



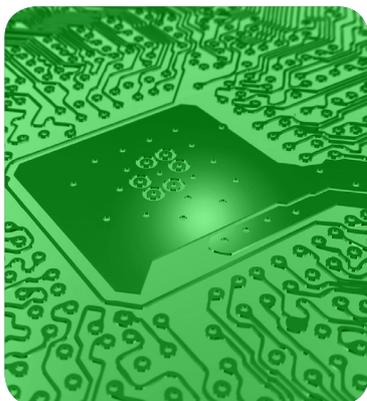
# MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias  
/ 15-16

Biodiversidad



excelencia Campus Internacional  
UAM  
CSIC+



**Evaluación  
no invasiva del efecto  
de la presión  
depredatoria  
y turística sobre  
la respuesta de estrés  
fisiológico en un  
endemismo del centro  
peninsular,  
la lagartija carpetana  
(*Iberolacerta cyreni*)  
Arturo Martínez Querol**



**Evaluación no invasiva del efecto de la presión depredatoria  
y turística sobre la respuesta de estrés fisiológico  
en un endemismo del centro peninsular,  
la lagartija carpetana (*Iberolacerta cyreni*)**



**Arturo Martínez Querol**

**Directores**

Dra. Isabel Barja y Dr. José Martín

Trabajo de Fin de Máster

Septiembre 2016



**CSIC mncn**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
museonacionaldecienciasnaturales

## RESUMEN

La práctica masiva del ecoturismo está teniendo consecuencias importantes sobre los animales, los cuales perciben a los humanos como potenciales depredadores, provocando la activación de la respuesta de estrés fisiológico. Otro factor estresante para algunos vertebrados es el riesgo de depredación. En este estudio se cuantificaron los niveles de metabolitos de corticosterona fecal (MCF) en lagartija carpetana en respuesta a la presión turística y al estímulo oloroso de un depredador (culebra lisa europea, *Coronella austriaca*). Las muestras fecales analizadas procedían de dos zonas turísticas del Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama (Madrid). Además, se realizó un experimento con 65 machos para conocer el efecto del riesgo de depredación sobre la respuesta de estrés fisiológico. El tratamiento influyó en el aumento de los niveles de MCF, siendo significativamente mayores cuando los animales fueron tratados con corticosterona (control) y no se observó respuesta al olor de culebra. Otro de los factores que explicó la variación en los niveles de MCF fue la presión turística, siendo éstos mayores en animales procedentes de la zona más turística. La lagartija carpetana parece mostrar una respuesta de estrés inducida por el turismo, siendo estos resultados de gran ayuda en la gestión de sus poblaciones. La falta de respuesta fisiológica al olor de depredador puede guardar relación con la concentración de olor a la que fueron sometidos los individuos o con el elevado coste de dicha respuesta en comparación con el uso de estrategias antidepredatorias basadas en la modificación de su comportamiento.

**Palabras clave:** respuesta de estrés fisiológico, depredación, MCF, presión turística, corticosterona, estrategias antidepredatorias.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. <i>Respuesta de estrés fisiológico</i>	4
1.2. <i>Breve reseña de la lagartija carpetana (Iberolacerta cyreni)</i>	5
2. OBJETIVOS Y PREDICCIONES	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. <i>Zonas de estudio en el campo</i>	8
3.2. <i>Sujetos de estudio e instalaciones</i>	8
3.3. <i>Diseño experimental</i>	10
3.4. <i>Captura de ejemplares y recogida de muestras fecales</i>	11
3.5. <i>Extracción y cuantificación de glucocorticoides fecales:             metabolitos de corticosterona</i>	12
3.6. <i>Análisis estadístico de los datos</i>	14
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES	24
7. AGRADECIMIENTOS	25
8. BIBLIOGRAFÍA	25

# 1. INTRODUCCIÓN

El turismo de naturaleza, también conocido como ecoturismo actualmente, se ha convertido en una práctica de moda en la actualidad. La idea de este tipo de turismo tiene un objetivo claro y sincero: concienciar a la gente empíricamente de que los ecosistemas enteros, y no sólo las especies emblemáticas, deben ser conservadas para que sea posible la convivencia interespecífica. Y en este caso haciendo referencia no sólo a especies diferentes al hombre, sino que el *Homo sapiens*, como especie animal que es, también debe aprender a respetar y coexistir con su medio natural (Amo *et al.*, 2006, 2007; Piñeiro *et al.*, 2012; Navarro-Castilla *et al.*, 2014b).

En las últimas décadas el ecoturismo parece haber llegado a todos los rincones de nuestra sociedad, incrementándose el número de personas aparentemente interesadas en el tema conservacionista (Barja *et al.*, 2007; Pérez-Tris *et al.*, 2004). No obstante, lo que en un principio se podría tomar como una buena noticia, no lo es tanto cuando se indaga en el efecto que supone el incremento demográfico en las zonas naturales por motivos de este turismo. La presencia humana no pasa desapercibida para el resto de seres vivos de un ecosistema y a menudo son considerados como potenciales depredadores por los animales silvestres de la zona (Amo *et al.*, 2006; Barja *et al.*, 2007; Piñeiro *et al.*, 2012; Navarro-Castilla & Barja, 2014).

Lo mencionado previamente tiene una serie de repercusiones que afectan a las poblaciones silvestres, como en el caso de algunos reptiles como los lacértidos: lagartija roquera (*Podarcis muralis*), lagartija colilarga (*Psammotromus algirus*) y lagartija carpetana (*Iberolacerta cyreni*) en los cuales se ha estudiado el efecto de la presencia humana en zonas turísticas donde habitan estas especies y se ha evidenciado que todas ellas muestran un incremento de comportamientos de respuesta antidepredatoria como la huida (Pérez-Tris *et al.*, 2004; Amo *et al.*, 2007). Además de haber estudios que verifican una modificación del propio comportamiento de huida en estos animales, como por ejemplo la distancia de escape en zonas más o menos turísticas (Diego-Rasilla, 2003a, b), bien es cierto que las actividades antidepredatorias tienen un coste para el animal a corto y a largo plazo, dándose el caso de individuos de *P. muralis* e *I. cyreni* que han sufrido una pérdida de masa corporal en zonas turísticas (Amo *et al.*, 2007). El aumento de este tipo de comportamientos y la pérdida de masa corporal también conllevan una menor inversión energética en respuestas inmunológicas de estos animales (Smallridge & Bull, 2000) así como menos tiempo invertido en comportamientos de apareamiento y búsqueda de alimento (Lima & Dill, 1990; Martín *et al.*, 2003).

El estrés fisiológico es una respuesta que se lleva estudiando muchos años, con diferentes técnicas según se realizaban nuevos descubrimientos acerca del mismo. Los glucocorticoides son las moléculas que se han utilizado principalmente como indicadores fisiológicos de estrés en diversos estudios de especies muy diferentes de vertebrados, tanto mamíferos como reptiles, aves e incluso peces (Möstl & Palme, 2002; Stewart, 2003).

Los glucocorticoides se han estudiado hasta ahora en animales vía sanguínea, mediante muestras de plasma de las diferentes especies. A pesar de que es una medida efectiva y muy aceptada como indicadora de estrés en cualquier especie de vertebrado, la recolección de las muestras es invasiva, pues requiere la manipulación del animal y si el tiempo empleado para la misma es mayor de 3 minutos afecta a los niveles de glucocorticoides que serán cuantificados en dichas muestras, provocando errores en los resultados (Broom & Johnson, 1993; Von der Ohe *et al.*, 2004).

Frente a este método clásico ha surgido una nueva técnica de estudio que consiste en la cuantificación de los niveles de glucocorticoides a través de los metabolitos residuales de las heces del animal. Es un método que presenta la ventaja de no ser invasivo para el individuo y además las muestras de heces son más fáciles de obtener que la sangre y no hace falta manipular al animal en ningún momento o, si es estrictamente necesario como en el caso de algunos reptiles y aves, nunca durante tanto tiempo como en un muestreo sanguíneo (Monfort *et al.*, 1998; Möstl & Palme, 2002; Barja *et al.*, 2007; Barja *et al.*, 2008; Piñeiro *et al.*, 2012; Navarro-Castilla & Barja, 2014; Navarro-Castilla *et al.*, 2014a, b). Este método puede ser utilizado con todos los vertebrados aunque el análisis no invasivo de muestras fecales fue usado principalmente en carnívoros: osos (Von der Ohe *et al.*, 2004), lobos (Sands & Creel, 2004; Barja *et al.*, 2008), hienas manchadas (Goymann *et al.*, 1999), martas europeas (Barja *et al.*, 2007) y gatos monteses (Piñeiro *et al.*, 2012, 2015) entre otros, y también en varias especies de micromamíferos como el topillo campesino (*Microtus arvalis*) (Navarro-Castilla *et al.*, 2014a) y el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) (Navarro-Castilla & Barja, 2014; Navarro-Castilla *et al.*, 2014b).

Sin embargo, en la actualidad existen pocos estudios realizados en condiciones naturales usando heces para cuantificar los niveles de metabolitos de glucocorticoides. La mayoría de las investigaciones se han realizado con animales mantenidos en cautividad. Por eso, este trabajo pretende contribuir, en la medida de lo posible, al avance de estos estudios del estrés provocado por la presión humana en zonas de interés ecoturístico. En este caso con la especie de lacértido *Iberolacerta cyreni* que habita en el puerto de montaña de Navacerrada, en la sierra de Guadarrama, Madrid. Además, es el primer estudio usando técnicas inmunoanalíticas para cuantificar respuesta de estrés en heces y de los primeros con reptiles.

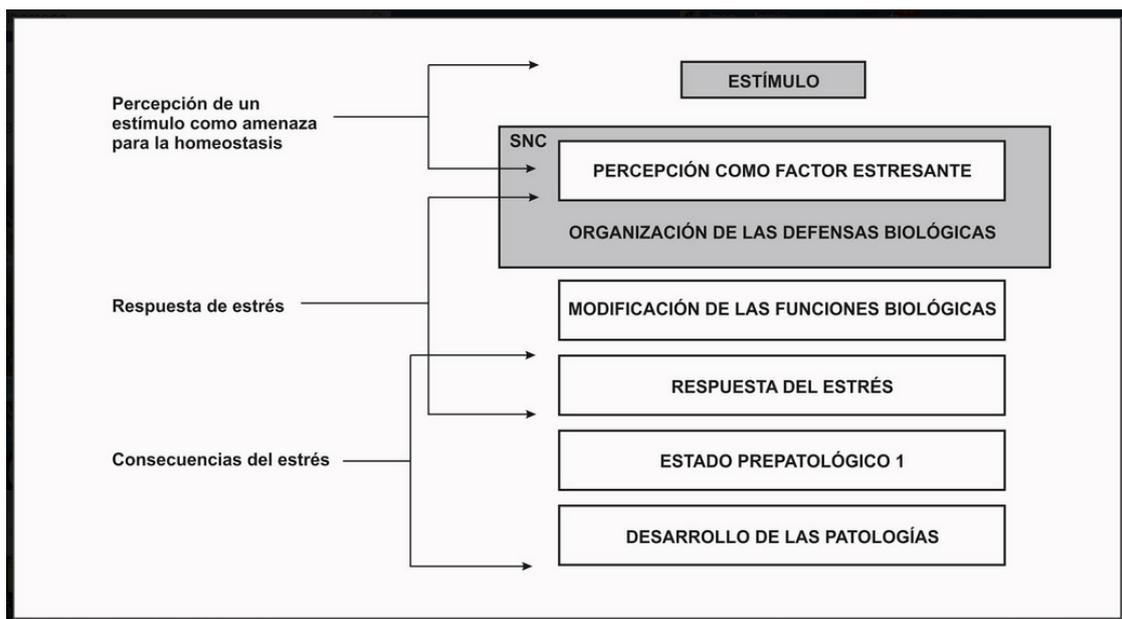
### **1.1. Respuesta de estrés fisiológico**

Cuando un animal percibe algún tipo de agente estresante externo se activa la respuesta de estrés fisiológico, que consiste en un proceso metabólico con una serie de efectos fisiológicos en cascada que culminan en la secreción de metabolitos como los glucocorticoides (Axelrod & Reisine, 1984).

El proceso empieza con un estímulo adverso que provoca la activación de eje corticotropo, hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), el cual resulta en dos efectos. Por

una parte actúa sobre la corteza adrenal, que es la encargada de secretar glucocorticoides, tanto metabolitos de cortisol como de corticosterona, según la especie; y por otra parte el HPA activa el sistema simpático medular con la liberación de catecolaminas (Axelrod & Reisine, 1984; Stewart, 2003).

A corto plazo la secreción de glucocorticoides se ha relacionado siempre con la respuesta de los animales a agentes estresantes como una acción beneficiosa para el propio animal ya que estos glucocorticoides permiten procesos de movilización de energía y cambios de comportamiento en el animal tales como la huida en caso de depredación (estrés agudo). Sin embargo, a largo plazo los efectos son muy distintos y no son beneficiosos para el individuo, es lo que denomina estrés crónico, que se mantiene en el tiempo. La secreción de glucocorticoides durante períodos largos de tiempo puede llegar a desembocar en desajustes hormonales, patologías reproductivas, debilitamiento del sistema inmunológico y ulceraciones gastrointestinales entre otros efectos nocivos para el individuo (Stewart, 2003). Estos efectos a largo plazo reducirían significativamente tanto el éxito reproductivo como la supervivencia de los individuos, lo cual, sin duda, reduce la eficiencia biológica de la especie (Sapolsky, 1992; Möstl & Palme, 2002) (Fig. 1).



**Figura 1.** Esquema de las diferentes fases de la respuesta de estrés y consecuencias del estado prepatológico (Moberg, 1999).

### 1.2. Breve reseña de la lagartija carpetana (*Iberolacerta cyreni*)

La lagartija carpetana (*Iberolacerta cyreni* Müller & Hellmich, 1937) es un reptil perteneciente a la familia Lacertidae, y es miembro de la subfamilia Lacertinae a su vez. Es la lagartija más grande del género *Iberolacerta* en la Península Ibérica (Arnold *et al.*, 2007). Se ha documentado la existencia de dos subespecies aunque los datos genéticos

no muestran un resultado tan evidente: *Iberolacerta cyreni cyreni* en la sierra de Guadarrama e *Iberolacerta cyreni castiliana* en la sierra de Gredos (Arribas, 2010).

Su morfología corporal es similar a sus especies hermanas a simple vista, ya que tiene un cuerpo robusto con cierto aplanamiento en la zona dorsal tanto de la cabeza como del torso. No obstante, es característica y fácil de identificar por una serie de caracteres que sólo presenta esta especie dentro de su género como el collar liso y la escama rostral que se encuentra en contacto con la escama frontonasal. La librea dorsal es parda en hembras y juveniles pero suele ser verde intenso en los individuos machos adultos y en ambos sexos presenta manchas oscuras más atenuadas incluso en los costados del animal. En cuanto a la coloración ventral, muestra tonos blanquecinos y/o azulados además de carecer siempre de pigmentación oscura en la zona ventral del cuello (garganta) (Martín, 2005; Arnold *et al.*, 2007).

Las lagartijas carpetanas juveniles son muy similares a las del resto del género, mostrando un color general parduzco y la cola contrariamente de tono verdes azulados muy atenuados (Arnold *et al.*, 2007). El dimorfismo sexual consiste en un tamaño mayor de la cabeza y cola en los machos adultos así como la coloración dorsal verde mencionada anteriormente, aunque cabe mencionar que también se han encontrado casos de hembras verdes. Una clara diferencia de los machos son los flancos reticulados con ocelos azules en contraste con el verde general que presentan (Martín, 2005) (Fig. 2).



**Figura 2.** A) Ejemplar macho adulto de *Iberolacerta cyreni* con el flanco reticulado de color azul y tonos dorsales más verdosos. B) Hembra adulta con coloración dorsal más parda y sin reticulado (autor: Arturo Martínez).

En cuanto a su etología son lacértidos diurnos y de actividad bimodal que mantienen frecuentes luchas por el territorio por parte de los machos en época de reproducción y cría (Masó & Pijoan, 2011). La actividad reproductiva se ha registrado desde finales de abril hasta mitad de julio, mientras que la puesta de los huevos se realiza durante el mes de julio y el nacimiento de las crías se puede observar desde mediados de agosto hasta mitad de septiembre (Arnold & Ovenden, 2007; Masó & Pijoan, 2011).

Se trata de un endemismo de la Península Ibérica por lo que su distribución se encuentra muy localizada, ciñéndose únicamente al centro de la península y sólo en zonas de alta montaña entre los 1200 y 2600m de altura (sierras de Guadarrama, Gredos y Béjar) (Pérez-Mellado, 2002) (Fig. 3). Habita en zonas alpinas y es típica de roquedas en zonas de prados o mosaicos de prado, pinar montano y arbustos. Se encuentra en bosques caducifolios, pastizales y, sobre todo, en zonas de matorral (enebro rastrero, brezo, piorno, etc.) (Mayer & Arribas, 2003; Arribas, 2010). A causa de esto es una especie muy escasa y sus poblaciones se encuentran en peligro y en regresión según la UICN debido a la fragmentación de su hábitat y la pérdida de calidad del mismo. Mientras que en la lista de especies de la UICN figura con la categoría de “en peligro” (EN, B1ab(iii)) (Pérez-Mellado *et al.*, 2009) en el Libro Rojo de especies protegidas de España sólo figura como especie vulnerable (Masó & Pijoan, 2011).



**Figura 3.** Mapa de distribución de *Iberolacerta cyreni*, endemismo del centro de la Península Ibérica (Pérez-Mellado *et al.*, 2009).

## 2. OBJETIVOS Y PREDICCIONES

A. Evaluar el efecto de la presencia de olor de depredador sobre la respuesta de estrés fisiológico en machos adultos de lagartija carpetana (*Iberolacerta cyreni*). Se predice que los niveles de metabolitos de corticosterona fecal aumentarán en los machos cuando éstos sean sometidos al estímulo oloroso de un depredador como la culebra lisa europea (*Coronella austriaca*).

B. Determinar la importancia de la presión humana turística sobre los niveles de estrés fisiológico de los machos adultos de lagartija carpetana. Se predice que los machos que ocupen zonas del puerto de montaña de Navacerrada (Madrid) mostrarán mayores niveles de metabolitos de corticosterona fecal que aquellos que habiten en zonas con menor presencia humana.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Zonas de estudio en el campo

El presente estudio se llevó a cabo durante los meses de mayo, junio y julio de 2016, en dos zonas distintas del Puerto de Navacerrada en la Sierra de Guadarrama, Madrid, a una altura de 1900-2200 m. A dicha altura el paisaje natural se caracteriza por bloques de roca granítica intercalados con arbustos como *Cytisus oromediterraneus* y *Juniperus communis*, praderas de *Festuca* sp. y otras especies, y algunos *Pinus sylvestris* dispersos, los cuales conforman el bosque principal a menor altitud en el Puerto (Martín & Salvador, 1997). Es una zona caracterizada por la presencia de infraestructuras construidas durante el último siglo que marcan el deterioro de muchas áreas adyacentes donde ya no se aprecia la vegetación mencionada anteriormente ni, por tanto, la fauna asociada a la misma.

La Sierra de Guadarrama constituye uno de los lugares tradicionales de ocio y actividades tales como el turismo de naturaleza de los habitantes de la ciudad de Madrid y, por ello, se trata de un lugar muy transitado por el ser humano y sometido, por tanto, a una fuerte presión turística; un hecho que se acrecienta durante los meses de primavera y verano. De esta forma se estudiaron dos zonas de muestreo con diferente presión turística de acuerdo a los objetivos del estudio: un tramo del sendero que parte del Puerto de Navacerrada y una zona cercana a la pista de ski del Puerto. Así, se clasificó como la zona con menor presión turística la pista de ski, cerrada al público en esta época, y como zona de mayor turismo el tramo del sendero, frecuentado por turistas en mayor grado durante estos meses del año. Excepto por el nivel de presión turística, ambas zonas de muestreo presentan condiciones de hábitats y climatológicas similares.

#### 3.2. Sujetos de estudio e instalaciones

Los experimentos se realizaron en la Estación Biológica de El Ventorrillo, propiedad del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (MNCN-CSIC), localizada en la Sierra de Guadarrama entre Cercedilla y el Puerto de Navacerrada.

En total se mantuvo un total de 65 lagartijas carpetanas en terrarios individuales para cumplir con los diferentes objetivos del estudio en las instalaciones de la Estación, todos ellos machos y adultos para mayor uniformidad de la muestra total y evitar así sesgos debido a la edad y el sexo. Este número inicial se dividió al azar en tres grupos: dos grupos con 16 individuos cada uno según se destinaran a sujetos del experimento de corticosterona o sujetos expuestos a olor de depredador, y un grupo control constituido por 33 individuos. A los 33 individuos del grupo control hay que añadir otros 12 individuos que fueron capturados, manipulados y liberados *in situ* en el campo. Cada grupo de 16 individuos a su vez se separó en subgrupos de 8 según la zona de procedencia, es decir, si fueron capturadas en la zona de estudio con mayor exposición a presencia humana o la zona donde la exposición es menor, al igual que los controles que

también se encuentran diferenciados por zonas de procedencia. Para minimizar la manipulación de los individuos y el efecto de la misma sobre el experimento, no se procedió al marcaje individual de las lagartijas, solo fue identificado cada terrario con el tratamiento.

Los terrarios se encontraban debidamente habilitados con sustrato de coco, bebederos y refugios para generar sombra ya que se situaron en el exterior, alejados de las infraestructuras para mantener las distancias con los seres humanos y evitar el troquelamiento de las lagartijas silvestres (Fig. 4). Además, de esta forma reciben luz solar directa y natural en vez de utilizar lámparas de luz ultravioleta artificial. Se cubrieron los terrarios con rejillas y sujeciones para las mismas con el fin de evitar el ataque de depredadores como arrendajos o gatos asilvestrados que pudieran atacar a las lagartijas carpetanas en los terrarios.



**Figura 4.** Terrarios de las lagartijas carpetanas sometidas a diferentes tratamientos durante el experimento: olor de culebra, corticosterona y controles (autor: Arturo Martínez).

Para el experimento del olor de depredador se tuvo que capturar algún ejemplar de alguno de ellos para poder llevar a cabo el mismo. El depredador más accesible y directo de esta especie en la zona de estudio es la culebra lisa europea (*Coronella austriaca*) (Fig. 5) que es una culebra saurófaga especializada en depredar sobre lagartijas (Amo *et al.*, 2004). Se capturaron dos ejemplares silvestres en la misma zona del Puerto de Navacerrada de donde procedían las lagartijas. Las culebras se dispusieron en dos terrarios debidamente habilitados con sustrato de coco y bebederos. Tanto en los terrarios de las lagartijas como en los de las culebras el agua de los bebederos se reponía

diariamente y las lagartijas eran alimentadas con grillos vivos cada dos días mientras que las culebras se mantenían por más tiempo con lagartijas u otras presas muertas.



**Figura 5.** Ejemplar de culebra lisa europea (*Coronella austriaca*) mantenido en cautividad durante el experimento (autor: Arturo Martínez).

Una vez finalizado el experimento, para no influir previamente en los niveles de estrés fisiológico de los individuos, se tomaron medidas de longitud corporal desde el hocico hasta la cloaca (SVL) usando una regla metálica (precisión  $\pm 1$  mm), además se registró el peso de cada individuo usando una balanza digital ( $\pm 0,01$  g), ya que hay cierta variación aunque todos los individuos sean machos adultos y esto podría influir en los resultados obtenidos.

### **3.3. Diseño experimental**

El diseño experimental comprende tres grupos de individuos objeto de estudio. 1) Uno de ejemplares de lagartija carpetana sometidos a un tratamiento de corticosterona directamente, 2) otro con individuos sometidos a un tratamiento de olor de *C. austriaca*, con el objetivo de observar la respuesta fisiológica de estrés ante la potencial presencia de un depredador; y por último, 3) el grupo control que sirve de comparativa con los anteriores grupos ya que representan la respuesta natural de estrés de las lagartijas silvestres en su medio y en la situación experimental.

El procedimiento experimental de la corticosterona consistió en aplicar a las lagartijas una dosis cada dos días de disolución de corticosterona durante diez días, suficiente para activar la respuesta de estrés fisiológica como han puesto de manifiesto otros estudios (Meylan *et al.*, 2003; Meylan *et al.*, 2010; Cote *et al.*, 2010). La disolución de corticosterona tenía una concentración de 3  $\mu$ g de corticosterona por  $\mu$ l de aceite (Fig. 6). De esta forma, mediante una pipeta calibrada se vertieron 4,5  $\mu$ l de la disolución de corticosterona (=13  $\mu$ g de corticosterona) sobre el dorso del animal cada dos días durante el experimento, ya que la hormona disuelta puede absorberse por el tegumento (Meylan *et al.*, 2003; Cote *et al.*, 2010).

El otro tratamiento, el de olor de culebra, siguió una pauta similar y se sometieron a los individuos a una fuente de olor de un depredador de la especie durante diez días de tratamiento. Para distribuir el olor de la serpiente de forma efectiva, cada dos días se renovaba el sustrato de los terrarios de las serpientes y el sustrato impregnado de odorantes se distribuía por los terrarios de las lagartijas del experimento, lo cual simularía la presencia de una culebra en el terrario y podría activar la respuesta de estrés fisiológica, tal y como se ha demostrado en otros estudios sobre la capacidad de las lagartijas de detectar el olor de la culebra mediante su sistema quimiosensorial y de modificar su comportamiento antidepredador en base al olor (Martín & López, 1999; Amo *et al.*, 2004).

En total se pretendía recoger un número parecido de muestras de fecas de cada grupo por lo que de los sujetos de corticosterona y del olor de depredador se recogieron tres muestras de cada uno al final del tratamiento mientras que de los controles una muestra por animal para mayor diversidad y dado el gran número de individuos disponibles. En total se recolectaron 48 muestras de cada grupo experimental y 33 muestras control más 12 obtenidas en el campo, lo que supone un total de 141 muestras fecales de machos adultos de lagartija carpetana. Todas las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio de Etología de la Universidad Autónoma de Madrid para la cuantificación de los niveles de metabolitos de corticosterona fecal en el laboratorio.



**Figura 6.** Disolución de 3  $\mu\text{g}$  de corticosterona por  $\mu\text{l}$  de aceite utilizada en el experimento (autor: Arturo Martínez).

### **3.4. Captura de ejemplares y recogida de muestras fecales**

Para poder recoger las muestras de fecas de lagartijas silvestres en campo se realizaron varias salidas en distintos puntos del puerto de montaña de Navacerrada. El proceso consistió en atrapar las lagartijas, obtener la muestra y liberarlas inmediatamente en el mismo sitio de captura para manipularlas lo menos posible. La búsqueda de los animales se realizó en las horas de mayor incidencia del sol (por la mañana) y por tanto la captura es mucho más sencilla ya que los animales no están activos del todo a esa hora del día.

Para capturar las lagartijas se utilizaba una caña extensible especializada con un hilo o cuerda de algodón para no dañar al animal pero con la fuerza suficiente para poder capturarla. El hilo forma un lazo en el extremo de la caña para poder pasar la cabeza de la lagartija y atraparla a la altura del cuello. Una vez capturada se procedía a manipular al animal (Fig. 7), un proceso que no duraba mucho tiempo (1 min a lo sumo) debido a que las lagartijas usualmente defecan como respuesta a la captura por un potencial depredador (Pérez-Mellado, 2002; Pérez-Tris *et al.*, 2004). En caso de que no

ocurriera esta reacción por parte de la lagartija, se presionaba levemente entre el vientre y la cloaca y el animal defecaba igualmente. Las lagartijas que se utilizaron para el experimento (grupos de corticosterona, olor de culebra y control) se capturaron de esta forma y se trasladaron a la Estación de El Ventorrillo.



**Figura 7.** Captura y manejo de un ejemplar silvestre de *Iberolacerta cyreni* (autor: Arturo Martínez).

El procedimiento de recogida de muestras es el mismo tanto en la Estación como en el campo. En el momento de la excreción las muestras de fecas se introducen directamente en tubos eppendorf debidamente etiquetados para trasladarlas al lugar de conservación de las mismas. Se etiquetaron según el individuo y la zona de procedencia tal y como se indica en el siguiente ejemplo: 1Cor1I (1: zona de procedencia del individuo (siendo 1 la más turística y 2 la menos turística); Cor: tratamiento de corticosterona; 1: número del individuo; I: número de muestra del individuo). De igual forma se etiquetaron correlativamente las muestras de los grupos de olor a serpiente y control.

El transporte de las muestras, tanto a la Estación como posteriormente al laboratorio de la Universidad, siempre se realizaba con una nevera con hielos, manteniendo la cadena de frío hasta su análisis ya que la temperatura parece afectar a los niveles de glucocorticoides (Touma *et al.*, 2004; Navarro-Castilla *et al.*, 2014a, b).

### **3.5. Extracción y cuantificación de glucocorticoides fecales: metabolitos de corticosterona**

El análisis de las muestras fecales obtenidas se llevó a cabo en el laboratorio de Etología (Departamento Biología, Unidad Zoología, Universidad Autónoma de Madrid; investigadora responsable: Dra. Isabel Barja). Las muestras fueron conservadas hasta su análisis a -20°C.

Para determinar las concentraciones de metabolitos de corticosterona en las muestras fecales de lagartijas se procedió a la extracción de la hormona diana, la corticosterona. Para la extracción de la hormona, las muestras fecales congeladas fueron secadas en una estufa a 90°C durante 2-3h (Fig. 8A). Una vez secas se pesaron 0,05 g de cada muestra (Fig. 8B) y se les añadieron 500 µl de buffer fosfato y 500 µl metanol en un tubo eppendorf. Los tubos fueron agitados mediante un agitador vórtex para posteriormente trasladarlos a un agitador orbital, donde pasaron 16 h, con el fin de homogeneizar la muestra y los químicos. Para finalizar la extracción se centrifugó el

extracto resultado del agitador orbital a 2500 rpm durante 15 min (Fig. 8C) y el sobrenadante se pasó a tubos de poliuretano, aptos para la conservación de hormonas, los cuales fueron mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su cuantificación.

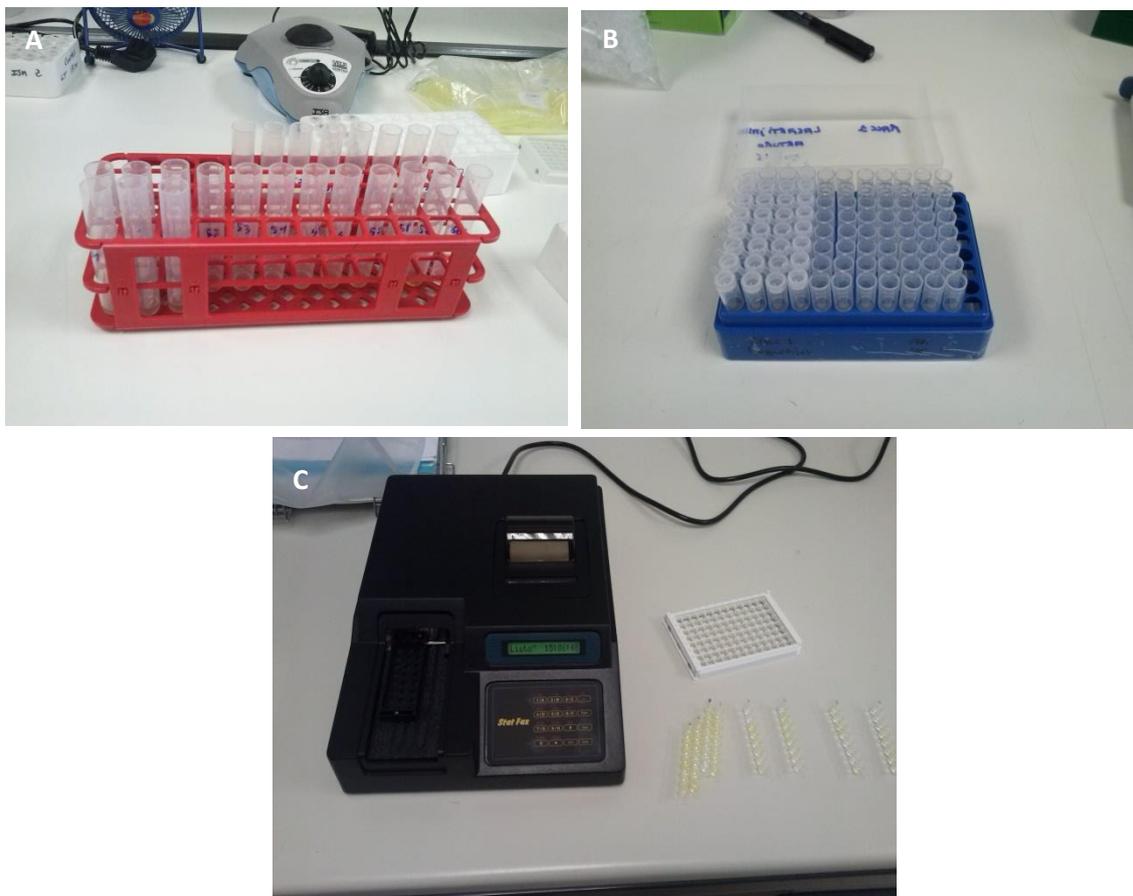


**Figura 8.** A) Proceso de secado de las muestras mediante estufa a  $90^{\circ}\text{C}$ . B) Pesado de las muestras secas mediante el uso de una balanza de precisión. C) Centrifugado de las muestras a 2500 rpm (autor: Arturo Martínez).

La cuantificación de metabolitos de corticosterona en los extractos fecales (Fig. 9A) se realizó mediante enzimo inmunoensayo de competición (EIA) con la técnica ELISA usando kits comerciales (DEMEDITEC Diagnostics GmbH, D-24145 Kiel, Germany) (Fig. 9B) adquiridos para la hormona corticosterona. La valoración de la concentración de cada hormona en las muestras fecales se hizo en un espectrofotocolorímetro (Microplate Reader, MR 600, Dynatech Product) (Fig. 9C). Las concentraciones de hormonas fueron expresadas en ng/g excremento seco.

Esta técnica fue validada para la hormona diana en la especie objeto de estudio. La validación se llevó a cabo en el Laboratorio de Etología donde se realizaron los análisis hormonales del presente estudio. Los parámetros de validación determinados para conocer la exactitud del método fueron la recuperación y el paralelismo. El porcentaje de recuperación de la hormona estuvo por encima del 90% en las muestras, por tanto, los extractos no contenían sustancias que interfirieran con la cuantificación. Los ensayos del paralelismo indicaron que las curvas realizadas eran paralelas a las

curvas estándar ( $p > 0,05$ ). De este modo, queda verificada la validez del método para cuantificar la hormona diana en la lagartija carpetana.



**Figura 9.** A) Extractos resultados de la centrifugación. B) Procedimiento del enzimo inmunoensayo de competición (EIA). C) Valoración de las muestras finales mediante espectrofotocolorímetro (autor: Arturo Martínez).

### **3.6. Análisis estadístico de los datos**

Para comprobar si la variable cuantitativa “nivel de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g)” se ajustaba a una distribución normal se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas se comprobó mediante el test de Levene. Para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad esta variable fue transformada con el logaritmo en base 10.

Se realizaron los análisis estadísticos de correlación de Pearson para comprender las posibles interrelaciones entre las variables cuantitativas (peso, longitud cabeza-cloaca y niveles de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g)).

Los niveles de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g) en la lagartija carpetana fueron analizados mediante un Modelo Lineal General (MLG) usando como factores fijos la perturbación humana (zona más turística / zona menos turística) y el tratamiento

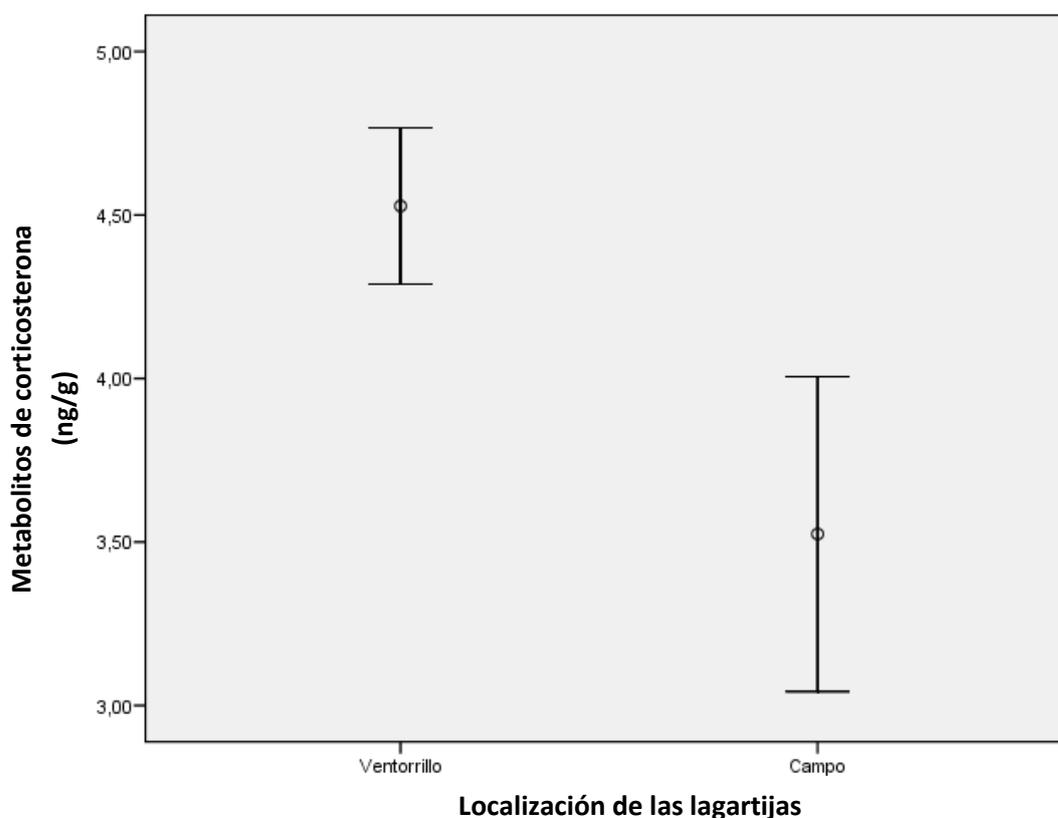
(corticosterona / serpiente / control), peso (g) y longitud (cm). Además, se llevó a cabo un análisis “*post hoc*” con los factores que influyeron significativamente en la variación en los niveles de metabolitos de corticosterona fecal para conocer entre qué categorías de las variables eran las diferencias.

Se realizaron test de ANOVA para evaluar el efecto de las variables localización (recogida de la muestra en la Estación del Ventorrillo/campo) e individuo sobre los niveles de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g).

El nivel de significación usado para rechazar la hipótesis nula fue  $p < 0,05$  y el software utilizado para llevar a cabo los análisis estadísticos fue el SPSS 25.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.).

#### 4. RESULTADOS

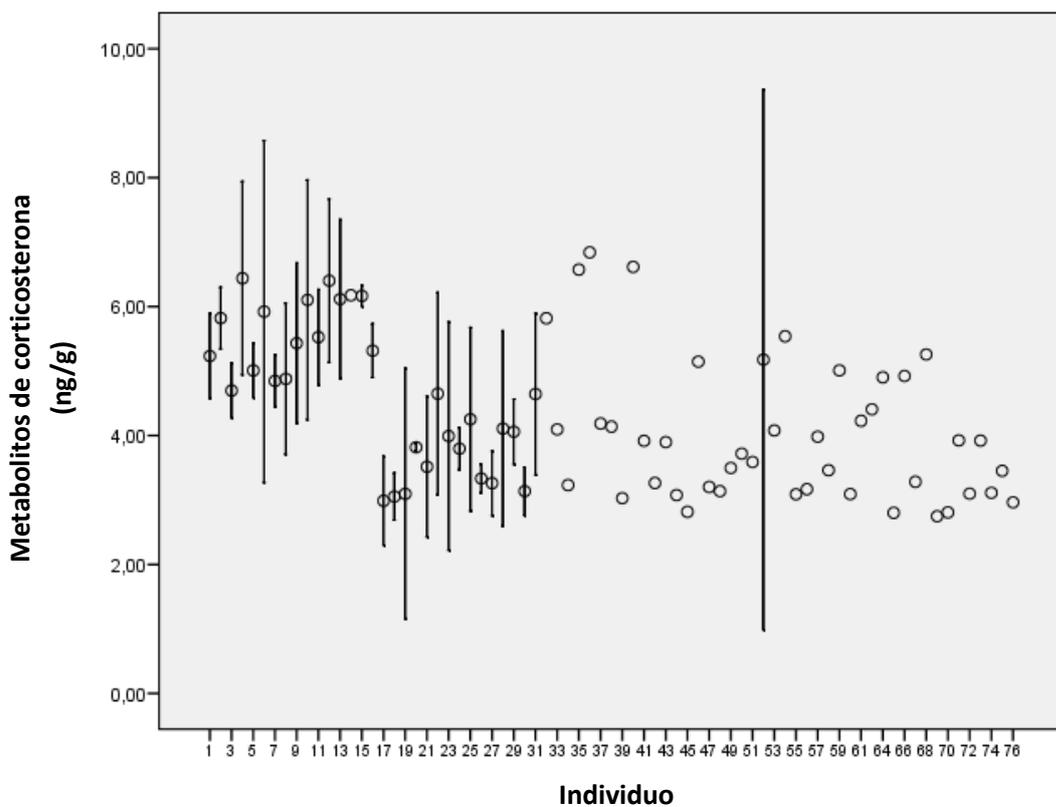
En relación con la procedencia de las muestras fecales, se encontraron diferencias significativas en los niveles de metabolitos de corticosterona, siendo éstos menores en las muestras fecales de machos adultos recolectadas en el campo ( $3,52 \pm 0,24$  ng/g excremento seco) que en las procedentes de animales mantenidos en cautividad ( $4,53 \pm 0,12$  ng/g) (ANOVA:  $F = 6,63$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,011$ ;  $N = 136$ ) (Fig. 10).



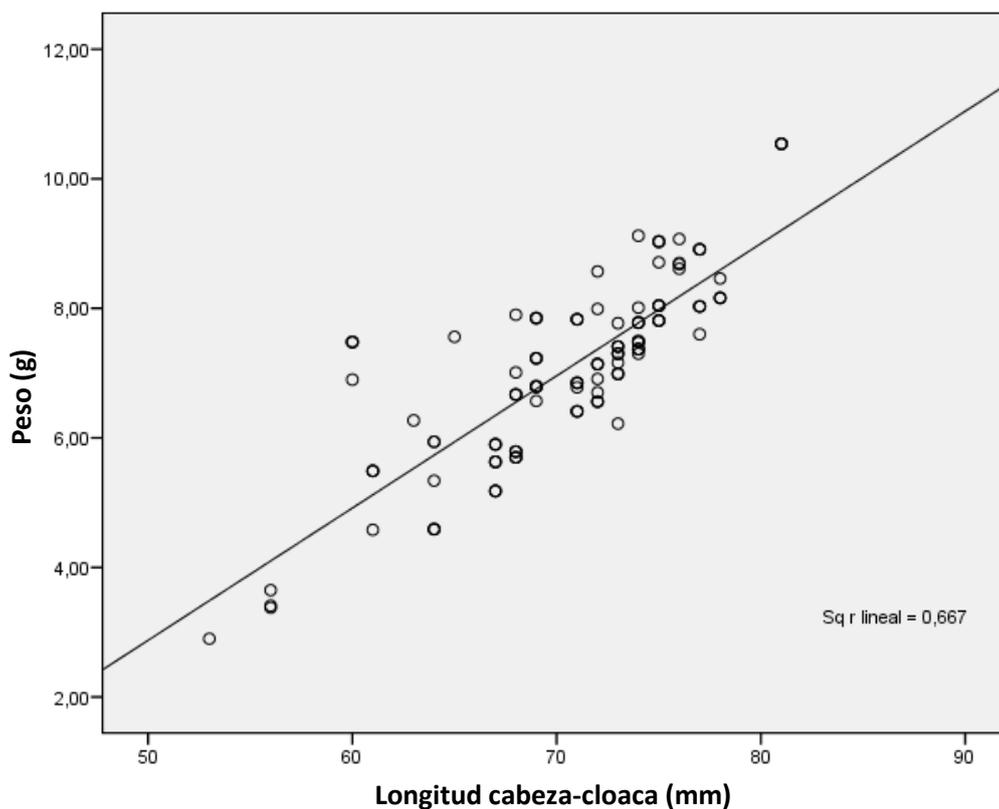
**Figura 10.** Niveles medios de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g) ( $\pm$  SE) en función de la procedencia de las muestras fecales de machos adultos de lagartija carpetana.

También se encontraron diferencias significativas en los niveles de metabolitos de corticosterona fecal en función del individuo (Fig. 11) (ANOVA:  $F = 2,29$ ;  $gl = 74$ ;  $p = 0,001$ ;  $N = 136$ ).

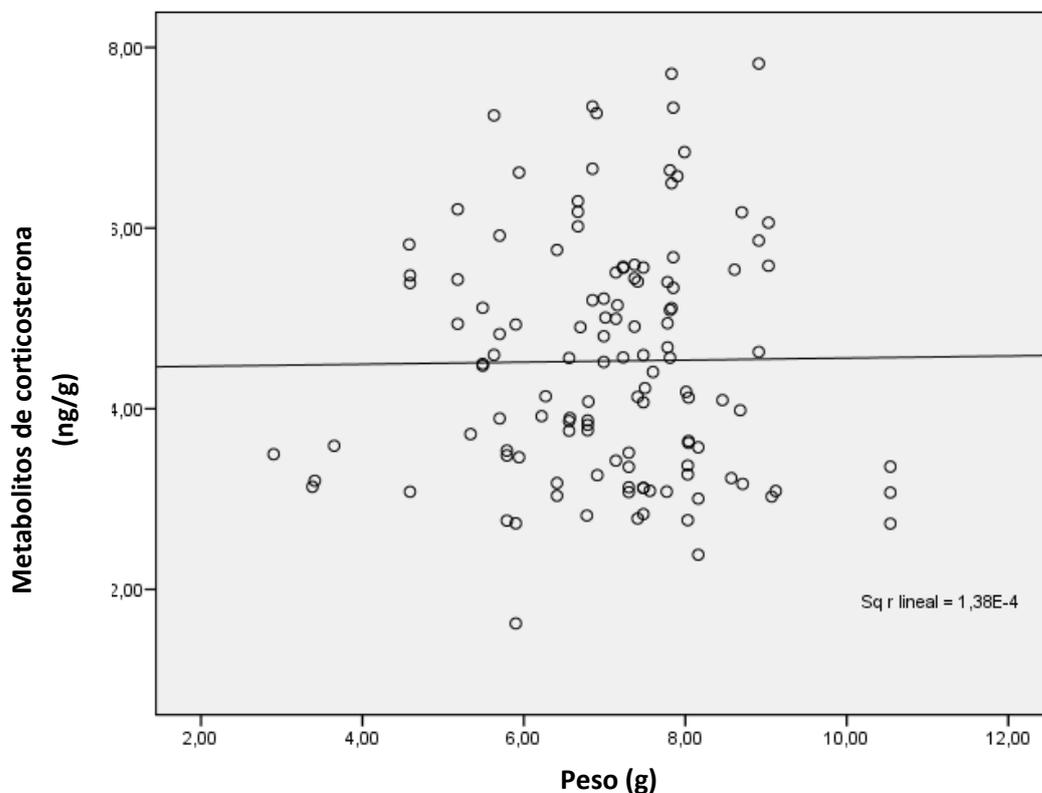
En cuanto al análisis de correlación de Pearson de las diferentes variables sólo se observó que hay una correlación entre el peso y la longitud cabeza-cloaca (Fig. 12) (Pearson:  $r = 0,817$ ;  $p = 0,0001$ ;  $N = 124$ ). Sin embargo, las variables peso (Pearson:  $r = 0,12$ ;  $p = 0,898$ ;  $N = 124$ ) y longitud cabeza-cloaca (Pearson:  $r = -0,47$ ;  $p = 0,609$ ;  $N = 124$ ) no estaban correlacionadas con los “niveles de metabolitos de corticosterona fecal” (Figs. 13 y 14).



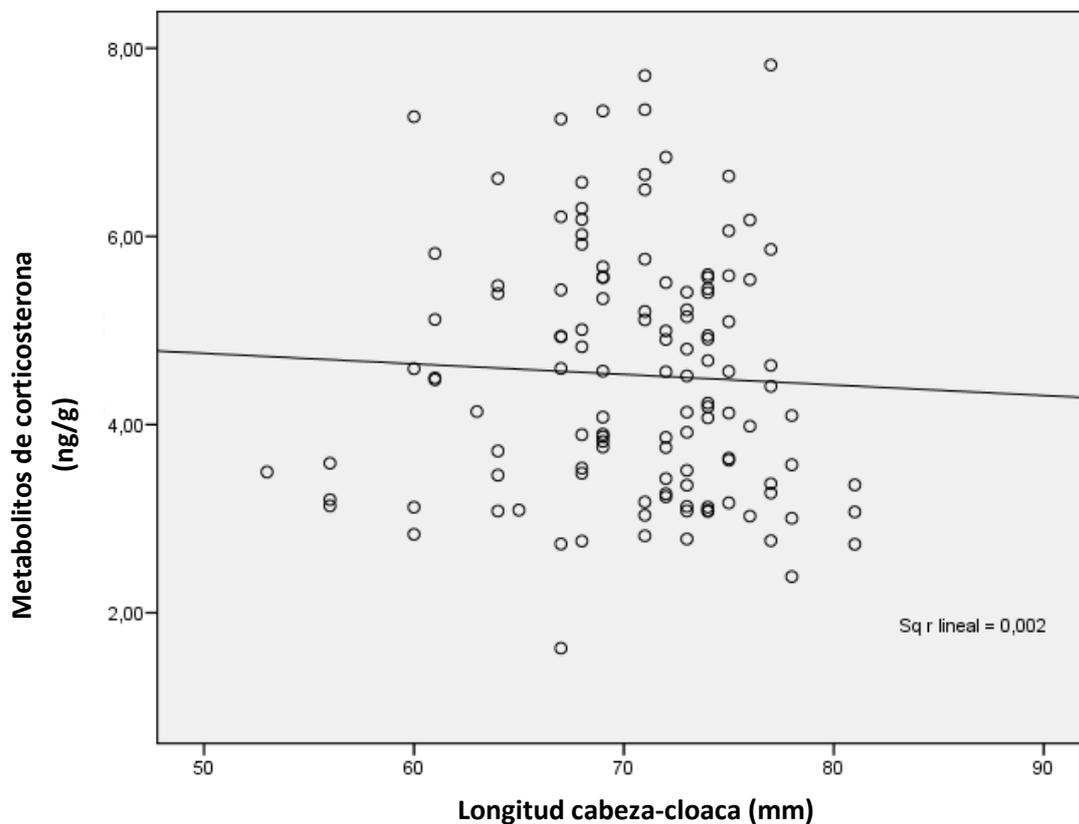
**Figura 11.** Niveles medios de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g) ( $\pm$  SE) en función del individuo macho adulto de lagartija carpetana capturado.



**Figura 12.** Correlación entre las variables cuantitativas peso y longitud cabeza-cloaca de los machos adultos de lagartija carpetana capturados en el estudio.



**Figura 13.** Correlación entre las variables cuantitativas niveles de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g) y peso (g) de los machos adultos de lagartija carpetana.



**Figura 14.** Correlación entre las variables cuantitativas niveles de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g) y longitud cabeza-cloaca de los machos adultos de lagartija carpetana capturados durante el estudio.

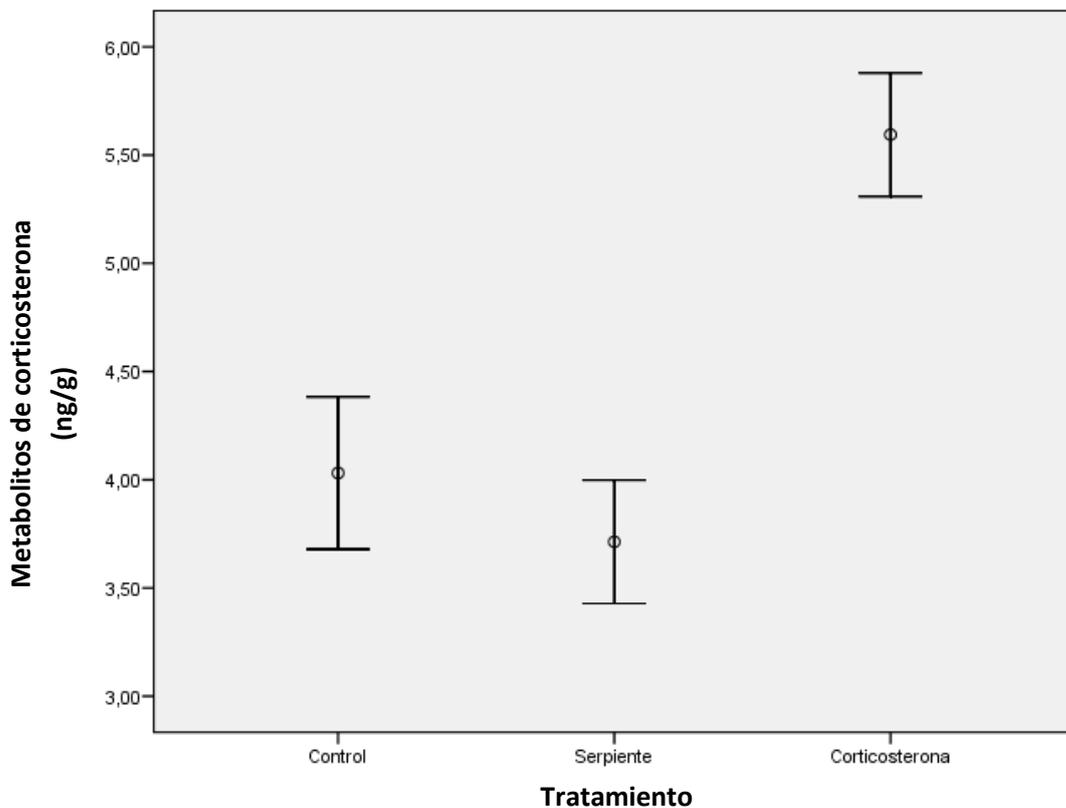
El Modelo Lineal General (MLG) indicó que el factor que influyó en los niveles de metabolitos de corticosterona fecal de los sujetos del experimento fue el tratamiento (Tabla 1), siendo las lagartijas sometidas a la impregnación de corticosterona las que mostraron niveles de metabolitos de glucocorticoides fecales significativamente mayores ( $5,59 \pm 0,14$  ng/g) que los individuos control ( $4,03 \pm 0,18$  ng/g) y los sometidos al olor de depredador ( $3,71 \pm 0,14$  ng/g) (Fig. 15).

También la variable perturbación resultó marginalmente significativa (Tabla 1) tendiendo a mostrar mayores niveles de metabolitos de corticosterona fecal los machos procedentes de la zona más turística que los de la zona con menor turismo ( $4,49 \pm 0,16$  vs  $4,38 \pm 0,16$  ng/g) (Fig. 16). Los factores peso y longitud no influyeron en la variación de los niveles de metabolitos de corticosterona fecal (Tabla 1).

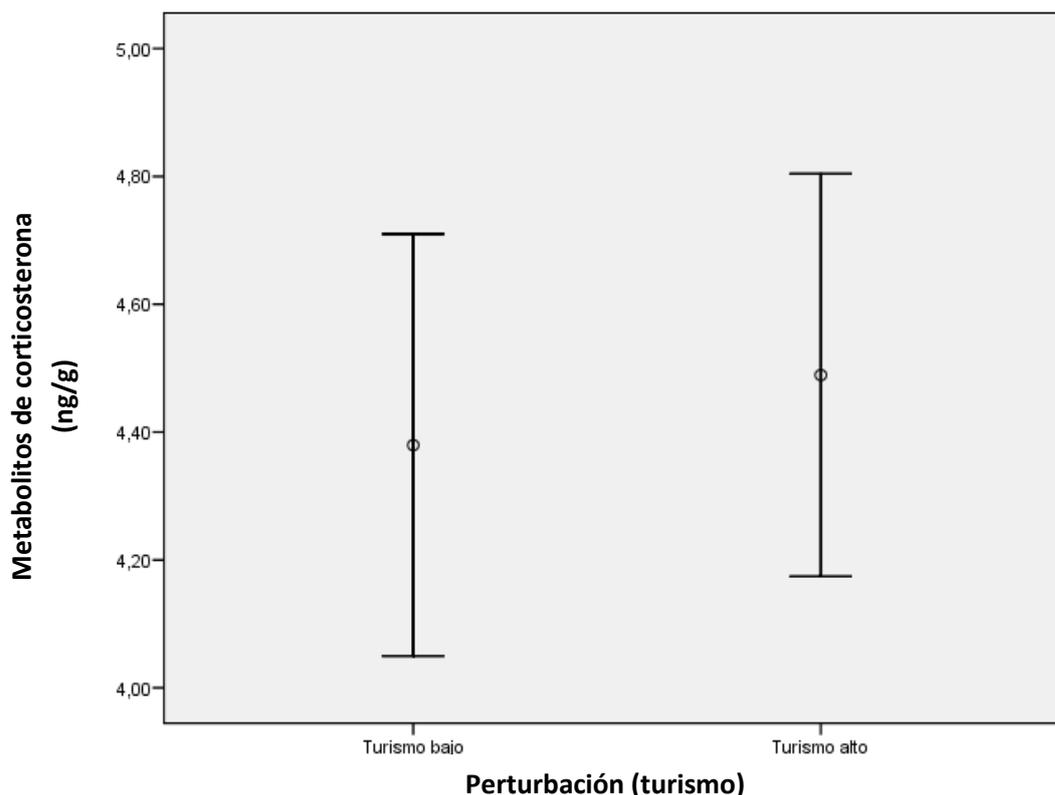
La interacción entre los factores tratamiento\*perturbación tampoco mostró ninguna influencia en los niveles de metabolitos de corticosterona fecal de los individuos (Tabla 1).

Factores	F	gl	p
<b>Tratamiento</b>	38,52	2	<b>0,0001</b>
<b>Perturbación</b>	3,67	1	<b>0,058</b>
<b>Peso</b>	0,96	1	0,329
<b>Longitud</b>	1,83	1	0,179
<b>Tratamiento*perturbación</b>	0,66	2	0,520

**Tabla 1.** Resultados del Modelo Lineal General (MLG) en el cual se analizó la influencia de los factores tratamiento, perturbación humana del hábitat del que procedían las lagartijas, peso, longitud cabeza-cloaca y la interacción entre el tratamiento y la perturbación.



**Figura 15.** Niveles medios de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g) ( $\pm$  SE) de los machos adultos de lagartija carpetana en función del tratamiento experimental.



**Figura 16.** Niveles medios de metabolitos de corticosterona fecal (ng/g) ( $\pm$  SE) de las lagartijas en función del nivel de turismo del hábitat donde fueron capturadas.

Como el MLG mostró que la variable tratamiento influía en la variación encontrada en los niveles de metabolitos de corticosterona fecal de los machos adultos de lagartija carpetana, se realizó un análisis *post hoc* para conocer entre qué categorías de la variable había diferencias significativas.

De esta forma, el resultado del análisis (HSD de Tukey) mostró diferencias significativas entre el tratamiento de corticosterona y los otros dos tratamientos: olor de serpiente y control (Tabla 2). Sin embargo, no había diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con olor de serpiente y el control (Tabla 2), siendo los niveles de metabolitos de corticosterona fecal similares en los individuos de ambos grupos experimentales (Fig. 15).

Tratamientos	Diferencia de medias	P	IC (95%)	
			Límite inferior	Límite superior
<b>Corticosterona x Serpiente</b>	1,88	0,0001	1,37	2,40
<b>Corticosterona x Control</b>	1,57	0,0001	1,04	2,08
<b>Serpiente x Control</b>	-0,32	0,315	-0,83	0,20

**Tabla 2.** Resultados del análisis *post hoc* (HSD de Tukey) realizado en la variable tratamiento que muestra las diferencias significativas entre los distintos grupos dentro de la variable.

## 5. DISCUSIÓN

El medio natural en el que se encuentran los animales así como los potenciales factores adversos del mismo pueden provocar cambios fisiológicos en las poblaciones naturales como la activación de la respuesta de estrés fisiológico (Wingfield *et al.*, 1997; Smallridge & Bull, 2000). El presente trabajo trata de mostrar que los niveles de corticosterona varían en gran medida dentro de la propia especie según los diferentes factores ambientales de cada individuo.

En los animales silvestres la presión depredadora es uno de los estímulos externos más estresantes y los animales están en constante gasto energético debido a las respuestas antidepredatorias que realizan para eludir el ser cazados (Lima & Dill, 1990; Wingfield *et al.*, 1997). Esto ha sido puesto de manifiesto principalmente en mamíferos (Boonstra *et al.*, 1998; Eilam *et al.*, 1999; Barja *et al.*, 2007, 2008). Sin embargo, también existen algunos estudios sobre los efectos del estrés fisiológico y el gasto energético de la actividad antidepredatoria en reptiles (Pérez-Tris *et al.*, 2004; Amo *et al.*, 2007).

Según el análisis de las variables, la localización influyó de forma significativa en los niveles de metabolitos de corticosterona fecal en los individuos. La localización hace referencia al lugar de recolección de las muestras, es decir, si se recogieron de lagartijas directamente del campo en las salidas al puerto de Navacerrada o si fueron obtenidas las muestras de los individuos que fueron capturados y mantenidos en la base biológica del Ventorrillo. Así, las muestras fecales recolectadas en el campo mostraron mayores niveles de metabolitos de corticosterona fecal que las procedentes de individuos mantenidos en el Ventorrillo. Esto demuestra que aparentemente el estrés provocado por la presión depredatoria en el medio natural activa en menor medida la respuesta de estrés fisiológica en el individuo que el hecho de encontrarse en cautividad, lo cual supone un cambio drástico de su modo de vida, sumado al hecho de que en los días de recogida de muestras tras el tratamiento al ir a manipularlas también se activarían en cierto modo respuestas antidepredatorias frente a la persona (Amo *et al.*, 2006; Barja *et al.*, 2007, Piñeiro *et al.*, 2012).

A excepción de la variación de los niveles de metabolitos de corticosterona fecal en función de cada individuo, no se ha podido registrar estadísticamente ninguna otra variación significativa con otras variables tales como peso o longitud del individuo. Esto puede deberse al tamaño de muestra, quizá con un mayor número de individuos y muestras podría determinarse si varían los niveles de corticosterona en función de la talla o el peso del individuo. No obstante cabe decir que en este estudio se han utilizado individuos machos y adultos únicamente precisamente para reducir el número de variables del estudio que pudieran interferir en el objetivo. Estudios previos indicaron que los individuos juveniles poseen mayores niveles de metabolitos de corticosterona que los adultos en lagartijas (Moore *et al.*, 1991; DeNardo & Licht, 1993), del mismo modo, también se encontraron diferencias en la respuesta de estrés en función del sexo, siendo ésta mayor en machos que en hembras (Amo *et al.*, 2006, 2007). No obstante, la

influencia del sexo sobre la respuesta de estrés apenas se ha estudiado en reptiles, pero existen varios estudios sobre este aspecto en mamíferos (Touma et al., 2003, 2004; Navarro-Castilla & Barja, 2014; Navarro-Castilla *et al.*, 2014a, b).

La única correlación significativa obtenida en el estudio ha sido entre el peso y la longitud de los individuos, y ninguna de éstas con los niveles de metabolitos de corticosterona fecal de los animales. Como se ha mencionado anteriormente puede haber sido influyente en este ámbito el tamaño de la muestra con lo que un número mayor de individuos aclararía si hay o no una verdadera correlación entre nivel de metabolitos de corticosterona fecal y otros factores potencialmente influyentes como pueden ser el estatus social, el hábitat, la salud del individuo, etc.

En el Modelo Lineal General (MLG) se incluyeron factores como el tratamiento, la perturbación (turística), el peso, la longitud cabeza-cloaca y la interacción tratamiento\*perturbación para comprobar cómo afectan dentro de los individuos machos adultos de *Iberolacerta cyreni* a sus niveles de metabolitos de corticosterona fecal. Como resultado del modelo se comprobó que los sujetos mostraban mucha variación en los niveles de corticosterona dependiendo del tratamiento al que fueron sometidos, sobre todo el grupo experimental sometido a la corticosterona durante los diez días de tratamiento constante. Aunque el tratamiento es el único factor que mostró una variación significativa, ha sido remarcado en el trabajo el factor perturbación humana del medio del que procedían los ejemplares de lagartija. Este factor se encuentra en el límite de mostrar diferencias estadísticas significativas en relación al nivel de metabolitos de corticosterona fecal y es uno de los temas más importantes a discutir ya que en este caso estos resultados son igualmente relevantes. Por este motivo en este trabajo se hace referencia al factor perturbación como marginalmente significativo ya que se puede observar una tendencia a mostrar mayores niveles de metabolitos de corticosterona fecal en las lagartijas provenientes de la zona más turística del estudio que en las capturadas en la zona con menos presencia turística. Además, a pesar de ser un resultado marginalmente significativo, se corrobora y está de acuerdo con estudios anteriores sobre los efectos del estrés sobre el comportamiento en lagartijas provocado por la presencia humana en su hábitat natural (Martín *et al.*, 2003; Pérez-Tris *et al.*, 2004; Amo *et al.*, 2007) lo cual aumenta el número de comportamientos de respuesta antidepredatoria al considerar al ser humano como un potencial depredador. Esta respuesta etológica se ha estudiado no sólo en reptiles sino también en mamíferos por numerosos autores (Eilam *et al.*, 1999; Touma *et al.*, 2003, 2004).

En los demás factores incluidos en el modelo no se apreciaron diferencias significativas por lo que no se pudo demostrar su relación con los niveles de metabolitos de corticosterona fecal. Ni siquiera la interacción entre el tratamiento que recibieron las lagartijas y el nivel de perturbación humana del lugar de procedencia fue significativo en relación a los niveles de metabolitos de corticosterona fecal de los individuos.

El tratamiento fue el único factor que se encontró relacionado significativamente con los niveles de metabolitos de corticosterona fecal de las lagartijas. No obstante se

puede observar que dicho nivel es mucho mayor en los animales objetos de la corticosterona que en los que fueron tratados con olor de serpiente y los controles. Con el fin de aclarar las relaciones entre los grupos del tratamiento y explicar los resultados obtenidos se realizó un análisis post hoc de la variable tratamiento en el Modelo Lineal General (MLG). Mediante este análisis quedan definidas completamente las diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento. De este modo el grupo de corticosterona presenta diferencias significativas con los grupos de olor a serpiente y control, mientras que entre el grupo control y el grupo sometido a olor de culebra no hay ninguna diferencia significativa aparente, es decir, los individuos muestran niveles de metabolitos de corticosterona fecal similares.

Las diferencias en los niveles de corticosterona fecal en cuanto al grupo más significativo es coherente con estudios previos en los que tratamientos directos con glucocorticoides inducen la respuesta de estrés fisiológica a niveles elevados en vertebrados (Martín & López, 1999; Eilam *et al.*, 1999). Cabe esperar que al someter a un animal a un fuerte estímulo adverso como es el olor de un depredador la respuesta de estrés fisiológica se dispare, y así ocurre en la naturaleza. A pesar de que el tratamiento de olor se realizó durante diez días para cumplir el mismo tiempo que el de corticosterona, los niveles de metabolitos de corticosterona de los individuos no aumentaron. Esto puede deberse a dos causas metodológicas posibles, o bien el tiempo de tratamiento fue insuficiente para provocar la respuesta de estrés fisiológica a largo plazo; o bien la concentración del odorante no fue suficiente, siendo necesaria una mayor cantidad de sustrato impregnado de olor de serpiente para activar la respuesta de estrés. Esto tiene sentido considerando que, en su medio natural, las lagartijas se encuentran en constante desplazamiento y, por tanto, en contacto con potenciales depredadores cuyos estímulos provocarían respuesta de estrés fisiológica que derivan en comportamientos antidepredatorios costosos como la huida constante de sus enemigos (Lima & Dill, 1990; Martín *et al.*, 2003; Amo *et al.*, 2006, 2007; Navarro-Castilla & Barja, 2014). El comportamiento de huida no era necesario para las lagartijas del experimento en cautividad, lo cual puede ser el factor clave en la respuesta de estrés fisiológica antidepredatoria, a pesar de los olores de serpiente a los que fueran sometidas.

Aparte de las causas metodológicas, se contempla también una causa ecológica para los resultados del tratamiento de olor de culebra, y es precisamente la diferencia entre el estrés agudo y el estrés crónico en las presas de los depredadores. Si bien es cierto que los estímulos adversos de potenciales depredadores disparan procesos de respuesta antidepredatoria costosos, precisamente por ello no se pueden mantener en el tiempo por la propia supervivencia del animal (Lima & Dill, 1990; Smallridge & Bull, 2000; Martín *et al.*, 2003; Navarro-Castilla *et al.*, 2014a, b). El primer encuentro con el depredador dispararía la respuesta de estrés fisiológico pero sería una situación de estrés agudo, poco persistente en el tiempo, por lo que los siguientes encuentros no provocarían una respuesta tan costosa. Si la respuesta de estrés fisiológica primera persistiese en el tiempo, entonces se darían casos de estrés crónico en los individuos que

podría derivar en problemas y desajustes fisiológicos y reproductivos que pondrían en peligro su supervivencia (Sapolsky, 1992; Möstl & Palme, 2002; Stewart, 2003).

Esto es a lo que puede deberse el resultado del tratamiento de olor de culebra en las lagartijas carpetanas, un estímulo persistente en el tiempo durante los 10 días del tratamiento que provoca al inicio una situación de estrés agudo pero que no influye a largo plazo por lo que al recoger las muestras los días sucesivos al tratamiento es como si el grupo sujeto fuera grupo control también, a efectos de los niveles de metabolitos de corticosterona fecales.

## 6. CONCLUSIONES

Hay una variación significativa en los niveles de metabolitos de corticosterona fecal en función del tratamiento al que fueron sometidas las lagartijas. Así, las lagartijas sujeto del experimento de corticosterona mostraron niveles de estrés fisiológico más elevados en relación a los niveles medios analizados de las lagartijas control y de las lagartijas sometidas a olor de depredador. No obstante uno de los objetivos del presente estudio era conocer la respuesta de estrés fisiológica de la lagartija carpetana inducida por el estímulo del olor de un depredador natural como la culebra lisa europea (*Coronella austriaca*), y esto no se ha podido evidenciar posiblemente debido a varios factores que deben ser objeto de futuros estudios: la concentración de odorante de la culebra y el tiempo del tratamiento. A pesar de ello son datos valiosos que darán pie a trabajos futuros sobre niveles de estrés en animales silvestres y de base metodológica para proceder en caso de estudios posteriores sobre niveles de metabolitos de glucocorticoides en *Iberolacerta cyreni* (y otras especies de lagartijas) bajo la presión de un depredador natural y en relación con otros agentes estresantes. Por ello se invita a realizar estudios similares, utilizando mayores concentraciones de odorantes de culebra, para comprobar cómo afecta el estímulo de un depredador a la respuesta de estrés fisiológica del animal.

El otro ámbito de la respuesta de estrés fisiológica a estudiar era la percepción del ser humano como potencial depredador por parte de las lagartijas silvestres. De esta forma se quería conocer cómo afecta la perturbación humana a la lagartija carpetana, una especie endémica y amenazada, que habita en el Puerto de Navacerrada. Los resultados resultaron ser marginalmente significativos pero aun así se puede observar un mayor nivel de metabolitos de corticosterona fecal en los individuos que proceden de una zona más turística que en las lagartijas procedentes de la zona menos frecuentada por el ser humano. De nuevo estos datos poseen valor en vistas a estudios futuros sobre la gestión del turismo en el Parque Nacional de la Sierra de Guadarrama en las zonas de distribución de la especie y de mayor presión turística. Sin embargo, son necesarios trabajos similares para evidenciar empíricamente y completamente que la perturbación humana provocada por el ecoturismo masivo actual es un factor de estrés para la lagartija carpetana en el área de estudio, lo cual puede llegar a afectar a su *fitness*

biológico como especie. Sería de gran interés realizar investigaciones para conocer el efecto del turismo a largo plazo sobre la respuesta de estrés fisiológico y conocer si estamos ante una respuesta adaptativa o éste está afectando a la eficacia biológica de la especie.

Además, señalar que conviene analizar la respuesta comportamental de la especie a la par que la respuesta fisiológica, ya que los animales pueden usar una estrategia u otra, o ambas cuando el riesgo es muy inminente. Por último, indicar que este tipo de estudios ayudará a la gestión de la especie y, sin duda, a su conservación y a la de otras muchas que ocupen hábitats donde la perturbación humana es elevada.

## 7. AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me han apoyado y ayudado a llevar a cabo este trabajo, entre ellos mis directores del trabajo, el Dr. José Martín y la Dra. Isabel Barja, los cuales han tenido la paciencia de tutelarme y guiarme durante todo el proceso, tanto en la recogida de muestras en el campo y en la Estación Biológica del Ventorrillo como en el análisis en el laboratorio de Etología del Departamento de Biología (Unidad Zoología) de la Universidad Autónoma de Madrid.

Al Museo Nacional de Ciencias Naturales y a la Universidad Autónoma de Madrid por la disponibilidad de sus instalaciones para la realización del este estudio.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Amo, L., López, P. & Martín, J. 2004. Chemosensory recognition of its lizard prey by the ambush smooth snake, *Coronella austriaca*. *Journal of Herpetology* 38: 451-454.

Amo, L., López, P. & Martín, J. 2006. Nature-based tourism as a form of predation risk affects body condition and health state of *Podarcis muralis* lizards. *Biological Conservation* 131: 402-409.

Amo, L., López, P. & Martín, J. 2007. Habitat deterioration affects body condition of lizards: A behavioral approach with *Iberolacerta cyreni* lizards inhabiting ski resorts. *Biological Conservation* 135: 77-85.

Arnold, E.N., Arribas, O. & Carranza, S. 2007. Systematics of the Palearctic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with descriptions of eight new genera. *Zootaxa* 1430.

Arnold, E.N. & Oviden, D.W. 2007. *Reptiles y anfibios. Guía de campo*. Ediciones Omega, Barcelona.

- Arribas, O. 2010. Intraspecific variability of the Carpetane lizard (*Iberolacerta cyreni* [Müller & Hellmich, 1937]) (Squamata: Lacertidae), with special reference to the unstudied peripheral populations from the Sierras de Ávila (Paramera, Serrota and Villafranca). *Bonn Zoological Bulletin* 57(2): 197-210.
- Axelrod, J. & Reisine, T.D. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459.
- Barja, I., Silván, G. & Illera, J.C. 2008. Relationships between sex and stress hormone levels in feces and marking behaviour in a wild population of Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *J. Chem. Ecol.* 34: 697-701.
- Barja, I., Silván, G., Rosellini, S., Piñeiro, A., González-Gil, A., Camacho, L. & Illera, J.C. 2007. Stress physiological responses to tourist pressure in a wild population of European pine marten. *Jour. Ster. Bioch. Mol. Bio.* 104: 136-142.
- Boonstra, R., Hik, D., Singleton, G.R. & Tinnikov, A. 1998. The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecol. Monogr.* 79: 371-394.
- Broom, D.M. & Johnson, K.G. 1993. *Stress and Animal Welfare*. Chapman & Hall, London.
- Cote, J., Clobert, J., Montes-Poloni, L., Haussy, C. & Meylan, S. 2010. Food deprivation modifies corticosterone-dependent behavioural shifts in the common lizard. *General and Comparative Endocrinology* 166: 142-151.
- DeNardo, D.F. & Licht, P. 1993. Effects of corticosterone on social behavior of male lizards. *Hormones and Behavior* 27: 184-199.
- Diego-Rasilla, F. J. 2003a. Human influence on the tameness of wall lizard, *Podarcis muralis*. *Italian Journal of Zoology* 70: 225-228.
- Diego-Rasilla, F. J. 2003b. Influence of predation pressure on the escape behaviour of *Podarcis muralis* lizards. *Behavioural Processes* 63: 1-7.
- Eilam, D., Dayan, T., Ben-Eliyahu, S., Schulman, I., Shefer, G. & Hendrie, C.A. 1999. Differential behavioural and hormonal responses of voles and spiny mice to owl calls. *Anim. Behav.* 58: 1085-1093.
- Goymann, W., Möstl, E., Van't Hof, T., East, M.L. & Hofer, H. 1999. Noninvasive fecal monitoring of glucocorticoids in spotted hyaenas (*Crocuta crocuta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 114: 340-348.
- Lima, S.L. & Dill, L.M. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68: 619-640.
- Martín, J. 2005. Lagartija carpetana – *Iberolacerta cyreni*. In: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Carrascal, L.M. & Salvador, A. (eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

- Martín, J. & López, P. 1999. An experimental test of the costs of antipredatory refuge use in the wall lizard, *Podarcis muralis*. *Oikos* 84: 499-505.
- Martín, J., López, P. & Cooper Jr., W.E. 2003. Loss of mating opportunities influences refuge use in the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 54: 505-510.
- Martín, J. & Salvador, A. 1997. Microhabitat selection by the Iberian rock lizard *Lacerta monticola*: effects on density and spatial distribution of individuals. *Biological Conservation* 79: 303-307.
- Masó, A. & Pijoan, M. 2011. *Anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Baleares y Canarias. Nuevas guías de campo*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Mayer, W. & Arribas, O. 2003. Phylogenetic relationships of the European lacertid genera *Archaeolacerta* and *Iberolacerta* and their relationships to some other 'Archaeolacerta' (sensu lato) from Near East, derived from mitochondrial DNA sequences. *Jour. Zool. Syst. Evol. Rese.* 41: 157-161.
- Meylan, S., Dufty, A.M. & Clobert, J. 2003. The effect of transdermal corticosterone application on plasma corticosterone levels in pregnant *Lacerta vivipara*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134: 497-503.
- Meylan, S., Haussy, C. & Voituron, Y. 2010. Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *General and Comparative Endocrinology* 169: 158-166.
- Moberg, G.P. 1999. When does stress become distress. *Laboratory Animals* 28: 22-26.
- Monfort, S.L., Mashburn, K.L., Brewer, B.A. & Creel, S.R. 1998. Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *J. Zoo Wildl. Med.* 29: 129-133.
- Moore, M.C., Thompson, C.W. & Marler, C.A. 1991. Reciprocal changes in corticosterone and testosterone levels following acute and chronic handling stress in the tree lizard, *Urosaurus ornatus*. *General and Comparative Endocrinology* 81: 217-226.
- Möstl, E. & Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23: 67-74.
- Navarro-Castilla, Á. & Barja, I. 2014. Does predation risk, through moon phase and predator cues, modulate food intake, antipredatory and physiological responses in wood mice (*Apodemus sylvaticus*)? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68: 1505-1512.
- Navarro-Castilla, Á., Barja, I., Olea, P.P., Piñeiro, A., Mateo-Tomás, P., Silván, G. & Illera, J.C. 2014a. Are degraded habitats from agricultural crops associated with elevated faecal glucocorticoids in a wild population of common vole (*Microtus arvalis*)? *Mamm. Biol.* 79: 36-43.

- Navarro-Castilla, Á., Mata, C., Ruiz-Capillas, P., Palme, R., Malo, J.E. & Barja, I. 2014b. Are motorways potential stressors of roadside Wood mice (*Apodemus sylvaticus*) populations? PLoS ONE 9(3): e91942. doi:10.1371/journal.pone.0091942.
- Pérez-Mellado, V. 2002. *Lacerta monticola* Boulenger, 1905. Lagartija serrana. In: Pleguezuelos, J. M., Márquez, R. & Lizana, M. (eds.). *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española, Madrid, 228-230.
- Pérez-Mellado, V., Cheylan, M. & Martínez-Solano, I. 2009. *Iberolacerta cyreni*. In: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <www.iucnredlist.org>.
- Pérez-Tris, J., Díaz, J.A. & Tellería, J.L. 2004. Loss of bodymass under predation risk: cost of antipredator behaviour or adaptive-fit-for escape? *Animal Behaviour* 67: 511-521.
- Piñeiro, A., Barja, I., Otero-Alonso, G.P., Silván, G. & Illera, J.C. 2015. No effects of habitat, prey abundance and competitor carnivore abundance on faecal cortisol metabolite levels in wildcats (*Felis silvestris*). *Annales Zoologici Fennici* 52: 90-102.
- Piñeiro, A., Barja, I., Silván, G. & Illera, J.C. 2012. Effects of tourist pressure and reproduction on physiological stress response in wildcats: management implications for species conservation. *Wildlife Res.* 39: 532-539.
- Sands, J. & Creel, S. 2004. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Anim. Behav.* 67: 387-396.
- Sapolsky, R. 1992. Neuroendocrinology of the stress response. In: Becker, J.B., Breedlove, S.M. & Crews, D. (eds.). *Behavioral Endocrinology*. MIT Press, Cambridge, 287-324.
- Smallridge, C.J. & Bull, C.M. 2000. Prevalence and intensity of the blood parasite *Hemolivia mariae* in a field population of the skink lizard *Tiliqua rugosa*. *Parasitology Research* 86: 655-660.
- Stewart, P.M. 2003. The adrenal cortex. In: Larsen, P.R., Kronenberg, H.M., Melmed, S. & Polonsky, K.S. (eds.). *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders, Philadelphia, 491-551.
- Touma, C., Palme, R. & Sachser, N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm. Behav.* 45: 10-22.
- Touma, C., Sachser, N., Möstl, E. & Palme, R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130: 267-278.

Von der Ohe, C.G., Wasser, S.K., Hunt, K.E. & Servheen, C. 2004. Factors associated with fecal glucocorticoids in Alaskan brown bears (*Ursus arctos horribilis*). *Physiol. Biochem. Zool.* 77(2): 313-320.

Wingfield, J.C., Hunt, K., Breuner, C., Dunlap, K., Fowler, G.S., Freed, L. & Lepson, J. 1997. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: Clemmons, J.R. & Buchholds, R. (eds). Behavioral approaches to conservation in the wild. Cambridge University Press, Cambridge, 95-131.