | <i>bubo virginianus</i> | + | + | + |

| | | | | | | |
|----|------|-------------------|--------------------------|---|---|---|
| 8 | sbv3 | Dorotea | <i>bubo virginianus</i> | + | - | - |
| 9 | sbv4 | Arquímedes | <i>bubo virginianus</i> | + | + | - |
| 10 | sbv5 | Cincho en la pata | <i>bubo virginianus</i> | + | - | - |
| 11 | sbv6 | Vicerys | <i>bubo virginianus</i> | + | - | + |
| 12 | sbj1 | Cédric | <i>buteo jamaicensis</i> | + | - | + |
| 13 | sbj2 | Júnior | <i>buteo jamaicensis</i> | + | - | + |
| 14 | sbj3 | Bellatrix | <i>buteo jamaicensis</i> | + | + | - |
| 15 | sbj4 | Atán | <i>buteo jamaicensis</i> | + | + | + |
| 16 | sbj5 | Narciso | <i>buteo jamaicensis</i> | + | - | - |
| 17 | sbj6 | Gallo | <i>buteo jamaicensis</i> | + | - | - |
| 18 | sbj7 | Odisea | <i>buteo jamaicensis</i> | + | - | - |

Tabla 1. Lista de especies y muestras obtenidas. (+): se obtuvo muestra, (-): no se obtuvo muestra.

Se logró obtener muestras de suero de todos los individuos de las 3 especies, en el caso de plumas solo se obtuvo en 7 individuos y en heces fecales se obtuvieron 9 muestras. Hubo individuos de los cuales se obtuvieron los 3 tipos de muestras como lo son spu5, sbv1, sbv2 y sbj4. Así como individuos con 2 tipos de muestra como spu2, spu3, spu4, sbv4, sbv6, sbj1, sbj2 y sbj3, e individuos con un solo tipo de muestra como spu1, sbv3, sbv5, sbj5, sbj6 y sbj7.

Antes de aplicar la prueba de inmunoabsorción de cortisol a las muestras, se construyó una curva estándar con los viales estándar del kit para poder calcular los datos de concentración de cortisol para cada prueba.

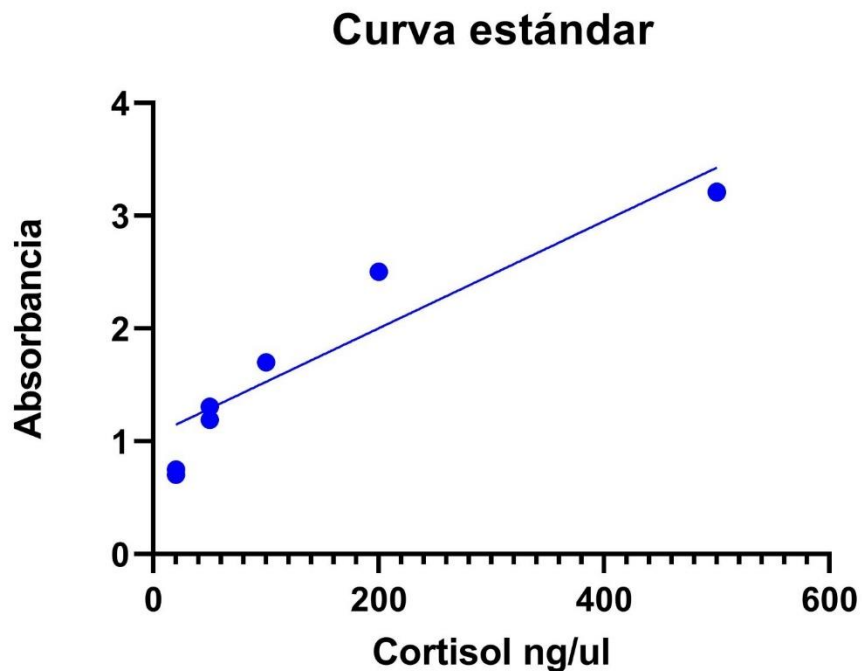


Fig. 1 Gráfica de la curva estándar del kit de cortisol, $R=0.86$.

8.2 Resultados de las pruebas de cortisol

En la especie *parabuteo unicinctus* se tuvieron 5 individuos disponibles en el estudio con 5 muestras de suero, 2 de plumas y 3 de heces. En esta especie se observan

valores de cortisol más altos en las muestras de heces en comparación a las de suero y plumas, además se observa que hubo más variación en las muestras de suero ya que los valores oscilaban entre 9.495 y 35.76 ng/ul, a comparación de los valores obtenidos en heces donde los valores oscilaban entre 57.841 y 60.807 ng/ul. Los valores en plumas fueron de 25.310 a 39.431 ng/ul en esta especie (Fig.1).

***Parabuteo unicinctus*-dispersión**

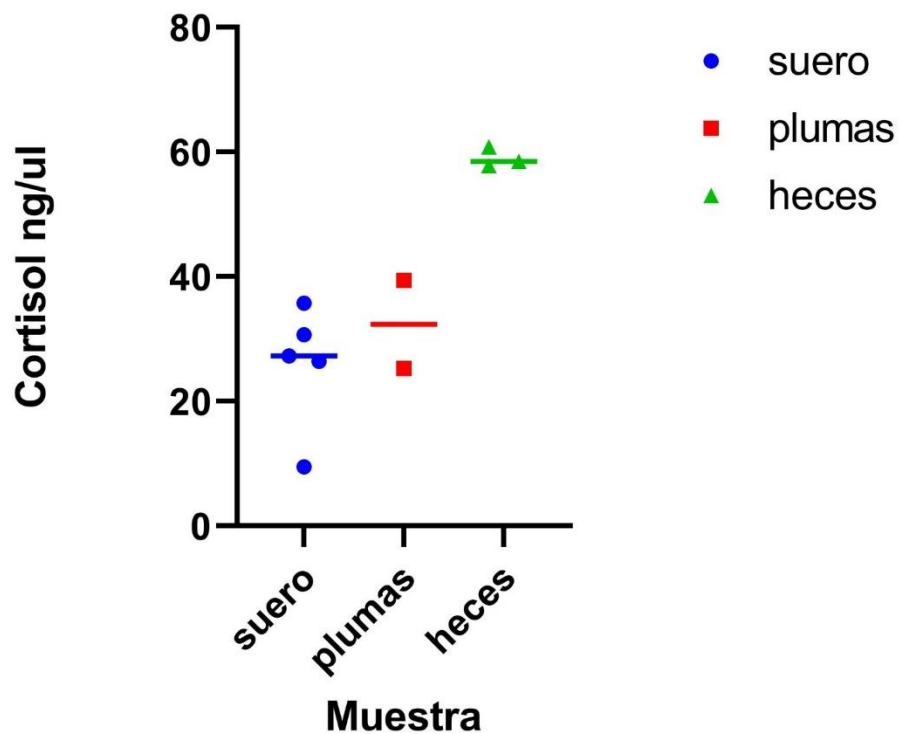


Fig.1 Gráfica de dispersión de los niveles de cortisol en *parabuteo unicinctus*. Los valores de suero y plumas presentan dispersiones similares, mientras que los valores de suero presentan una distribución más alta.

En la especie *bubo virginianus* se observan valores muy variados entre los tres tipos de muestras. En las muestras de heces fecales se presentó una mayor variación,

ya que se obtuvo un valor de 58.519 ng/ul, siendo el más alto en esta especie y también valores muy bajos como 0.074 y 2.136 ng/ul en este tipo de muestra. En los valores obtenidos en plumas fueron muy similares ya que oscilaban entre 38.584 y 41.316 ng/ul, y en los valores obtenidos en las muestras de suero también hubo variaciones ya que el valor más alto fue de 41.973 ng/ul y el más bajo de 0.175 ng/ul (Fig.2).

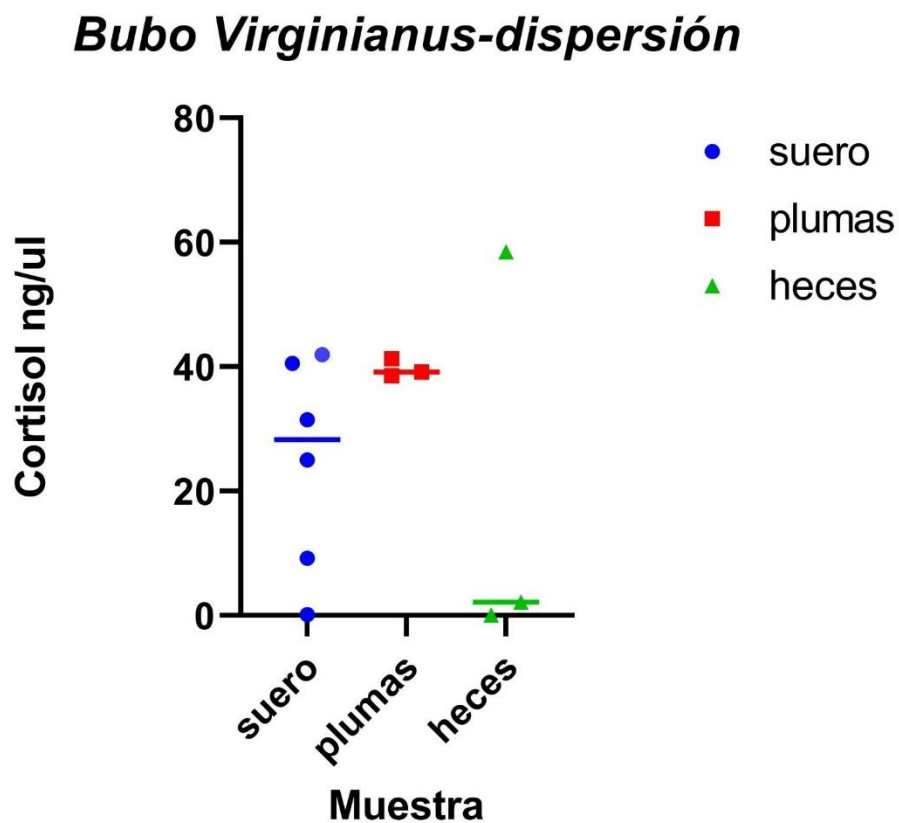


Fig.2 Gráfica de dispersión de los niveles de cortisol en *bubo virginianus*.

Es muy alta la diferencia de dispersión en los valores de heces a pesar de ser solo 3 valores, en suero los valores también varían mucho, contrario a los valores en plumas ya que tienen una distribución similar.

En *buteo jamaicensis* los valores más altos se dieron en las muestras de suero con valores de 40.844 a 54.117 ng/ul, con excepción de un solo individuo que obtuvo un valor de 2.152 ng/ul. En esta especie los valores más bajos se dieron en las muestras de heces ya que van de 1.656 a 7.192 ng/ul. Los valores obtenidos en las dos muestras de plumas fueron similares, con una concentración de 33.526 y 37.454 ng/ul (Fig.3).

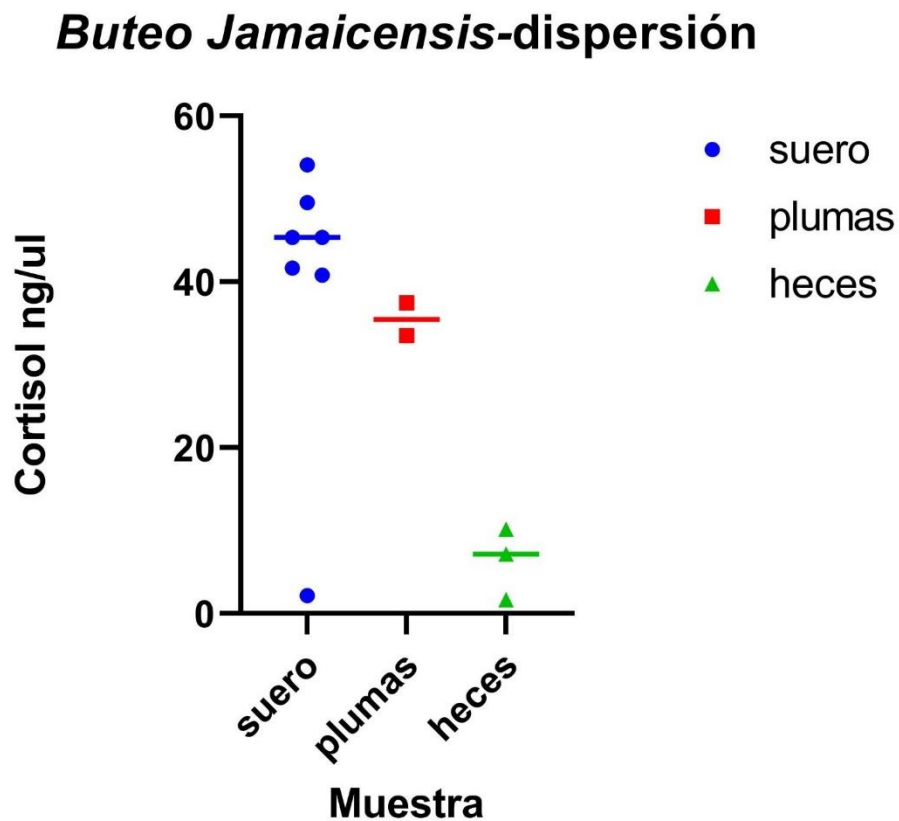


Fig. 3 Gráfica de dispersión de los niveles de cortisol en *buteo jamaicensis*. Los valores de suero tuvieron una dispersión alta a excepción de un individuo, los valores en heces fueron muy bajos y en plumas tuvieron una dispersión media.

8.2.1 Suero

En este tipo de muestra es donde se obtuvieron el mayor número, ya que se logró obtener de todos los individuos disponibles. Después de realizar la cuantificación de corticosteroides se obtuvieron valores positivos de cortisol, estos variaron mucho independientemente de la especie de la cual se obtuvo este tipo de muestra.

Los resultados de cortisol en suero muestran individuos con un valor tan alto como bajo en sus niveles de cortisol. Tal es el caso de sbj7 que obtuvo el valor más alto de cortisol (54.117 ng/ul) que contrasta con sbv5 y sbj5 quienes tuvieron valores muy bajos (0.175 y 2.152 ng/ul respectivamente). También se dieron valores muy similares entre individuos de diferentes grupos, tal es el caso de spu5 y sbv3 con valores de 9.495 y 9.212 ng/ul respectivamente, y los individuos sbv6 y sb2 con 40.561 y 40.844 ng/ul, además de los individuos sbj4 y sbv1 con 41.691 y 41.973 ng/ul (Fig.4).

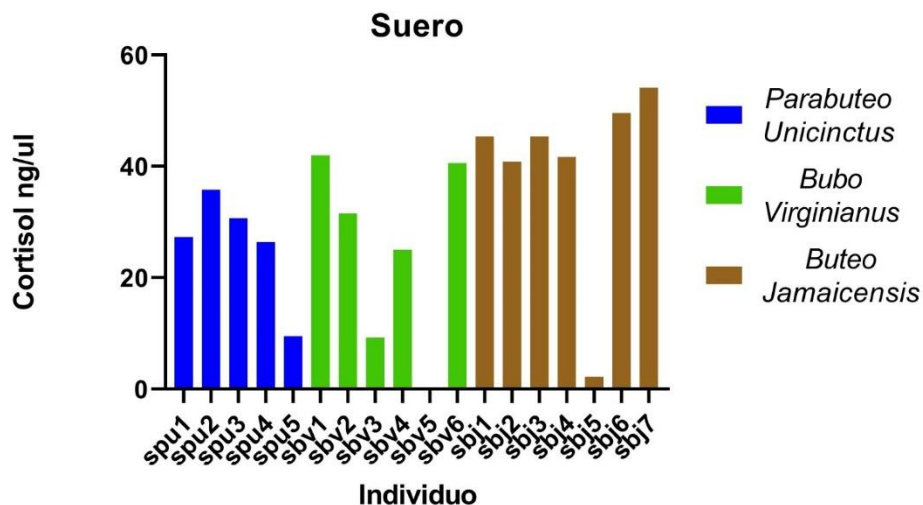


Fig.4 Gráfica de distribución de los niveles de cortisol en suero por individuo.

Los individuos sbv5 y sbj5 mostraron los valores más bajos en la muestra de suero, mientras sbj6 y sbj7 arrojaron los valores más altos en esta muestra.

En la comparación por grupos de especie indica que *buteo jamaicensis* obtuvo valores altos en comparación con *parabuteo unicinctus* y *bubo virginianus*, quienes obtuvieron valores similares entre estas dos especies. Los valores dentro la primera especie muestran cierta homogeneidad ya que marcan valores similares entre sí a excepción de uno solo. En *bubo virginianus* hubo más variación ya que tuvo valores diversos que iban de 0.175 a 41.973 ng/ul, siendo este de los más bajos de entre todas las pruebas. Los valores de *buteo jamaicensis* también presentaron mucha variación ya que dio resultados de 49.599 y 54.117 ng/ul, siendo los más altos, y teniendo un valor de 2.152 ng/ul como el más bajo dentro de esta especie (Fig.5).

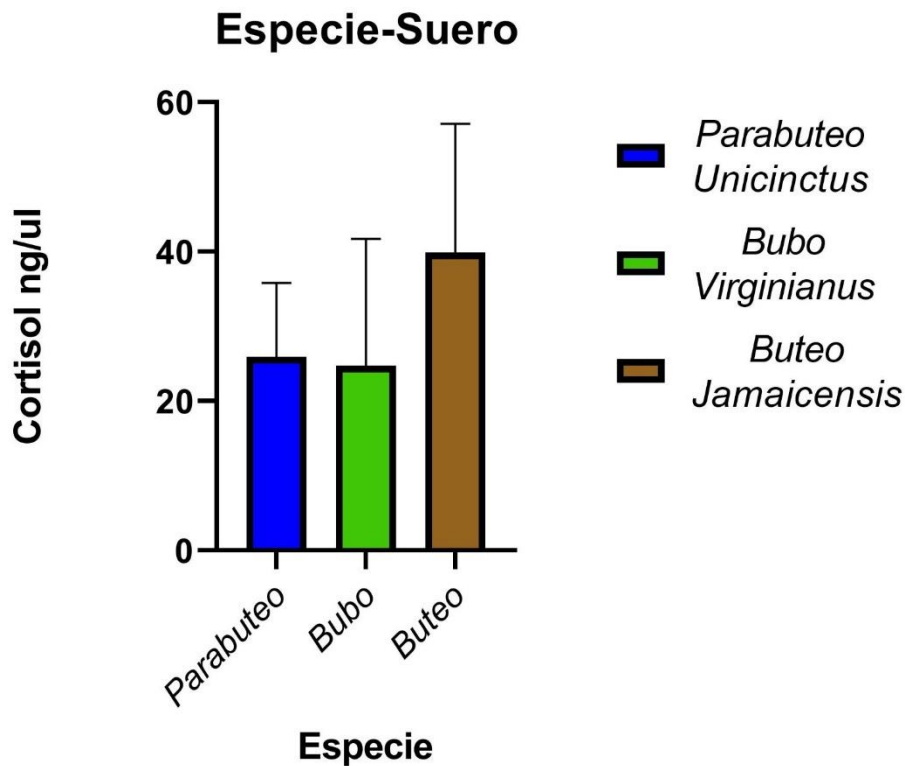


Fig. 5 Gráfica de distribución de los niveles de cortisol en suero por especie. Los valores de cortisol fueron similares en *parabuteo unicinctus* y *bubo virginianus*,

mientras que en *buteo jamaicensis* fueron más altos.

8.2.2 Plumas

En esta prueba se obtuvieron 7 muestras de todos los individuos disponibles, esto pudo haberse debido a que las aves no estaban en temporada de muda, lo cual dificultó la recolección de plumas. Los resultados de esta prueba fueron los más similares entre los 3 tipos de muestras, ya que hubo poca variación entre los 7 individuos de las 3 especies en total de los cuales se pudieron obtener las plumas.

En los valores obtenidos en plumas se puede observar que los valores son similares en la mayoría de los individuos muestreados, tal es el caso de spu5, sbv1, sbv2 y sbj4, quienes obtuvieron valores de 39.431, 38.584, 39.149 y 37.454 ng/ul respectivamente. El valor más bajo lo dio spu4 con 25.31 ng/ul y el más alto sbv3 con 41.316 ng/ul (Fig.6).

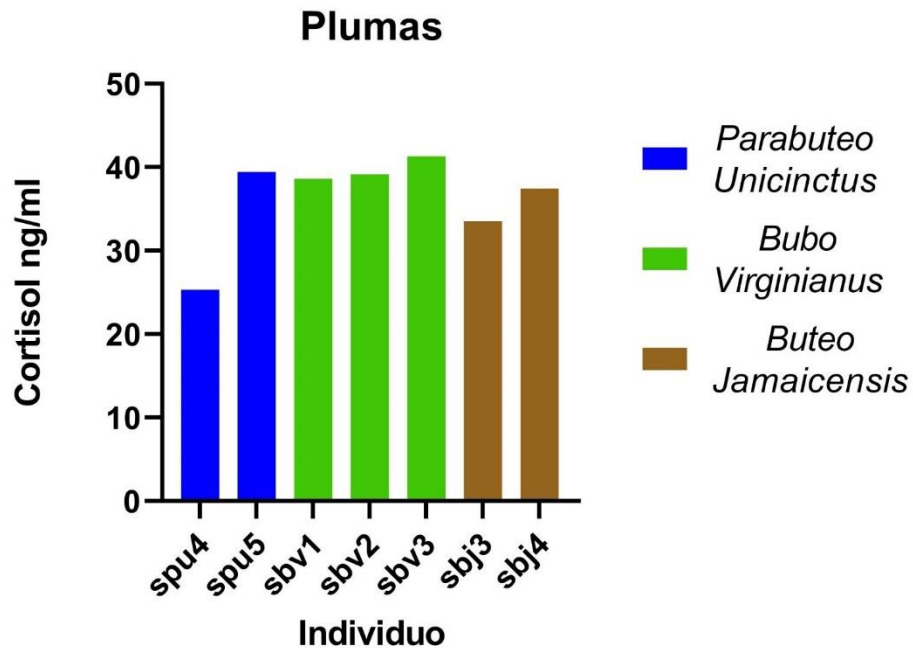


Fig. 6 Gráfica de distribución de los niveles de cortisol en plumas por individuo. Los valores de los individuos en esta prueba fueron similares, hubo variación en dos individuos, estos fueron de diferentes especies, spu4 y sbv3.

Las 3 especies mostraron una mínima variación con valores entre 25.31 y 41.316 ng/ul entre los 3 grupos. Hubo dos valores muy similares entre dos individuos de diferentes especies, spu5 con un valor de 39.431 y sbv2 con 39.149 ng/ul (Fig.7).

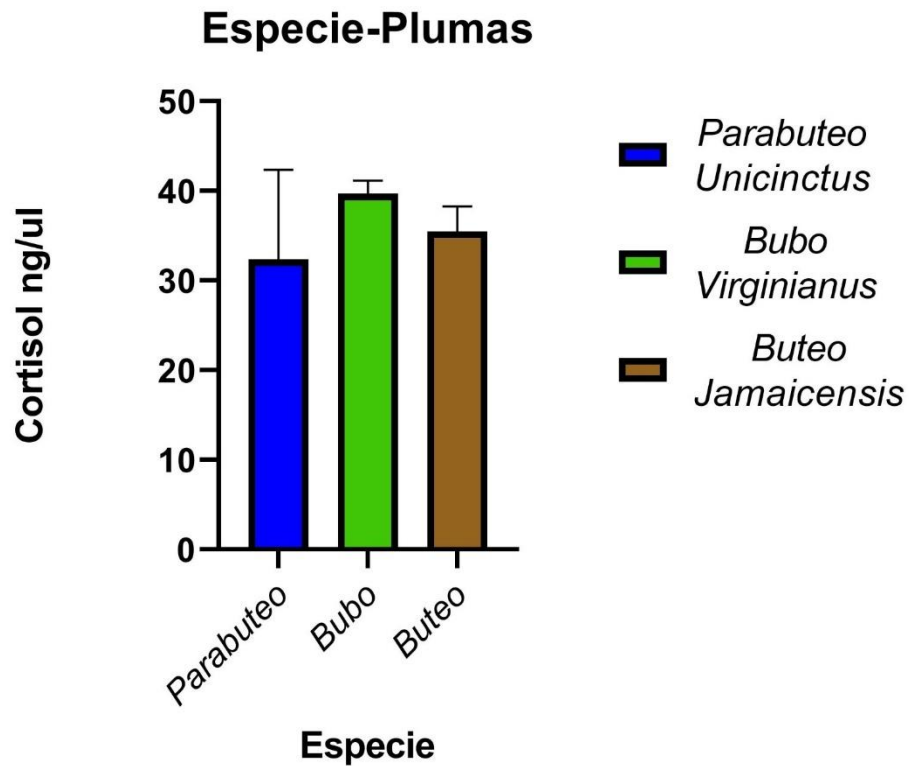


Fig. 7 Gráfica de distribución de los niveles de cortisol en plumas por especie. Los valores en este tipo de muestra fueron similares entre las 3 especies. Fue donde hubo menos variación entre las 3 muestras.

8.2.3 Heces fecales

Para este tipo de muestra se pudo obtener un mínimo de 3 muestras por especie, 9 en total, donde se puede ver que los resultados de *parabuteo unicinctus* fueron más altos y los valores de las otras dos especies disminuyeron drásticamente. En esta

muestra fue donde hubo más variación en general ya que más de la mitad de los individuos arrojaron valores muy bajos.

Existe gran diferencia entre los valores en heces, ya que tenemos individuos con valores muy altos como spu2, spu3, spu5 y sbv1 que van de 58.519 a 60.807 ng/ul (Fig.8).

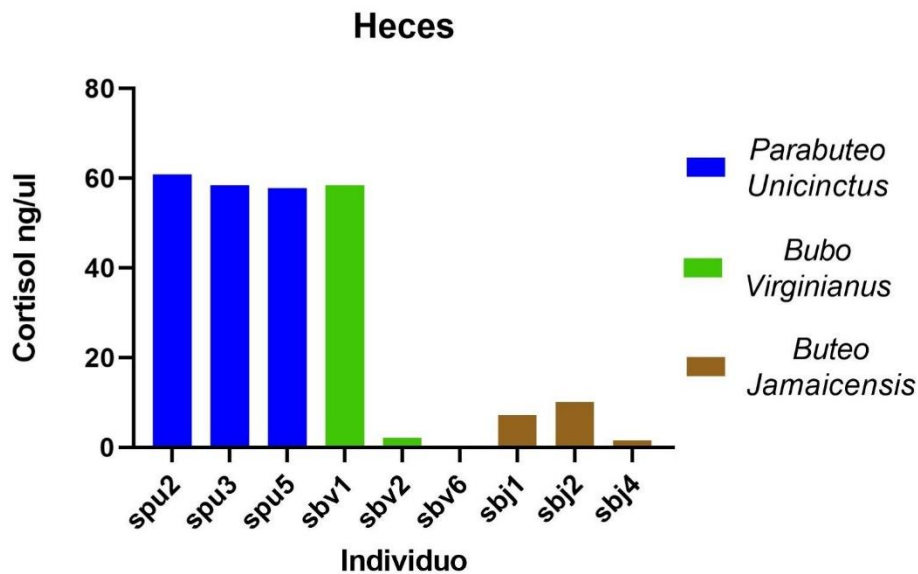


Fig. 8 Gráfica de distribución de los niveles de cortisol en heces fecales por individuo. La diferencia es muy amplia entre los valores de los primeros 4 individuos a comparación del resto.

En este tipo de muestra los valores por especie no variaron mucho en dos especies, solo en la especie de *bubo virginianus* fue donde se dieron valores muy distintos dentro de ella. Los valores más altos en las muestras de heces se dieron en *parabuteo unicinctus*, donde iban de 57.841 a 60.807 ng/ul, mientras que los más bajos se dieron en *buteo jamaicensis*, de 1.656 a 10.186 ng/ul. En cuanto a *bubo*

virginianus sus valores fueron bajos, 0.074 y 2.136 ng/ul, a excepción de sbv1 que dio una concentración de 58.519 ng/ul (Fig.9).

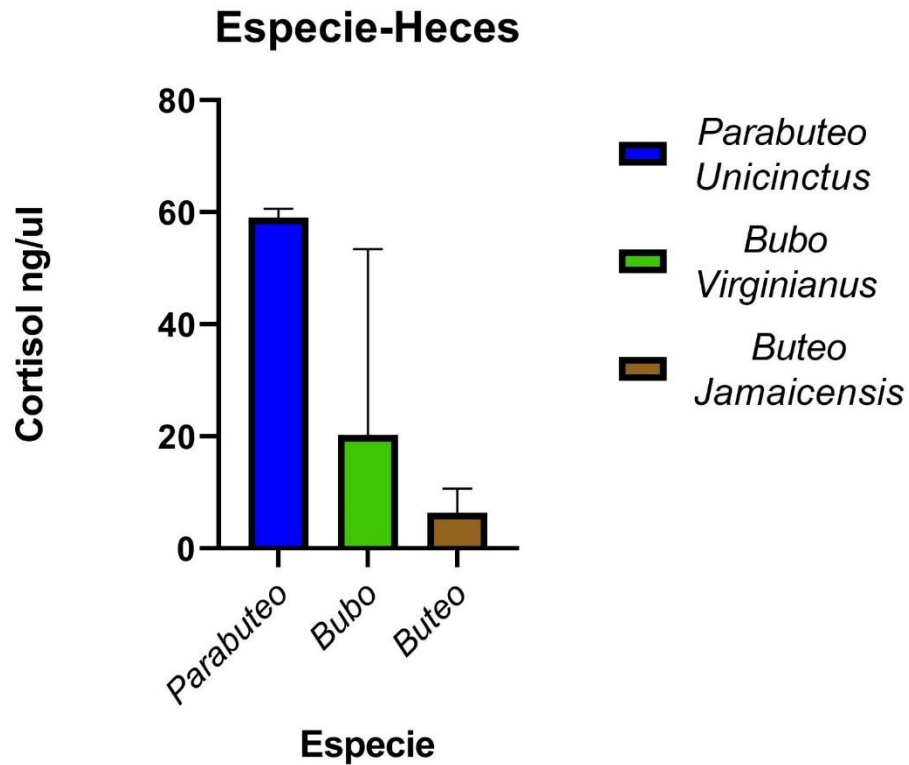


Fig. 9 Gráfica de distribución de los niveles de cortisol en heces fecales por especie. Los valores en esta prueba difirieron bastante en comparación por especies, ya que *parabuteo unicinctus* tuvo valores muy altos en comparación de *buteo jamaicensis*.

8.3 Análisis estadístico

Prueba de Kruskal-Wallis

Para demostrar las diferencias en los valores de corticosteroides entre las especies y los 3 tipos de muestras se llevó a cabo la prueba de Kruskal-wallis. En primer lugar, se analizaron las diferencias en las muestras de suero entre las 3 especies. La prueba arrojó un valor de 0.0494 en P, lo cual indica que, si existe una diferencia significativa entre las 3 especies en las medianas de los valores de suero (Tabla 2), en este caso se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, lo que significa que existen diferencias en las medianas de los 3 grupos de especies en los valores de suero.

| | | |
|----|---|---------------|
| 1 | Table Analyzed | especie-suero |
| 2 | | |
| 3 | Kruskal-Wallis test | |
| 4 | P value | 0.0494 |
| 5 | Exact or approximate P value? | Exact |
| 6 | P value summary | * |
| 7 | Do the medians vary signif. (P < 0.05)? | Yes |
| 8 | Number of groups | 3 |
| 9 | Kruskal-Wallis statistic | 5.769 |
| 10 | | |
| 11 | Data summary | |
| 12 | Number of treatments (columns) | 3 |
| 13 | Number of values (total) | 18 |
| 14 | | |

Tabla 2. Tabla de resultados de especie por muestras de suero. Valor de $p \leq 0.05$ por lo tanto las medianas varían significativamente en esta muestra comparada entre las 3 especies. Valor estadístico de kruskal-wallis (H) = 5.769

Se realizó otro análisis para encontrar diferencias en niveles de corticosterona en las muestras de plumas entre los 3 grupos de especies, el valor de P fue de 0.4190 (Tabla 3), esto señala que no hay diferencia significativa para los 3 grupos de especies en las muestras de plumas, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula.

| | | |
|----|---|---------------|
| 1 | Table Analyzed | especie-pluma |
| 2 | | |
| 3 | Kruskal-Wallis test | |
| 4 | P value | 0.4190 |
| 5 | Exact or approximate P value? | Exact |
| 6 | P value summary | ns |
| 7 | Do the medians vary signif. (P < 0.05)? | No |
| 8 | Number of groups | 3 |
| 9 | Kruskal-Wallis statistic | 2.214 |
| 10 | | |
| 11 | Data summary | |
| 12 | Number of treatments (columns) | 3 |
| 13 | Number of values (total) | 7 |
| 14 | | |

Tabla 3. Tabla de resultados de especie por muestras de plumas. Valor de $p \geq 0.05$ por lo tanto no hay diferencia significativa entre medianas. Valor estadístico de kruskal-wallis (H) =2.214

En el análisis para demostrar diferencias entre las medianas de los niveles de corticosteroides en las muestras de heces en los 3 grupos de especies, se obtuvo un valor de P de 0.1714 (Tabla 4), indicando que no existe una diferencia significativa entre los tres grupos, por lo tanto, se mantiene la hipótesis nula.

| | | |
|----|---|---------------|
| 1 | Table Analyzed | especie-heces |
| 2 | | |
| 3 | Kruskal-Wallis test | |
| 4 | P value | 0.1714 |
| 5 | Exact or approximate P value? | Exact |
| 6 | P value summary | ns |
| 7 | Do the medians vary signif. (P < 0.05)? | No |
| 8 | Number of groups | 3 |
| 9 | Kruskal-Wallis statistic | 3.787 |
| 10 | | |
| 11 | Data summary | |
| 12 | Number of treatments (columns) | 3 |
| 13 | Number of values (total) | 9 |

Tabla 4. Tabla de resultados de especie por muestras de heces. Valor de $p \geq 0.05$ no hay diferencia significativa entre las medianas. Valor de kruskal-wallis (H)=3.787

Se realizaron otras comparaciones, en este caso por especie entre sus tres tipos de muestras, en *parabuteo unicinctus* el valor que resultó P fue de 0.0325 (Tabla 5), lo que demuestra que si existen diferencias significativas en las medianas entre los 3 tipos de muestra en esta especie, por consiguiente se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

| | | |
|----|---|-----------------------------|
| 1 | Table Analyzed | <u>parabuteo unicinctus</u> |
| 2 | | |
| 3 | Kruskal-Wallis test | |
| 4 | P value | 0.0325 |
| 5 | Exact or approximate P value? | Exact |
| 6 | P value summary | * |
| 7 | Do the medians vary signif. (P < 0.05)? | Yes |
| 8 | Number of groups | 3 |
| 9 | Kruskal-Wallis statistic | 5.804 |
| 10 | | |
| 11 | Data summary | |
| 12 | Number of treatments (columns) | 3 |
| 13 | Number of values (total) | 10 |
| 14 | | |

Tabla 5. Tabla de resultados de la especie *parabuteo unicinctus*.

Valor de $p \leq 0.05$ las medianas tienen una diferencia significativa en esta especie comparado con las tres diferentes muestras.
 Valor de kruskal-wallis (H) =5.804

En *bubo virginianus* el valor de P fue de 0.5920 (Tabla 6), esto indica que no existe una diferencia significativa en las medianas de los valores de cortisol entre los 3 tipos de muestra en esta especie, por lo tanto, se mantiene la hipótesis nula.

| | | |
|----|--|------------------|
| 1 | Table Analyzed | bubo virginianus |
| 2 | | |
| 3 | Kruskal-Wallis test | |
| 4 | P value | 0.5920 |
| 5 | Exact or approximate P value? | Exact |
| 6 | P value summary | ns |
| 7 | Do the medians vary signif. (P < 0.05) | No |
| 8 | Number of groups | 3 |
| 9 | Kruskal-Wallis statistic | 1.141 |
| 10 | | |
| 11 | Data summary | |
| 12 | Number of treatments (columns) | 3 |
| 13 | Number of values (total) | 12 |

Tabla 6. Tabla de resultados de la especie *bubo virginianus*.
 Valor de $p \geq 0.05$ no hay diferencia significativa entre las medianas en esta especie.
 Valor de kruskal-wallis =1.141

En la especie *buteo jamaicensis* el análisis de medianas entre los 3 tipos de muestra arrojó un valor de P de 0.0399 (Tabla7), lo que significa que si existe una diferencia

significativa entre las medianas de los 3 grupos de muestra en esta especie, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

| | | |
|----|---|-------------------|
| 1 | Table Analyzed | buteo jamaicensis |
| 2 | | |
| 3 | Kruskal-Wallis test | |
| 4 | P value | 0.0399 |
| 5 | Exact or approximate P value? | Exact |
| 6 | P value summary | * |
| 7 | Do the medians vary signif. (P < 0.05)? | Yes |
| 8 | Number of groups | 3 |
| 9 | Kruskal-Wallis statistic | 5.567 |
| 10 | | |
| 11 | Data summary | |
| 12 | Number of treatments (columns) | 3 |
| 13 | Number of values (total) | 12 |

Tabla 7. Tabla de resultados de la especie *buteo jamaicensis*. Valor de $p \leq 0.05$ si existe una diferencia significativa entre las medianas en esta especie comparado entre los tres tipos de muestra. Valor de kruskal-wallis =5.567

9. Discusión

Este estudio se centra en la evaluación de los niveles de cortisol para determinar los niveles de corticosteroides que se asocian al nivel de bienestar animal en tres especies de aves rapaces en cautiverio haciendo un comparativo entre métodos invasivos y no invasivos, específicamente en suero sanguíneo y plumas y heces fecales, respectivamente.

Tras una exhaustiva búsqueda sobre estudios de diferentes ámbitos sobre los niveles de cortisol en *parabuteo unicinctus*, *bubo virginianus* y *buteo jamaicensis* en artículos, libros, publicaciones, además de plataformas y bases de datos especializadas en bioquímica como pubmed, ebsco, y Jstor, se encontraron solo 2 registros de este tipo de estudios, uno en la especie *parabuteo unicinctus* y otro en una especie del género *buteo*, lo cual refleja la complejidad de poder realizar dichos estudios en este grupo de aves. En el estudio en *parabuteo unicinctus* donde se describen sus parámetros hematológicos comparando dos grupos de aves de esta especie de diferentes localidades tropicales y altitudes, a diferencia de este estudio, esta investigación se centra en la descripción de parámetros hematológicos como la medición de eritrocitos, basófilos y la proporción heterófilos linfocitos para estandarizar los niveles en ejemplares sanos en cautiverio. La información de este estudio es de importancia para esta especie ya que se basa en el análisis de aves sanas en cautiverio y en un futuro pueda servir para que se pueda proporcionar diagnósticos y cuidados veterinarios adecuados para garantizar la salud de las aves de esta especie (Herrera *et al.* 2020). En una investigación sobre en algún modelo en específico es de gran importancia tener referencias de trabajos realizados en especies específicas para poder llevar a cabo una comparación de los resultados y así darles una interpretación más correcta y acertada. Dado el caso de que solo existen pocos antecedentes en este tipo de especies se hará comparaciones a nivel interespecie y otros grupos de aves en estudios clínicos veterinarios. El caso de *buteo rufinus* debe tomarse en cuenta, ya que es del mismo género que *buteo jamaicensis* siendo lo más cercano a cuanto especie, en esta especie también se evaluaron sus parámetros bioquímicos hematológicos y séricos en condiciones de

cautiverio, la importancia radica en que los resultados de este estudio se pueden tomar como referencia para delimitar valores de evaluación de la salud por parte de los ornitólogos y médicos veterinarios, para posteriormente poder desarrollar criterios de rehabilitación y liberación de esta especie (Kordestani *et al.* 2022).

Retomando la importancia de la comparación entre métodos invasivos y métodos no invasivos, en este caso, los resultados de las muestras de suero sanguíneo con los resultados de heces y plumas, para poder determinar la relevancia de los métodos no invasivos en la medición del bienestar animal. En la especie *Parabuteo unicinctus* los valores de suero y plumas oscilaban entre niveles similares y los valores de heces eran más altos, en *Bubo virginianus* se presenta un patrón de resultados similar, ya que los valores de suero y plumas eran similares, a diferencia de que los valores de heces eran bajos y un solo individuo presentó niveles altos de cortisol en esta muestra. En la especie *Buteo jamaicensis* existe una mayor variación entre muestras debido a que los valores de suero son altos, los valores de plumas se mantienen a un nivel intermedio (contrastando con los otros dos tipos de muestras) y los valores de heces son bajos, siendo única esta especie que presenta esos niveles de valores en este tipo de muestra, esto concuerda con los resultados de Häffelin *et al* (2020), quienes realizaron la medición de corticosterona en plumas de gallinas ponedoras (spp.) para validar un ensayo para la evaluación del bienestar animal; sus resultados muestran niveles que oscilan entre 19.3 y 80.02 ng/ul lo que indica que también presentó una amplia variación entre los valores de corticosterona en las plumas de las gallinas, además, los autores concordaron que esta herramienta es válida para poder determinar el estado de bienestar animal de las aves. En estudios realizados a través de inmunoensayos enzimáticos en *amazona aestiva* en condiciones de cautiverio y de vida libre, se obtuvieron valores de cortisol más altos fue en los loros de vida libre que en los de cautiverio (18.5 a 157.9 ng/g, $p \leq 0.5$). Los autores refieren que estos resultados pueden deberse a una respuesta adaptativa para su supervivencia en condiciones de vida silvestre, caso contrario a animales cautivos, ya que, en éstos, los niveles bajos de cortisol pueden indicar una adaptación al cautiverio (Vidal *et al.* 2019). Esto corrobora los niveles bajos de cortisol en heces en *buteo jamaicensis* y *bubo virginianus*, lo que indica que estas

especies se han adaptado mejor a su vida en cautiverio, contrario a *parabuteo unicinctus* que presenta una capacidad adaptativa más baja a su vida en cautiverio. Haciendo un análisis global, los valores de suero se mantuvieron en niveles altos, mientras que en los valores de plumas y heces hubo una mayor variación habiendo valores altos y bajos entre las tres especies, esto podría deberse a la obtención de la muestra de suero, donde existe una manipulación directa de los ejemplares pudiendo ocasionar algún estrés en las aves, otro factor que pudo haber influido es la temporalidad de las muestras, esto debido a que fueron tomadas los diferentes tipos de muestras en días distintos. Esto puede contrarrestarse con los resultados de las muestras de plumas y heces que, a pesar de tener algunos valores altos, la mayoría se mantuvieron en niveles bajos de cortisol, lo que indica que estas aves tienen un nivel de bienestar animal adecuado y se han ido adaptando a su vida en cautiverio.

Otro factor que pudo haber influido en los resultados es la repetibilidad de los niveles de glucocorticoides en un mismo individuo, en 2018 Taff, Schoenle & Vitousek realizaron un estudio donde a través de un metanálisis evaluaban la repetibilidad de los niveles de glucocorticoides en un individuo para poder explicar los patrones generales de repetibilidad y para probar las relaciones entre las covariables y las estimaciones de repetibilidad, en 203 estimaciones de repetibilidad de glucocorticoides dentro de un individuo, encontraron niveles moderados de repetibilidad y que ésta también varía dependiendo del tipo de muestra. También indican que, a pesar de la repetibilidad significativa, hubo una heterogeneidad sustancial en las estimaciones de diferentes estudios, lo que sugiere que la repetibilidad de la secreción de glucocorticoides varía esencialmente entre sistemas y condiciones.

Un punto importante a tomar en cuenta es que las mediciones de glucocorticoides en tejidos no sanguíneos (plumas, heces, pelo, etc.) pueden llegar a presentarse como un reflejo imperfecto de las concentraciones que se podrían encontrar en sangre, ya que las concentraciones sanguíneas son las que interactúan directamente con los receptores que provocan los cambios biológicos en las

especies. Además de que las altas elevaciones de glucocorticoides en un animal pueden reflejar un afrontamiento adecuado a un factor estresante lo que indica que el animal responde a su homeostasis correctamente (Romero & Beattie, 2022). Esto de acuerdo a la interpretación que se llegue a dar a los resultados, ya que se establecen distintos parámetros y condiciones en los diseños experimentales a la hora de llevar a cabo las investigaciones.

Es muy importante tener en cuenta que los ejemplares que se utilizaron en esta investigación se encuentran en condiciones estables dentro de conservación y rescate animal, así como en un buen estado de salud ya que se les brinda los cuidados necesarios para que sigan con su adecuada rehabilitación. La importancia de los resultados de este estudio radica en que es fundamental seguir avanzando en las investigaciones sobre el manejo en organismos recuperados del tráfico ilegal, así como los que se encuentran en rehabilitación, para poder tener referencias científicas y sentar fundamentos sobre el cuidado y preservación de estas especies que son fundamentales en las estructuras de las cadenas alimenticias y los ecosistemas.

10. Conclusiones

El estudio demuestra que se pueden medir los niveles de corticosteroides en suero de las especies *parabuteo unicinctus*, *bubo virginianus* y *buteo jamaicensis*. Se muestra que los parámetros normales en suero en la especie *parabuteo unicinctus* no se diferencian mucho con respecto a los niveles encontrados en heces y plumas. Caso contrario a *bubo virginianus* y *buteo jamaicensis* donde los resultados no muestran consistencia entre los tres tipos de muestras. Además, existe una importante variación entre los niveles de corticosteroides en suero entre dos especies (*parabuteo unicinctus* y *bubo virginianus*) respecto a *buteo jamaicensis*, a pesar de las diferencias de valores entre los resultados se determinó de manera general que el nivel de bienestar animal los ejemplares estudiados se encuentran en niveles adecuados y estables. Se debe sacar el máximo provecho a las metodologías no invasivas, ya que se pudo comprobar a través de este estudio que son alternativas bastante eficaces para este tipo de investigaciones. Los resultados de esta investigación son relevantes y se pueden tomar como referencia para futuras investigaciones en el campo del bienestar animal, específicamente en grupos de aves rapaces.

1. Bibliografía

Akram M, Zia-ur-rahman C, Kim S. 2002. Effect on the induced molting on the relative weights and hormone levels of thyroid, ovary and adrenal glands in spent laying hens. *Korean J Poult Sci* 29: 243-247.

Artuso, C., Houston, C. S., Smith, D. G., & Rohner, C. (2013). Great Horned Owl (*Bubo virginianus*), version 2.0. *The Birds of North America*, Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York, USA. <https://doi.org/10.2173/bna>, 372.

Azevedo, A., Wauters, J., Kirschbaum, C., Serra, R., Rivas, A., & Jewgenow, K. (2020). Sex steroids and glucocorticoid ratios in Iberian lynx hair. *Conservation physiology*, 8(1), coaa075.

Álvarez, G. G., Reyes, S. R., & Azúa, G. R. V (2006). *Falconiformes mexicanas, comercio y uso en la cetrería*.

Bienboire-Frosini, C., Alnot-Perronin, M., Chabaud, C., Asproni, P., Lafont-Lecuelle, C., Cozzi, A., & Pageat, P. (2018). Assessment of commercially available immunoassays to measure glucocorticoid metabolites in African Grey Parrot (*Psittacus Erithacus*) droppings: a ready tool for non-invasive monitoring of stress. *Animals*, 8(7), 105.

Candiani D, Salamano G, Mellia E, Doglione L, Bruno R, Thoussaint M, Gruys E. 2008. A combination of behavioral and physiological indicators for assessing pig welfare on the farm. *J Appl Anim Welf Sci* 11: 1-13.

Ceballos, G., Gómez de Silva, H., & Arizmendi, M. C. (2002). Áreas prioritarias para la conservación de las aves de México. *Biodiversitas*, 41(1), 7.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress responses. *Annu Rev Physiol* 67: 259- 284. doi: 10.1146/annurev.physiol.- 67.040403.120816.

Costa, P., Macchi, E., Valle, E., De Marco, M., Nucera, D. M., Gasco, L., & Schiavone, A. (2016). An association between feather damaging behavior and corticosterone metabolite excretion in captive African grey parrots (*Psittacus erithacus*). *PeerJ*, 4, e2462.

Elrom K. 2000. Handling and transportation of broilers - welfare, stress, fear and meat quality. Part III. Fear; definitions, its relation to stress, causes of fear, responses of fear and measurement of fear. *Israel J Vet Med* 55: 3.

Goymann, W. (2005). Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 35-53.

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(3), 340-348.

Hall, E. (2005, August). Release considerations for rehabilitated wildlife. In *Australian National Wildlife Rehabilitation Conference. Surfers Paradise* (pp. 1-12).

Häffelin, K. E., Lindenwald, R., Kaufmann, F., Döhring, S., Spindler, B., Preisinger, R., ... & Andersson, R. (2020). Corticosterone in feathers of laying hens: An assay validation for evidence-based assessment of animal welfare. *Poultry science*, 99(10), 4685-4694.

Hernández-Jauregui D, Galindo F, Valdés R, Romano M, Schuneman A. 2005. Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Vet Mex* 36: 325-337.

Herrera-Barragan, J. A., Rodriguez-Hernandez, F., Camarillo-Flores, R., Quintero, G. E., Gual-Sill, F., & Perez-Rivero, J. J. (2020). Harris's hawks (*Parabuteo unicinctus*) hematological parameters in different tropical locations. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 11, No. 3, p. 281). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Keay, J.M., Singh, J., Gaunt, M.C., & Kaur, T. (2006). Fecal glucocorticoids and their metabolites as factors of stress in various mammalian species: a literature review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37(3),234-244.

Kordestani, H., Abdi-Hachesoo, B., Bakhshaei, F., Safaeian, S., & Nazifi, S. (2022). Hematological and serum biochemical parameters of the captive long-legged buzzard (*Buteo rufinus*) in Iran. *Veterinary Medicine and Science*, 8(5), 1958-1964.

Løseth, M. E., Briels, N., Eulaers, I., Nygård, T., Malarvannan, G., Poma, G., ... & Jaspers, V. L. (2019). Plasma concentrations of organohalogenated contaminants in white-tailed eagle nestlings—The role of age and diet. *Environmental Pollution*, 246, 527-534.

López-Lanús, B., Unterkofler, D., Ornstein, U., del Sastre, V., Jensen, R. M., & Herrera, P. (2009). Diversidad y estado de conservación de las aves de los Bajos Submeridionales (AICA SF03): Informe de Aves Argentinas/AOP para la Fundación Vida Silvestre Argentina. *Departamento de Conservación. Aves Argentinas/AOP, Buenos Aires*.

Marti, C. D., & Kochert, M. N. (1995). Are red-tailed hawks and great horned owls diurnal-nocturnal dietary counterparts?. *The Wilson Bulletin*, 615-628.

Martínez-Mota, R., Valdespino, C., Rebolledo, J. A. R., & Palme, R. (2008). Determination of fecal glucocorticoid metabolites to evaluate stress response in *Alouatta pigra*. *International journal of primatology*, 29(5), 1365-1373.

MÖSTL, E., RETTENBACHER, S., & Palme, R. (2005). Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: an analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 17-34.

O'Neill, H. A., Webb, E. C., Frylinck, L., & Strydom, P. (2012). Urinary catecholamine concentrations in three beef breeds at slaughter. *South African Journal of Animal Science*, 42(5), 545-549.

Ortiz-Pulido, R., Alcántara-Carbaja, J. L., Cueva, H. D. L., Martínez-Gómez, J., Escalante Pliego, P., Parra-Martínez, S. M., ... & Albert, S. (2016). Conservación de aves en México, una instantánea de 2015. *Huitzil*, 17(2), 234-238.

Otten W, Kanitz E, Couret D, Veissier I, Prunier A, Merlot E. 2010. Maternal social stress during late pregnancy affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter systems in pig offspring, *Domest Anim Endocrinol* 38: 146-156.

Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S. M., & Möstl, E. (2005). Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040(1), 162-171.

Preston, C. R., & Beane, R. D. (1993). Red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). Account 52 in A. Poole and F. Gill, editors. *The birds of North America. Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA, and American Ornithologists' Union, Washington, DC.*

Sands, J., & Creel, S. (2004).

Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal behaviour*, 67(3), 387-396.

Sanmiguel Plazas, Rosa Angélica, Plazas Hernández, Fernely Augusto, Trujillo Piso, Dunia Yisela, Pérez Rubio, María del Rocío, Peñuela Sierra, Lina María, & DiGiacinto, Alice. (2018). Requerimientos para la medición de indicadores de estrés invasivos y no invasivos en producción animal. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(1), 15-30.

Schatz, S., & Palme,

R.(2001). Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a noninvasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary research communications*, 25(4), 271-287.

Sharma, S., Ramesh, K., Hyder, I., Uniyal, S., Yadav, V. P., Panda, R. P., ... & Sarkar, M. (2-013). Effect of melatonin administration on thyroid hormones, cortisol and expression

profile of heat shock proteins in goats (*Capra hircus*) exposed to heat stress. *Small Ruminant Research*, 112(1-3), 216-223.

Sheriff M, Krebs C, Boonstra R. 2010. Assessing stress in animal populations: Do fecal and plasma glucocorticoids tell the same story? *Gen Comp Endocrinol* 166: 614-619. doi: 10.1016/j.ygcen.-2009.12.017

Sordillo, LM y Aitken, SL (2009). Impacto del estrés oxidativo en la salud y la función inmune del ganado lechero. *Inmunología e inmunopatología veterinaria* , 128 (1-3), 104-109.

Stockman CA, Collins T, Barnes AL, Miller D, Wickham SL, Beatty DT, et al. Qualitative behavioural assessment and quantitative physiological measurement of cattle naïve and habituated to road transport. *J Anim Prod Sci* 2011; 51:240-249.

Stubsjoen S, Bohlin J, Dahl E, Knappe-Poindecker M, Fjeldaas T, Lepschy M, et al. 2015. Assessment of chronic stress in sheep (part I): the use of cortisol and cortisone in hair as non-invasive biological markers. *Small Rumin Res* 132: 25-31. doi: 10.1016/j.smallrumres.-2015.09.015

Rettenbacher, S., Möstl, E., Hackl, R., Ghareeb, K., & Palme, R. (2004). Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. *British poultry science*, 45(5), 704-711.

Romero, M. H., & Sánchez, J. A. (2011). Implicaciones de la inclusión del bienestar animal en la legislación sanitaria colombiana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(1), 83-91.

Romero, L. M., & Beattie, U. K. (2022). Common myths of glucocorticoid function in ecology and conservation. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 337(1), 7-14.

Taff, C. C., Schoenle, L. A., & Vitousek, M. N. (2018). The repeatability of glucocorticoids: a review and meta-analysis. *General and Comparative Endocrinology*, 260, 136-145.

Touma, C., & Palme, R.

(2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 54-74.

Tribe, A., & Brown, P. R. (2000). The role of wildlife rescue groups in the care and rehabilitation of Australian fauna. *Human Dimensions of Wildlife*, 5(2), 69-85.

Vasconcellos, A. S., Chelini, M. O. M., Palme, R., Guimarães, M. A., Oliveira, C. A., & Ades, C.

(2011). Comparison of two methods for glucocorticoid evaluation in maned wolves. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31, 79-83.

Vidal, A. C., Roldan, M., Christofoletti, M. D., Tanaka, Y., Galindo, D. J., & Duarte, J. M. B. (2019). Stress in captive Blue-fronted parrots (*Amazona aestiva*): The animalists' tale. *Conservation Physiology*, 7(1), coz097.

Wang C, King W, Woods LC. 2004. Physiological indicators of divergent stress responsiveness in male striped bass broodstock. *Aquaculture* 232: 665- 678. doi: 10.1016/j.aquaculture.- 2003.08.008

Young, K. M., Walker, S. L., Lanthier, C., Waddell, W. T., Monfort, S. L., & Brown, J. L. (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and comparative endocrinology*, 137(2), 148-165.

12. Anexos

12.1 Reactivos y material para metodología

12.1.2 Lista de reactivos para toma de muestra

-Metanol (60%)

-Agua destilada

-Metanol (80%)

12.1.2 Material requerido para cuantificación de corticosteroides

-Micropozos recubiertos con cortisol MAb (12x8x1)

-Estándares de cortisol: 7 viales (0.5 ml)

-Conjugado enzimático 20x (1.2 ml)

-Sustrato TB: 1 frasco (12 ml)

-Solución frenado: 1 botella (12 ml)

-Solución de lavado concentrado 20x: 1 botella (25 ml)

-Diluyente de ensayo (24 ml)

-Agua destilada o desionizada

-Pipetas de precisión.

-Puntas de pipetas desechables.

-Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor

-Papel absorbente o toalla de papel.

12.1.3 Análisis estadístico

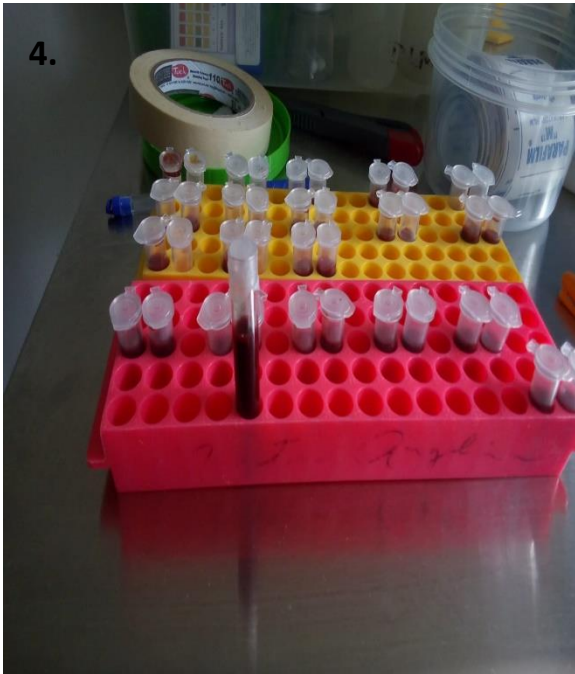
La prueba de kruskal-Wallis es la prueba alternativa no paramétrica de ANOVA de una vía para datos no pareados. Se trata de una prueba que emplea rangos para contrastar la hipótesis de que k muestras han sido obtenidas de una misma población. A diferencia de ANOVA que compara medias, la prueba de kruskal-wallis contrasta si las diferentes muestras están distribuidas equitativamente y que

pertenecen a una misma población, se considera que esta prueba compara las medianas de más de dos grupos.

12.2 Evidencia fotográfica



Imágenes 1-3. Toma de muestra de suero sanguíneo de las aves con apoyo del Dr. Álvaro Oidor Méndez y el Dr. Andrés Estay.



Imágenes 4-7. Procesamiento y preservación de muestras



Imagen 8. Ejemplar de la especie *buteo jamaicensis*.

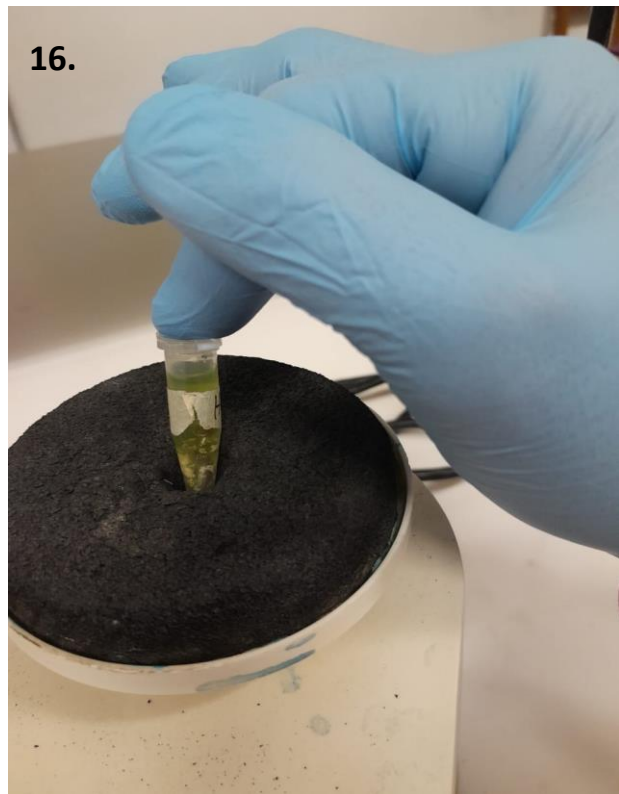
Imágenes 9 y 10. Toma de muestra de heces fecales



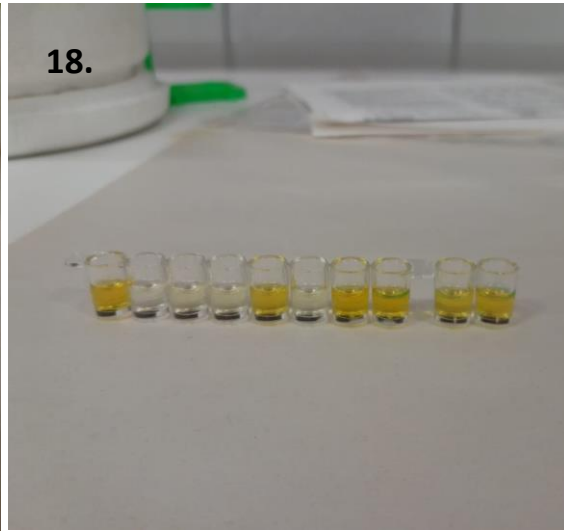
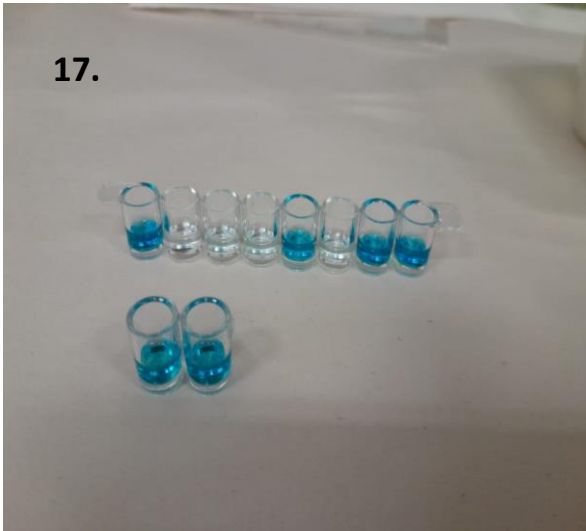


Imágenes 11-13. Toma y procesamiento de muestra de heces fecales.





Imágenes 14-16. Procesamiento de muestras de heces fecales



Imágenes 17-20. Aplicación de prueba de cortisol.