

Avaluació de l'estat fisiològic del conill (*Oryctolagus cuniculus*) per mitjà de biomarcadors bioquímics

Silvia TEJADA^{1,2}, Carla BUSQUETS-CORTÈS³, Margalida MONSER-RAT^{2,3}, Xavier CAPÓ³, Vanesa CASTILLO⁴, Catalina RAYÓ⁴, Maria MUÑOZ⁴ i Antoni SUREDA^{2,3}



SOCIETAT D'HISTÒRIA
NATURAL DE LES BALEARS



Consell de
Mallorca

■ Departament de
Desenvolupament Local

Tejada, S., Busquets-Cortès, C., Monserrat, M., Capó, X., Castillo, V., Rayó, C., Muñoz, M. i Sureda, A. 2019. Avaluació de l'estat fisiològic del conill (*Oryctolagus cuniculus*) per mitjà de biomarcadors bioquímics. In: Pons, G.X., Barceló, A., Muñoz, M., del Valle, L. i Seguí, B. (editors). Recerca i gestió dins l'àmbit cinegètic. Mon. Soc. Hist. Nat. Balears, 28: 41-49. ISBN 978-84-09-11001-8.

El conill europeu (*Oryctolagus cuniculus*) és una de les espècies de vertebrats més importants dels ecosistemes Mediterranis. L'arribada de malalties virals, com la mixomatosi, han donat lloc a disminucions importants de les poblacions de conills salvatges. La determinació de biomarcadors de l'estat pro-oxidant / anti-oxidant permeten avaluar l'existència d'algun factor ambiental o infecció que indueixi una situació d'estrès a l'animal. L'objectiu del present estudi va ser avaluar biomarcadors d'estrès a conills obtinguts en diferents modes de captura i en conills afectats per mixomatosi. Els resultats obtinguts no evidencien cap tipus de diferència en les activitats plasmàtiques dels enzims antioxidants, de l'activitat mieloperoxidasa ni dels nivells de malondialdehid en funció de la diferent modalitat de captura: ca evivenc, fura o grup establut. La producció d'espècies reactives per part de les cèl·lules immunitàries tampoc no es veu modificada. Per contra, les activitats dels enzims catalasa, glutatió peroxidasa i glutatió reductasa són significativament més baixes a fetge en animals afectats de mixomatosi respecte als animals sans, mentre que els nivells de malondialdehid són significativament més elevats als animals malalts. En conclusió, el fet que no s'hagin observat diferències derivades del procés de captura ni respecte al grup control, demostra que els conills capturats gaudien d'un bon estat de salut. Els conills afectats per mixomatosi presenten a nivell hepàtic una disminució general de les defenses antioxidants i un augment del dany oxidatiu, cosa que posa de manifest la gravetat de la patologia.

Paraules clau: antioxidants; biomarcadors; conills; mixomatosi; estrès oxidatiu.

EVALUATION OF THE PHYSIOLOGICAL STATE OF THE RABBIT (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) BY MEANS OF BIOCHEMICAL BIOMARKERS. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is one of the most important vertebrate species in Mediterranean ecosystems. In the last 60 years, the arrival of viral diseases, such as myxomatosis, has led to significant diminution of the populations of wild rabbits. The determination of biomarkers of the pro-oxidant / anti-oxidant status allows the evaluation of the existence of an environmental or infectious factor that induces a situation of stress to the animal and the ability to respond and adapt to this situation. The aim of the present study was to evaluate stress biomarkers from rabbits obtained in different capture modes and rabbits affected by myxomatosis. The results obtained do not show any difference in the plasma activities of antioxidant enzymes, myeloperoxidase activity or malondialdehyde levels depending on the different way of capturing rabbits: Ibizan dogs, ferrets or the confined group. The production of reactive species by immune cells is

also unchanged. In contrast, the activities of catalase enzymes, glutathione peroxidase and glutathione reductase are significantly lower in liver in animals affected by myxomatosis compared to healthy animals, while levels of malondialdehyde are significantly higher in diseased animals. In conclusion, the fact that no differences derived from the capture process or the control group have been observed demonstrates that the captured rabbits are in a good state of health. Rabbits affected by myxomatosis have a general decrease in antioxidant defences and an increase in oxidative damage, evidencing the seriousness of the pathology.

Keywords: antioxidants, biomarkers, rabbits, myxomatosis, oxidative stress.

1 Laboratori de Neurofisiologia, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears, E-07122, Palma de Mallorca, Espanya.

2 CIBEROBN (Fisiopatologia de l'Obesitat i Nutrició), Universitat de les Illes Balears, E-07122, Palma de Mallorca, Espanya.

3 Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu (NUCOX), Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, E-07122, Palma de Mallorca, Espanya.

4 Servei de Caça, Consell Insular de Mallorca, E-07010, Palma de Mallorca, Espanya.

Autor de correspondència: Dr. Antoni Sureda. Email: tosugo@hotmail.com

Introducció

El conill (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758) és un petit mamífer present a moltes zones Mallorca.

La dada més antiga sobre la introducció del conill a les Balears no prové de cap jaciment arqueològic, sinó de les cales realitzades a la bretxa fossilífera del Pas d'en Revull, a Menorca. Entre la fauna recuperada, juntament amb les espècies autòctones, hi havia restes de fauna introduïda. Un os de conill datat per C14 va proporcionar una data situada a grans trets entre 800-500 aC (Quintana *et al.*, 2016).

Tal com indica Ramis (2017), després d'aquesta data segueix un buit al registre, i el conill torna reaparèixer als contextos tardans del període talaiòtic a Talatí de Dalt, a Biniparratx Petit i a Cornia Nou (Menorca) i a Ses Païsses i a S'Hospitalet Vell (Mallorca), on les restes de conill presenten evidències de consum alimentari. Tots aquests conjunts s'aglutinen al voltant dels segles III-II aC. També ha estat citat al poblat de S'Illot (Mallorca), on la seva atribució cronològica és imprecisa.

Aquesta espècie es troba en diferents hàbitats predominant en zones de boscos, praderies i àrees de conreu sobretot a zones del Pla (Villafuerte, 2007). Aquesta espècie és molt valuosa pel seu impacte biològic com a element dinamitzador de l'ecosistema i per la seva posició dins la cadena tròfica, donat que és presa de diferents depredadors. A més, també destaca des d'un punt de vista cultural donat que aquests conills han estat un dels elements bàsics d'alimentació dels illencs i han format part dels valors socioculturals i cinegètics a Mallorca. En aquest sentit, grans projectes de conservació d'espècies amenaçades com són l'àguila imperial o el linx, depenen fortament d'accions de recuperació del conill com a font principal d'aliment. Els conills són animals gregaris amb una capacitat de cria molt elevada, fins a 8-9 cries per part, raó que els fa encara més importants dins l'activitat cinegètica. De fet, el conill és una de les espècies inclòses dins el grup de mamífers que són caçables a Mallorca, juntament amb la llebre i la cabra. Malgrat això, aquesta espècie d'interès s'ha vist minvada als darrers anys per diversos factors destacant determinades malalties les quals han afectat la seva població, com són la mixomatosi, la pneumònia hemorràgia vírica, la sarna o el mal de potó, entre d'altres (Delibes-Mateos *et al.*, 2009). La mixomatosi és una malaltia viral causada per un Leporipoxvirus de la família Poxviridae, conegut com "Myxoma virus". El virus indueix

una malaltia benigna en el seu amfitrió natural, els conills sud-americans *Sylvilagus brasiliensis*, també anomenat tapeti o conill de selva, mentre que provoca la mixomatosi, una malaltia greu i sistèmica en conills salvatges domèstics i europeus (Villafuerte *et al.*, 2017). La malaltia es caracteritza per l'aparició de tumefaccions en la pell, seguit de conjuntivitis progressiva i secreció serosa / mucopurulenta dels ulls i el nas (Spiesschaert *et al.*, 2011). La infecció s'acompanya de la inflamació de la regió anogenital i de l'aparició de noves infeccions bacterianes en el tracte respiratori, ja que el sistema immunitari de l'hoste infectat disminueix progressivament. L'animal es torna apàtic, perd l'apetit i desenvolupa febre, i normalment acaba morint entre els 10-14 dies després de la infecció.

Un dels mecanismes que tenim per tal de poder avaluar l'estat fisiològic d'una espècie determinada o grup d'organismes, sobretot per avaluar si es troben baix una situació d'estrès és per mitjà de biomarcadors. Està evidenciat que una situació d'estrès com pugui ser una malaltia, canvis en l'ambient o presència d'agents contaminants, pot provocar canvis a nivell fisiològic/bioquímic que poden ser mesurables i quantificables (Cipak Gasparovic *et al.*, 2017). En aquest sentit, el metabolisme cel·lular en condicions normals és una font contínua d'espècies reactives d'oxigen que se produeixen per processos cel·lulars com és la pròpia respiració o l'acció de les cèl·lules immunitàries. Aquestes espècies reactives si no són eliminades poden afectar a components cel·lulars com són els lípids, proteïnes i ADN i poden arribar a alterar el funcionament cel·lular normal. Davant això, les cèl·lules posseeixen un elaborat sistema de defenses antioxidants (enzimàtics i no-enzimàtics) que eliminen i/o prevenen la formació d'aquestes espècies reactives d'oxigen (Elias *et al.*, 1999). Malgrat aquestes defenses, en ocasions, la producció d'aquests substàncies prooxidants poden superar els mecanismes de defensa antioxidant i conduir a una situació de desequilibri que es coneix com estrès oxidatiu. Entre els principals mecanismes de defensa antioxidant destaquen els enzims catalasa que s'encarrega de detoxificar el peròxid d'hidrogen i l'enzim superòxid dismutasa que s'encarrega d'eliminar l'anió superòxid. Per altra banda, la mesura de l'activitat de les cèl·lules immunitàries dona una idea de la presència d'un estat pro-inflamatori que pugui ser indicatiu d'algun tipus d'infecció. Les cèl·lules mononucleades incrementen la seva producció d'espècies reactives davant un procés infecció per poder fer front al mateix, i l'activitat plasmàtica de la mieloperoxidasa, que produeix hipoclorit amb capacitat bactericida, es veu elevada per una activació de les cèl·lules polimorfonucleades.

Per això, el conill silvestre s'ha convertit en una espècie objectiu i d'importància des d'un punt de vista de conservació i gestió de la seva població. L'objectiu del present estudi va ser avaluar biomarcadors d'estrès a mostres de plasma de conills i la capacitat de produir espècies reactives d'oxigen per part de les cèl·lules immunitàries, avaluant si existeixen diferències degudes mètode de captura. En segon lloc es va avaluar els efectes de la mixomatosi sobre els biomarcadors d'estrès.

Material i mètodes

El present estudi està dividit en dos procediments experimentals diferenciats. En un primer procediment es van analitzar marcadors de l'estat pro-oxidant/anti-oxidant i de la resposta immunitària en mostres de sang d'un total de 50 conills, dels quals 26 han estat capturats per mitjà de cans eivissencs, 11 amb fura i 13 han estat capturats també amb cans però en una zona establada i es consideren com a controls. Al segon procediment experimental es van investigar marcadors d'estrès oxidatiu en mostres de fetge a un total de 18 conills, 9 sans i 9 amb mixomatosi tots ells capturats amb ca eivissenc

Les mostres de sang obtingudes del primer procediment per venopunció a l'orella utilitzant com anticoagulant EDTA van ser fraccionades en dues alíquotes diferents. Una primera fracció es va centrifugar a 900xg durant 15 minuts a 4°C per separar el plasma de les cèl·lules sanguínies. El plasma es va recuperar i utilitzar per les determinacions dels enzims antioxidants catalasa i superòxid dismutasa, l'enzim prooxidant mieloperoxidasa i els nivells de malondialdehid com indicador de la peroxidació lipídica. La segona fracció de mostra va ser centrifugada amb un gradient de densitat amb Ficoll a 750xg durant 15 minuts a 4°C per tal d'obtenir les cèl·lules immunitàries mononucleades (PBMCs). Aquestes cèl·lules van ser rentades amb PBS per aconseguir el seu aïllament i posteriorment van ser estimulades per determinar la seva capacitat de resposta davant un agent infecciós.

Al segon procediment, les mostres de fetge dels diferents exemplars es transportaren en gel i es van mantenir emmagatzemades a -80°C fins el seu processament i anàlisi. Al moment de fer les determinacions les mostres de fetge es van homogeneïtzar en deu volums (w / v) de tampó Tris-HCl 100mM, pH 7.5. Cada homogenat es va centrifugar a 9000g a 4°C durant 15 minuts. Després de la centrifugació, es van recollir els sobrenedants i van ser utilitzats per a les anàlisis bioquímiques.

Totes les anàlisis bioquímiques es varen normalitzar per mg de proteïna, determinada per mitjà d'un kit comercial colorimètric (Biorad®) utilitzant albúmina bovina com a estàndard.

Biomarcadors antioxidants i oxidants

Les activitats de la catalasa (enzim que detoxifica el peròxid d'hidrogen), la superòxid dismutasa (enzim que detoxifica l'anió superòxid), la glutatió peroxidasa (que elimina peròxid d'hidrogen i hidroperòxids), la glutatió reductasa (que recicla el glutatió) i la mieloperoxidasa (enzim que produeix hipoclorit) es varen determinar per mètodes espectrofotomètrics usant un Shimadzu UV-2100 a 37°C (Sureda *et al.*, 2011). L'activitat de l'enzim catalasa s'ha mesurat seguin la descomposició del peròxid d'hidrogen a 240 nm. L'activitat superòxid dismutasa es va determinar usant un sistema de xantina oxidasa / xantina per generar anió superòxid, el qual oxida el citocrom C que actua com indicador. El seguiment de la reacció es va dur a terme a 550 nm. L'activitat de glutatió peroxidasa va ser mesurada a 339 nm utilitzant un sistema acoblat amb peròxid d'hidrogen i glutatió reduït com a substrats i glutatió reductasa i NADPH com a indicadors enzimàtics i no enzimàtics. L'activitat de la glutatió reductasa es va avaluar utilitzant el glutatió oxidat com a substrat a 339 nm. L'activitat mieloperoxidasa es va mesurar per l'oxidació de guaiacol utilitzant peròxid d'hidrogen per iniciar la reacció i mesurant la variació d'absorbància a 470nm.

El malondialdehid (MDA) va ser analitzat per mitja d'una tècnica colorimètrica en microplaca (Bio-Tek®, PowerWaveXS). El MDA reacciona amb el reactiu meti-fenil-indol en condicions àcides per produir un compost que es pot mesurar espectrofotomètricament a 586 nm.

Producció d'espècies reactives per les cèl·lules immunitàries

Els PBMCs una vegada purificats varen ser estimulats amb lipopolisacàrid (LPS) que està format per fragments de paret bacteriana. Una vegada estimulats, la capacitat de resposta de les cèl·lules es va determinar mesurant la producció d'espècies reactives usant diclorofluoresceïna diacetat com a molècula indicadora. El seguiment de la fluorescència emesa (excitació, 480 nm; emissió, 530 nm) es va dur a terme durant 1 hora en un fluorímetre de microplaca (FL 9800 Microplate Fluorescence Reader, Bio-Tek Instruments, Inc.).

Anàlisi estadística

Les dades han estat analitzades amb el programa estadístic SPSS v25. En el cas del primer procediment experimental es va aplicar l'anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA). En el cas de les diferències per sexe i els resultats del segon procediment experimental, l'anàlisi es va fer mitjançant una t-Student per dades desparellades. Les dades es presenten com la mitja \pm error estàndard de la mitja i es considera $p < 0.05$ com estadísticament significatiu.

Resultats

Les zones de mostreig es trobaven principalment situades a la marina de Lluçmajor i Campos. Tots els conills del primer procediment que han estat analitzats a l'estudi eren adults, trenta dels quals eren mascles i vint femelles, amb un pes mitjà de 1103 ± 24 grams, i presentaven un bon estat sanitari sense cap indicatiu de patologia. Quan s'analitzen els resultats segons el sexe dels animals no s'han observat diferències significatives en cap dels paràmetres analitzats (resultats no presentats).

Els resultats obtinguts al primer procediment experimental respecte al diferent mode de captura es mostren a la Taula 1. Els resultats obtinguts no posen de manifest cap tipus de diferència en les activitats dels enzims antioxidants, de l'activitat mieloperoxidasa ni dels nivells de malondialdehid en funció de la diferent modalitat de captura dels conills ($p > 0.05$).

La capacitat de les PBMCs per produir espècies reactives es representa a la Fig. 1. Els resultats tampoc mostren cap tipus de diferència depenent del mètode de captura ($p > 0.05$).

Referent al segon procediment experimental, els resultats de les activitats enzimàtiques es mostren en la Fig. 2. Les activitats dels enzims catalasa, glutatió peroxidasa i glutatió reductasa són significativament més baixos ($p < 0.05$) als animals afectats de mixomatosi respecte als animals sans. L'activitat superòxid dismutasa, malgrat és més baixa als animals malalts, no arriba a presentar diferències significatives.

Els nivells de malondialdehid són significativament més elevats als conills amb mixomatosi ($6,07 \pm 0,51$ nmol/mg prot) respecte als animals sans ($3,48 \pm 0,58$ nmol/mg prot).

Taula 1. Activitat dels enzims antioxidants – catalasa i superòxid dismutasa-, de l'enzim pro-oxidant mieloperoxidasa i nivells de malondialdehid al plasma dels conills capturats per mitjà de cans eivissencs, fures i per cans però en una zona estabulada (controls). No s'observen diferències significatives entre cap dels grups, ANOVA d'un factor.

Table 1. Activity of antioxidant enzymes - catalase and superoxide dismutase - of the pro-oxidant enzyme myeloperoxidase and malondialdehyde levels in plasma of rabbits captured by Ibiza dogs, ferrets and dogs but in a confined area (controls). No significant differences were reported between any of the groups, one-way ANOVA.

	<i>Ca eivissenc</i>	<i>Fura</i>	<i>Control</i>
Catalasa (%)	96,1 \pm 8,8	81,8 \pm 11,2	100 \pm 16
Superòxid dismutasa (%)	101 \pm 3	90,1 \pm 4,3	100 \pm 5
Mieloperoxidasa (%)	103 \pm 12	113 \pm 6	100 \pm 15
MDA (nmol/mg prot)	0,92 \pm 0,07	0,70 \pm 0,07	0,86 \pm 0,08

Fig. 1. Producció d'espècies reactives d'oxigen a cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (PBMCs) de conills capturats per mitjà de cans eivissencs, fures i per cans però en una zona establuda (controls). No s'observen diferències significatives entre cap dels grups, ANOVA d'un factor.

Fig. 1. Production of reactive oxygen species in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of rabbits captured by Ibizan dogs, ferrets and dogs but in a confined area (controls). No significant differences were reported between any of the groups, one-way ANOVA.

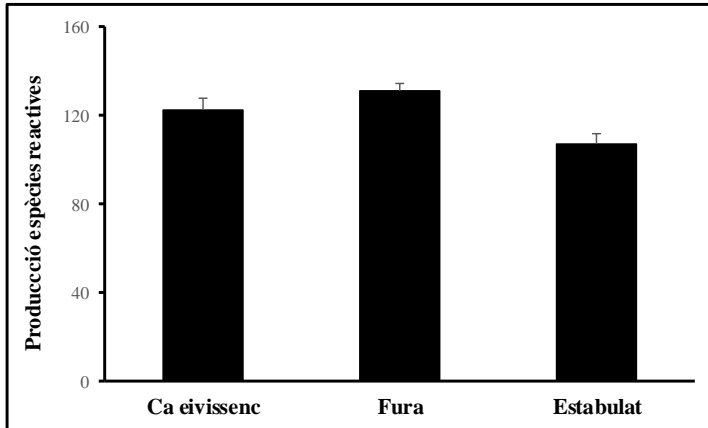
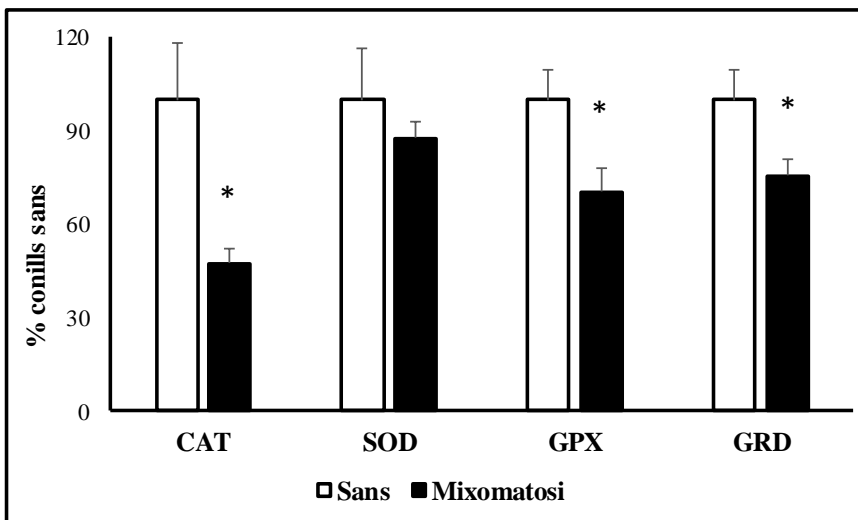


Fig. 2. Activitat dels enzims antioxidants al fetge dels conills sans i amb mixomatosi considerant les activitats dels animals sans com el 100%. * indica diferències significatives ($p < 0.05$) entre conills sans i conills amb mixomatosi aplicant una t-Student per dades desaparellades. CAT, catalasa; SOD, superòxid dismutasa; GPX, glutatí peroxidasa; GRD, glutatí reductasa.

Fig. 2. Activity of antioxidant enzymes in liver of healthy rabbits and with myxomatosis considering the activities of healthy animals as 100%. * indicates significant differences ($p < 0.05$) between healthy rabbits and rabbits with myxomatosis applying a t-Student for unpaired data. CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; GPX, glutathione peroxidase; GRD, glutathione reductase.



Discussió

La utilització de biomarcadors és un eina útil per monitoritzar alteracions que pugin afectar al funcionament fisiològic o bioquímic dels organismes. En aquest sentit, es d'esperar que els biomarcadors proporcionin una mesura integral de la resposta d'un organisme a l'exposició a una situació estressant com pot ser el procés de captura, constituint així una mesura de risc ecològic (Shugart *et al.*, 1992). Els biomarcadors han demostrat la seva utilitat en nombrosos estudis tant en ecosistemes marins com a terrestres i en tot tipus d'organismes (vegetals, animals invertebrats i vertebrats) (Monclús *et al.*, 2009; Pinya *et al.*, 2016; Tejada *et al.*, 2017). En el present estudi hem posat de manifest que els biomarcadors plasmàtics d'estrès oxidatiu es poden determinar de forma adient a mostres de conill i per tant poden ser adequades per fer estudis de monitorització sense fer necessari el sacrifici de l'animal.

Malgrat les femelles presenten unes activitats i valors de biomarcadors lleugerament inferiors als mascles, les diferències no són en cap cas significatives. Aquest fet ens indica que a nivell bioquímic el dimorfisme sexual no suposa diferències importants. La homogeneïtat observada entre mascles i femelles es un punt interessant a tenir en compte a l'hora de realitzar estudis de camp a on no es pot saber el sexe dels diferents organismes que es capturaran. En aquest sentit, els presents resultats indiquen que no es necessari capturar un nombre semblant d'ambdós sexes per tenir resultats fiables, sinó que en arribar a un nombre suficient per poder treballar amb ells es podrà aturar el mostreig. En molts casos, la diferència en els biomarcadors es sol relacionar amb la massa muscular, ja que es tracta d'un teixit que consumeix nivells considerables d'oxigen que pot acabar donant lloc a espècies reactives. El fet que els dos sexes presentin un pes semblant, dona suport a l'absència de diferències entre mascles i femelles.

Quan s'ha comparat el possible efecte del mètode de captura sobre els diferents individus tampoc s'observen diferències estadísticament significatives respecte als individus que es trobaven establats. Diversos estudis han posat de manifest que el risc de predació pot induir una situació d'estrès oxidatiu que provoca canvis en els mecanismes antioxidants associats amb un augment dels indicadors de dany oxidatiu i la producció d'espècies reactives (Janssens i Stoks, 2014; Pinya *et al.*, 2016; Morosinotto *et al.*, 2018). El fet d'haver de fugir d'un depredador provoca un augment de la taxa metabòlica de les preses que podrien manifestar-se a nivells de biomarcadors anti- o pro-oxidants. En el present estudi el període de captura per part dels cans o de les fures és curt i, per tant, potser no suficient per poder evidenciar diferències en els biomarcadors bioquímics als conills. Per altra banda, el fet que tots els conills capturats presentin unes bones condicions sanitàries ens indica que si no hi ha algun tipus de patologia evident, els animals no presenten alteracions en els seus mecanismes de defensa antioxidant o en la resposta immunitària.

La mixomatosi és una patologia greu que en un gran nombre de casos acaba amb la mort de l'animal afectat en menys de dues setmanes des de l'inici de la infecció (Spiesschaert *et al.*, 2011). Els presents resultats evidencien una disminució significativa dels mecanismes de defensa antioxidant al fetge dels animals malalts i un augment del grau de peroxidació lipídica – malondialdehid – com a marcador de dany oxidatiu. Aquest resultat estan d'acord amb els observats per un estudi on els nivells de malondialdehid a plasma de conills afectats per mixomatosi o pel virus de malaltia hemorràgica de conill són significativament més elevats que en individus sans (Palacios-Palma *et al.*, 2018). En aquest mateix estudi les activitats dels enzims antioxidants a les cèl·lules sanguínies no es venen modificats. Els autors conclouen que la manca de resposta antioxidant podria derivar del fet que altes càrregues virals exigirien una alta producció d'espècies reactives que

superarien les defenses antioxidants i que deixarien de respondre. En el cas del fetge, la disminució de les defenses antioxidants podria ser un indicador d'una fallada de la funció hepàtica derivada de la infecció que impossibilita la síntesi adequada de proteïnes, entre elles els enzims antioxidants, i per tant ser responsable, juntament amb la immunosupressió que facilita una infecció bacteriana secundària, de la mortalitat del virus (Kerr i McFadden, 2002).

En conclusió, els presents resultats posen de manifest que els biomarcadors plasmàtics són mesurables i quantificables als conills i per tant poden ser útils per avaluar situacions que puguin alterar l'estat fisiològic dels animals. El fet que no s'hagin observat diferències entre mascles i femelles ni derivades del procés de captura, demostra que els conills capturats gaudien d'un bon estat de salut. De forma addicional, els conills afectats per mixomatosi presenten a nivell hepàtic una disminució general de les defenses antioxidants i un augment del dany oxidatiu, el que posa de manifest la gravetat de la patologia als animals malalts.

Finalment, les dades obtingudes indiquen que el mètode de captura amb ca eivissenc o fira és adequat des del punt de vista dels marcadors usats en no alterar de forma significativa els valors respecte al grup control.

Agraïments

El present projecte ha estat finançat per la Direcció Insular de Cooperació Local i Caça.

Consell Insular de Mallorca. S. Tejada, M. Monserrat i A. Sureda compten amb el suport de l'Institut de Salut Carlos III (CIBEROBN CB12/03/30038). Agrair als agents de Medi Ambient i guardes de camp del servei de caça, caçadors col·laboradors i Juana Barceló i Margalida Bernat el seu ajut i participació.

Referències citades

- Cipak Gasparovic, A., Zarkovic, N., Zarkovic, K., Semen, K., Kaminskyy, D., Yelisyeyeva, O. i Bottari, S. P. 2017. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br. J. Pharmacol.*, 174(12): 1771-1783.
- Delibes-Mateos, M., Ferreras, P. i Villafuerte, R. 2009. European rabbit population trends and associated factors: A review of the situation in the Iberian Peninsula. *Mammal Rev.*, 39(2): 124-140.
- Elias, S.J., Arner, E.S., Zhong, L. i Holmgren, A. 1999. Oxidants and antioxidants. *In*: Packer, L. (Ed.). *Methods in enzymatic analysis*. Academic Press, California, vol. 300. 226-239.
- Janssens, L., Stoks, R. 2014. Chronic predation risk reduces escape speed by increasing oxidative damage: a deadly cost of an adaptive antipredator response. *PLoS One*, 9(6): e101273.
- Kerr, P. i McFadden, G. 2002. Immune responses to myxoma virus. *Viral Immunol.*, 15(2): 229-246.
- Monclús, R., Palomares, F., Tablado, Z., Martínez-Fontúrbel, A. i Palme, R. 2009. Testing the threat-sensitive predator avoidance hypothesis: physiological responses and predator pressure in wild rabbits. *Oecologia*, 158(4): 615-623.
- Morosinotto, C., Rainio, M., Ruuskanen, S. i Korpimäki, E. 2018. Antioxidant enzyme activities vary with predation risk and environmental conditions in free-living passerine birds. *Physiol. Biochem. Zool.*, 91(3): 837-848.
- Pacios-Palma, I., Moreno S., Selman, C. i Rouco, C. 2018. Oxidative stress in wild European rabbits naturally infected with myxoma virus and rabbit haemorrhagic disease virus. *Eur. J. Wildlife Res.*, 64: 47.

- Pinya, S., Tejada, S., Capó, X. i Sureda, A. 2016. Invasive predator snake induces oxidative stress responses in insular amphibian species. *Sci. Total Environ.*, 566-567: 57-62.
- Quintana, J., Ramis, D. i Bover, P. 2016. Primera datació d'un mamífer no autòcton (*Oryctolagus cuniculus* [Linnaeus, 1758])(Mammalia: Lagomorpha) del jaciment holocènic del Pas d'en Revull (barranc d'Algendar, Ferreries). *Revista de Menorca*, 95: 185-200.
- Ramis, D. 2017. Evidències de contactes exteriors al món talaiòtic a partir de l'estudi de registre faunístic. In: Prados, F., Jiménez, H. i Martínez, J.J. (Coord.). Menorca entre fenicis i púnics. Cercle Artístic de Ciutadella, Publicacions des Born, 25. Universidad de Murcia. Centro de Estudios del próximo oriente y la antigüedad tardía. 201-217.
- Shugart, L.R., McCarthy, J.F. i Halbrook, R.S. 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Anal.*, 12: 353-360.
- Spiesschaert, B., McFadden, G., Hermans, K., Nauwynck, H., Van de Walle, G.R. 2011. The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion. *Vet Res.*, 42: 76.
- Sureda, A., Tejada, S., Capó, X., Melià, C., Ferriol, P., Pinya, S. i Mateu-Vicens, G. 2017. Oxidative stress response in the seagrass *Posidonia oceanica* and the seaweed *Dasycladus vermicularis* associated to the invasive tropical green seaweed *Halimeda incrassata*. *Sci. Total Environ.*, 601-602: 918-925.
- Sureda, A., Box, A., Tejada, S., Blanco, A., Caixach, J. i Deudero, S. 2011. Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). *Aquat. Toxicol.*, 101: 540-549.
- Villafuerte, R., Castro, F., Ramírez, E., Cotilla, I., Parra, F., Delibes-Mateos, M., Recuerda, P. i Rouco, C. 2017. Large-scale assessment of myxomatosis prevalence in European wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) 60 years after first outbreak in Spain. *Res. Vet. Sci.*, 114: 281-286.
- Villafuerte, R. 2007. *Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758. In: Palomo, L.J., Gisbert, J., Blanco, J.C. (Eds.). *Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España*. Dirección General para la Biodiversidad-Secem-SECEMU, Madrid. 487-489.