



Efecto de la presencia de hembras sobre la biología
reproductiva de machos de venado de campo
(*Ozotoceros bezoarticus*)

Matías Villagrán Boerr

Tesis de Maestría
Director de Tesis: Rodolfo Ungerfeld

PEDECIBA – Biología
Sub - área Ciencias Fisiológicas
2012

Integración del Tribunal de Tesis

María del Carmen Viera Paulino, Msc, PhD

Sección Entomología de la Facultad de Ciencias
Universidad de la República, Uruguay.

Alejandro Bielli Pallela; Msc, PhD

Departamento de Morfología y Desarrollo de la Facultad de Veterinaria
Universidad de la Republica, Uruguay.

José Delgadillo Sánchez; Msc, PhD

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.

Dedicatoria

“Ella no imponía nada. Sugería, aconsejaba, mostraba. En una de sus páginas nos invitó a aprender de los ciervos, que atraviesan los ríos anchos nadando en fila uno atrás del otro, con la cabeza y el cuello apoyado en el lomo del ciervo que los precede; unos a otros se sostienen y así pueden atravesar el río con mayor facilidad. Y son tan inteligentes y sagaces que cuando se dan cuenta de que el primero está cansado, lo hacen pasar al último puesto y otro toma la delantera.”

El río y los ciervos (Eduardo Galeano, Espejos)

A mis padres, hermanos y a Leti
por su constante apoyo, cariño, y cuidado

Agradecimientos

A mi tutor, Rodolfo Ungerfeld por sus invaluables enseñanzas de investigación, y por la confianza depositada en todos los trabajos realizados.

A quienes participaron del trabajo; por hacerlo siempre con cariño y enorme responsabilidad: Solana González, Florencia Beracochea, Fernando Fumagalli, Carmen Rossini, Adrian Sestelo, Cesar Savignone, Marcela Canabal, Danilo Fila, Juan Pablo Damián, Jorge Gil, Pedro Claudino, Leticia de la Fuente, Helen Viotti, Pedro Martino, Pilar Alvez, Rodrigo Puentes. Especialmente a Andrea Álvarez por su invaluable ayuda en el desarrollo de la técnica de medición hormonal.

A Tabaré González por la confianza en éste y todos los trabajos realizados en la ECFA. A Marita Araújo, Directora de Higiene y Medio Ambiente de la Intendencia Municipal de Maldonado, por el respaldo y por creer en el proyecto siempre. A Johnny Brioso, Ricardo Sorelo, y Edgardo Barrios, personal de la ECFA, por la ayuda en la manipulación de los venados.

A la CSIC y la Intendencia Municipal de Maldonado por financiar el proyecto “Biología reproductiva del venado de campo”, dentro del que se realizó el trabajo que generó esta tesis.

A Ana Meikle, Paula Pessina, Gretel Ruprecht e Isabel Sartore, integrantes del Laboratorio de Técnicas Nucleares de la Facultad de Veterinaria, por su gran ayuda y por permitirme hacer uso libremente del laboratorio.

A Álvaro Díaz, de la Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene, por permitirme hacer uso del equipamiento de su laboratorio.

A Sebastián Brambillasca, Alejandro Britos, Analía Pérez y Cecilia Cajarville del Departamento de Nutrición Animal de Facultad de Veterinaria, por permitirme utilizar el equipamiento de su laboratorio.

A Solana González y Lorena Lacuesta, por ser grandes amigas y por compartir muchísimos momentos juntos.

A todos los estudiantes del laboratorio de Fisiología, y muy especialmente a Florencia Beracochea, Julia Giriboni, Fernando Fumagalli, Marcelo Gatti y Carolina Fiol, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A mis padres, Arlette y Carlos, y mis hermanos, Lucia, Nacho y Alicia por enseñarme a proteger lo que uno ama.

A Leti por ser mi compañera, mi guía, mi amor.

A José, Cristina, Nybia, Amadeo, Mauricio, Jimena, Gustavo y Facundo, por dejarme ser parte de su familia.

A mis amigos “Kachimberos”, y muy especialmente a mis hermanos, Pela, Sinta, Juan y Santo, porque juntos hemos crecido, sabiendo que seguiremos así siempre.

A todos muchas gracias!

Publicaciones

Artículo científico (Publicación I):

Ungerfeld R, Damián JP, Villagrán M, González-Pesado SX (2009) Female effect on antlers of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Canadian Journal of Zoology 87: 734-739.

Resumen en Congreso:

Villagrán M, Beracochea F, Sestelo A, González-Pensado S, Ungerfeld R (2010) Female effect on pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): semen differences between males in permanent contact or isolated from females. 7th International Deer Biology Congress. Huilo-Huilo, Chile.

Índice de contenidos

Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
Publicaciones.....	6
Lista de abreviaturas.....	9
Lista de figuras.....	10
Lista de tablas.....	11
Resumen.....	12
Summary.....	14
1. Introducción	16
Regulación de la reproducción.....	16
1.1 Regulación hormonal de la reproducción de machos.....	16
1.2 Factores externos que afectan la reproducción.....	19
1.2.1 Estacionalidad reproductiva.....	19
1.2.2 Efecto hembra.....	21
1.3 Venado de campo.....	25
1.3.1 Descripción de la especie.....	25
1.3.2 Estacionalidad reproductiva.....	25
1.3.3 Distribución histórica y estado de conservación.....	26
1.3.4 Poblaciones actuales.....	27
1.4 Estrategias para el estudio de especies silvestres.....	29
2. Hipótesis	31
3. Objetivo general	32
4. Estrategia de investigación	33
5. Materiales & métodos generales	35
6. Estudio I. Efecto de la presencia de hembras sobre las características de las astas de machos de venado de campo	37
6.1 Introducción.....	37
6.2 Objetivo.....	38
6.3 Materiales & métodos.....	39
6.4 Resultados.....	41

6.5 Discusión.....	45
6.6 Conclusiones.....	47
7. Estudio II. Desarrollo de una técnica de extracción de testosterona en materia fecal de machos de venado de campo.....	48
7.1 Introducción.....	48
7.2 Objetivo.....	50
7.3 Materiales & métodos.....	51
7.4 Resultados & discusión.....	53
7.5 Conclusión.....	55
8. Estudio III. Efecto de la presencia de hembras sobre las características morfológicas y seminales, y la producción de testosterona de machos de venado de campo.....	56
8.1 Introducción.....	56
8.2 Objetivos.....	61
8.3 Materiales & métodos.....	62
8.4 Resultados.....	67
8.5 Discusión.....	73
8.6 Conclusiones.....	78
9. Discusión general.....	79
10. Conclusiones generales.....	81
11. Bibliografía.....	82
12. Anexo.....	104

Lista de abreviaturas

BSA: Albumina Sérica Bovina

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotrofinas

CIE: Commission Internationale de l'Eclairage

FSH: Hormona Folículo Estimulante

LH: Hormona Luteinizante

ECFA: Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

EIA: Ensayo Inmunoenzimático

RIA: Radioinmunoensayo

PBS: Fosfato Salino Bufferado

HOS: Solución Hiposmótica

FTG: Fructosa-Tris-Glicina

ER: Estación Reproductiva

Lista de figuras

Figura 1. Fotografías de un macho y una hembra de venado de campo pertenecientes a la población de la ECFA.....	25
Figura 2. Distribución de las poblaciones silvestres de venado de campo en Sudamérica y Uruguay, y la población en semicautiverio de la ECFA.....	28
Figura 3. Esquema de los encierros de venado de campo de la ECFA, en los que se encontraban alojados los grupos de cría y el grupo de machos sin contacto directo con hembras.....	35
Figura 4. Astatas derechas de 8 machos de venado de campo que permanecieron alojados con hembras o aislados de ellas.....	43
Figura 5. Concentración de testosterona de machos de venado de campo obtenida de la primera fracción y del total de una doble extracción de esteroides en materia fecal.	54
Figura 6. Ecografía de un testículo de macho de venado de campo a partir de la que se determinó la intensidad de píxeles.....	64
Figura 7. Concentración de testosterona en materia fecal, colectada semanalmente (1 de octubre-4 de febrero y 17 de abril-14 de mayo) a partir de machos de venado de campo en semicautiverio, alojados con o sin hembras.....	67

Lista de tablas

Tabla 1. Circunferencia y largo (cm) de las astas de los machos de venado de campo que estuvieron en contacto permanente con hembras o aislados físicamente de ellas.....	42
Tabla 2. Medidas de los parámetros de color en las astas de los machos de venado de campo que estuvieron en contacto permanente con hembras o aislados físicamente de ellas.....	44
Tabla 3. Medidas de los parámetros de color en la zona dorsal, lateral y ventral del cuerpo de machos de venado de campo que estuvieron en contacto permanente con hembras o aislados físicamente de ellas.....	69
Tabla 4. Características seminales de machos de venado de campo que se encontraban alojados con o sin contacto físico con hembras, luego de utilizar los diluyentes Fructosa-Tris-Glicina con 20 % de yema de huevo y AndroMed.....	72

Resumen

Los objetivos de la presente Tesis fueron determinar el efecto de la presencia de hembras sobre la producción de testosterona, las características morfométricas, el color del pelaje de las astas, la estructura testicular, las características seminales, y el momento de eyaculación durante la electroeyaculación de machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Para ello se realizó un primer estudio (Estudio I) para determinar el efecto de la presencia de hembras sobre el volumen, peso, medidas, coloración, y número de perlas de las astas, así como su fecha de caída. Las astas de los machos en contacto con hembras fueron más pesadas, de mayor volumen, con mayor circunferencia de la base de la primer y segunda punta, y una tendencia a ello en la tercera punta. El largo desde la base a la primera bifurcación y el largo de la primera punta tendieron a ser mayores en los machos alojados con hembras. La fecha de caída de la primer asta tendió a ser más tardía en este grupo de machos. Además, en general las astas de los machos alojados con hembras fueron más oscuras. El objetivo del Estudio II fue comparar una técnica de extracción de testosterona en materia fecal de venado de campo utilizando una técnica de referencia y una con doble extracción, para así poder comparar luego las concentraciones en machos con o sin contacto con hembras. Mediante la técnica de doble extracción fue posible recuperar un 55,3 % más de testosterona que con la técnica de referencia. Por otra parte, la primera fracción de extracción permitió predecir con alta probabilidad el valor final obtenido con ambas extracciones. Finalmente, en el Estudio III, el objetivo fue establecer si el contacto con hembras determina: a) mayor concentración fecal de testosterona, b) mayor peso y perímetro de cuello, c) un aumento en la coloración del pelaje, d) aumento del tamaño testicular, y de la proporción de parénquima testicular, e) una mayor sensibilidad a la electroeyaculación, y f) mejores características del semen, tanto fresco como luego de ser expuesto a diluyentes. El contacto con hembras determinó un aumento en la concentración fecal de testosterona. El testículo derecho de machos alojados con hembras presentó mayor intensidad de pixeles en uno de los puntos y una tendencia a ello en otros dos puntos. En noviembre, los machos alojados con hembras presentaron mejor calidad seminal, y mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Además, el porcentaje de espermatozoides móviles tendió a ser mayor en los machos alojados con hembras. El semen de machos alojados con hembras, luego de ser expuesto al diluyente Fructosa-Tris-Glicina con 20 % de yema de huevo, presentó mayor calidad, porcentaje de espermatozoides móviles, porcentaje de espermatozoides móviles

progresivos, y porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal. Además, los machos alojados solos presentaron mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado y tendieron a presentar mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido. Durante abril, no existieron diferencias entre el semen de ambos grupos. Luego de agregar el diluyente Andromed, el semen de machos que estaban alojados con hembras presentó mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado. Por otra parte, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal tendió a ser mayor en el semen de machos alojados sin hembras. Los machos alojados con hembras presentaron más intensidad de los colores blanco y amarillo en la zona de la cabeza entre las astas, y más amarillo en la zona dorsal del límite tórax-abdomen. Los machos aislados de hembras presentaron la zona dorsal del límite tórax-abdomen, y de la grupa más roja. En estos últimos machos, la zona lateral del límite tórax-abdomen tendió a ser más roja y la zona ventral del pecho más blanco y roja. No existieron diferencias en el momento de eyaculación ni en ninguna de las variables morfológicas consideradas. En síntesis, se concluyó que el contacto directo con hembras estimuló que machos de venado de campo desarrollaran astas más pesadas, de mayor tamaño, más oscuras, y posiblemente retrasó su fecha de caída, estimuló una mayor producción de testosterona, mayor proporción de parénquima testicular, mejoró la calidad seminal, y produjo un pelaje más amarillento. Además, se comprobó que mediante una técnica de doble extracción de hormonas en materia fecal es posible extraer una cantidad mayor a la obtenida mediante una única extracción. Sin embargo dicha extracción única permitió predecir con alta probabilidad la concentración final de la doble extracción.

Summary

The aims of the present thesis were to determine the effects of female presence on testosterone concentration, body size parameters, antler characteristics, coat color, testicular structure, semen characteristics, and ejaculation moment during electroejaculation of pampas deer males (*Ozotoceros bezoarticus*). The first study (Study I) aimed to determine the effect of female presence on volume, weight, color, number of pearls, and casting date of male antlers. Antlers from males in contact with females were heavier, with greater volume, base circumference of the first and second tines, and a tendency in the third tine. First tine length, and distance from the base to first bifurcation tended to be greater in males allocated with females. Also, first antler cast tended to occur later in males from this group. Antler color from males in contact with female was darker in most points. The aim of Study II was to compare two fecal testosterone extraction techniques, using a reference technique and another one with double extraction, in order to compare concentration from males isolated or in contact with females. The double extraction technique allowed to recover 55.3 % more testosterone than using reference technique. However, single extraction led to predict with high probability values obtained with both extractions. Finally, the purpose of Study III was to establish if contact with females determines: a) an increase on fecal testosterone concentration, b) greater weight and neck perimeter, c) darkness coat color, d) a greater testicular size and testicular parenchyma proportion, e) higher sensibility to electroejaculation, f) and better seminal characteristics, both in fresh semen and after exposing semen to diluents. Contact with females determined greater fecal testosterone concentrations. Pixel intensity of the right testicle was greater in males allocated with females, tended to that in other two points -. In November, males with females presented greater seminal quality, and progressive motile spermatozoa percentage. Also, motile spermatozoa percentage tended to be greater in males located with females. Semen from such males presented greater quality, and percentages of motile spermatozoa, progressive motile spermatozoa, and with normal acrosome after the dilution with Fructose-Tris-Glycine with 20 % egg-yolk. Also, males isolated from females, presented a higher percentage of spermatozoa with damaged acrosome, and tended to present a higher percentage with missing acrosome. During April, characteristics of fresh semen did not differ between groups. After the addition of the diluent Andromed, semen from males in contact with females presented a higher percentage of spermatozoa with damaged acrosome. Percentage of spermatozoa with normal

acrosome tended to be greater in males isolated from females. Coat color from the head (between antlers) of males located with females was more white and yellow, and the dorsal zone of thorax-abdomen limit was more yellow in those males. The dorsal zone of the thorax-abdomen limit, and of the rump of males isolated from females was more red. In these males, the lateral zone of thorax-abdomen limit tended to be more red, and the ventral zone of the chest more white and red. Neither the ejaculation moment nor the morphometric characteristics differed between groups. In synthesis, it was concluded that direct contact with females stimulated that pampas deer males developed heavier, bigger and darker antlers, and may have delayed their casting date, stimulated testosterone production, an increase in testicular parenchyma proportion, seminal quality, and the development of a yellower coat. Also, it was found that using a double extraction of fecal testosterone it was possible to recover a greater quantity of hormone than using a simple extraction. However, the simple extraction led to predict with high probability the final concentration obtained with the double extraction.

1. Introducción

Regulación de la reproducción

La reproducción es consecuencia de la interacción entre factores internos y externos al individuo. El control de la misma ocurre a través de mecanismos de retroalimentación entre hormonas, el sistema nervioso central, y las gónadas. En este sentido, diversos factores ambientales son interpretados por el sistema nervioso central, repercutiendo sobre la respuesta endócrina y por lo tanto sobre la reproducción.

1.1 Regulación hormonal de la reproducción de machos

La reproducción tanto de machos como de hembras es regulada a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Neuronas neurosecretoras del hipotálamo son responsables de la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH), la que es transportada hacia la hipófisis por el sistema porta hipotálamo-hipofisario. Como respuesta a la GnRH la adenohipófisis secreta la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH), gonadotrofinas que estimulan la gametogénesis y la secreción de esteroides por las gónadas. A su vez, estos esteroides intervienen a través de una retroalimentación negativa en la regulación del funcionamiento del hipotálamo y la hipófisis (Couse & Korach, 1999). Además de la FSH y la LH, otras hormonas intervienen en el control de la gametogénesis. En el macho, los estrógenos secretados por el testículo son necesarios para la espermatogénesis (O'Donnell et al., 2001), los que además inhiben la acción de la hipófisis y el hipotálamo mediante retroalimentación negativa (Couse & Korach, 1999). Por su parte, la prolactina estimula la capacidad de las células de Leydig para responder a la LH, mediante el aumento de la síntesis de receptores de LH presentes en esta célula (Sharpe et al., 1992). La hormona tiroidea modula la proliferación de células de Sertoli (Cooke & Meisami, 1991; Cooke et al., 1991; Simorangkir et al., 1997).

En los machos el testículo es el órgano responsable de la producción de gametos y de testosterona. La espermatogénesis comienza a partir de espermatogonias ubicadas en la pared de los túbulos seminíferos, las que luego de una serie de cambios finalizan como espermatozoides liberados en la luz de los túbulos. Sintéticamente este proceso puede ser dividido en una etapa de proliferación de las espermatogonias mediante mitosis, una división

meiótica y una diferenciación celular o espermiogénesis (Hochereau-de Reviers et al., 1990). Durante la etapa de proliferación ocurren repetidas divisiones mitóticas de las espermatogonias, y un aumento en la cantidad de heterocromatina que poseen, según lo que se las clasifica en A y B. Durante la etapa de meiosis ocurren dos divisiones celulares, dando lugar a cuatro células haploides denominadas espermátidas redondas. La espermiogénesis continúa a la fase de meiosis, y en ésta las espermátidas redondas sufren cambios estructurales y funcionales importantes, convirtiéndose así en espermatozoides. La regulación de la espermatogénesis es realizada por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, y es afectada por factores ambientales. Las neuronas hipotalámicas producen GnRH, la que controla la actividad secretora de LH y FSH por parte de la adenohipófisis. Como respuesta a la secreción de LH, las células intersticiales del testículo o de Leydig, secretan testosterona. Esta hormona, junto con otros andrógenos, es responsable del inicio, mantenimiento y restablecimiento de la espermatogénesis (O'Donnell et al., 2006). La FSH y la testosterona tienen como principal destino en el testículo a la célula de Sertoli. Esta célula es la responsable de los intercambios metabólicos con las células germinales, brindándoles un ambiente adecuado para la supervivencia de las espermatogonias (Meachem et al., 2001). La testosterona actúa sobre la célula de Sertoli a través de receptores para andrógenos presentes en ésta (Walker, 2003). Estos autores describen que la concentración de testosterona requerida para iniciar la espermatogénesis es mayor que para el mantenimiento de este proceso. Durante el inicio de la espermatogénesis, la testosterona es necesaria para que ocurra un proceso cualitativamente correcto, y para que ocurra la diferenciación de las células de Sertoli (Buzzard et al., 2003; Haywood et al., 2003). Es así que, el desarrollo de la meiosis al comienzo de la espermatogénesis es altamente sensible a la concentración de testosterona (Singh et al., 1995; Handelsman et al., 1999). Además, durante ese momento actuaría en conjunto con la FSH como factor de "supervivencia" celular de la línea germinal (Russell et al., 1987; Tapanainen et al., 1993). Por otra parte, en el adulto se sugiere que este andrógeno por sí solo podría ser capaz, al menos cualitativamente, de mantener y reiniciar la espermatogénesis (O'Donnell et al., 2006). En este sentido, altas concentraciones de testosterona son necesarias para una adecuada espermatogénesis, siendo principalmente importante durante la meiosis (de Kretser et al., 1998). Además, pequeños cambios en la concentración de testosterona producen grandes cambios en la producción espermática (Sun et al., 1990). Sin embargo, se sugiere que concentraciones extremadamente altas de testosterona podrían ser perjudiciales para el desarrollo de las espermatogonias (Meistrich & Kangasniemi, 1997). Por otra parte, la testosterona estimula la expresión de genes y la

secreción de proteínas presentes en el fluido de los túbulos seminíferos (O'Leary et al., 1986; Sharpe et al., 1992).

Por otra parte, en animales juveniles la FSH estimula la supervivencia y proliferación de las células germinales (Haneji et al., 1984; Boitani et al., 1993) y determina el número de células de Sertoli (O'Donnell et al., 2006). Al inicio de la pubertad, y debido a la acción de la FSH, la célula de Sertoli pasa de un estado inmaduro y proliferativo a uno maduro y no proliferativo (O'Donnell et al., 2006). Según Baker et al. (2003), la FSH es requerida para que la espermatogénesis sea cuantitativamente normal en el adulto, ya que permite mantener el tamaño testicular, el diámetro de los túbulos seminíferos, y el número y la calidad espermática normal (O'Donnell et al., 2006). Además la FSH se vincula con el mantenimiento del número de células de Leydig (de Kretser et al., 1998) y por tanto de las concentraciones intratesticulares de testosterona (Baker et al., 2003). Esta hormona juega un papel fundamental en la regulación del desarrollo y en la supervivencia de las espermatogonias (McLachlan et al., 1995; El Shennawy et al., 1998; Meachem et al., 1998). La FSH es fundamental para que se complete correctamente la espermiogénesis. Participaría en el mantenimiento de la maduración de las espermátidas redondas, efecto particularmente importante cuando la concentración de testosterona es baja (Vihko et al., 1991; McLachlan et al., 1995). Se sugiere además que la FSH actuaría en forma sinérgica con la testosterona en el proceso de espermiación (Saito et al., 2000), y que regularía la respuesta a andrógenos de la célula de Sertoli a través de promover la expresión de genes específicos (O'Donnell et al., 2006).

Además de su acción sobre la espermatogénesis, la testosterona es esencial para la manifestación del comportamiento sexual, y agonístico entre machos, y de numerosos cambios ocurridos en las características físicas de los mismos. Por ejemplo, en ciervos el aumento en la concentración de testosterona se acompaña de un aumento en la gravedad de las vocalizaciones, crecimiento y oscurecimiento del pelaje, aumento del peso corporal y del perímetro del cuello (Bubenik, 1991; Lincoln, 1992; Mystkowski & Schwartz, 2000). De igual forma, las dimensiones de las astas, la relación de tejido óseo compacto/esponjoso, la convexidad de la corona y el número de perlas –exostosis de 2-10 mm de longitud; Bubenik, 1992- presentes en ellas se relaciona con la concentración de testosterona (Bubenik et al., 1975; Bubenik, 1990; Malo et al., 2009).

1.2 Factores externos que afectan la reproducción

El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal participa del control de la reproducción, siendo además influido por factores ambientales como la cantidad de horas de luz, la disponibilidad de alimento, la temperatura, y la incidencia de precipitaciones. A partir de la interpretación de las señales ambientales, el sistema nervioso central modifica las respuestas hormonales vinculadas a la reproducción. De esta forma, las especies adecúan su reproducción a factores ambientales favorables para ello.

1.2.1 Estacionalidad reproductiva

La reproducción de algunas especies ocurre sólo durante parte del año, por lo que son denominadas reproductoras estacionales (Lincoln & Short, 1980). Para ello las hembras de estas especies presentan actividad ovárica durante un período del año, conociéndose el período de inactividad ovárica como anestro estacional. Por su parte, para que al momento en que ocurran las cópulas en la estación reproductiva los machos se encuentren en su máximo potencial reproductivo, estos deben adelantar el inicio de la reproducción de acuerdo a la duración de la espermatogénesis (Bronson, 1989). Aunque el tiempo exacto varía según la especie, en forma genérica la espermatogénesis dura alrededor de 50 días (Swierstra & Foote, 1965). La estacionalidad reproductiva es una consecuencia evolutiva de las especies para que los partos ocurran en el momento más propicio para la supervivencia de sus crías, lo que en climas templados ocurre generalmente en primavera (Bronson, 1989).

En la mayor parte de los mamíferos el fotoperiodo es la señal ambiental más importante en la determinación de la estación reproductiva (Goldman, 2001). La variación de horas de luz es utilizada por los mamíferos para conocer el momento del año en que se encuentran. Esta información es interpretada a partir de la duración y del momento de secreción de melatonina por parte de la glándula pineal, la que ocurre durante las horas de oscuridad (Malpaux, 2006). La luz es captada por la retina, la señal nerviosa resultante transmitida a través del nervio óptico hasta el hipotálamo, y desde allí a la glándula pineal. La melatonina actúa sobre múltiples sitios, influyendo sobre la reproducción, termorregulación, y generando cambios en el largo y color del pelaje (Lincoln et al., 2003). La variación en el tiempo de secreción de melatonina regula la secreción de GnRH, aunque se sugiere que no actuaría directamente sobre las neuronas productoras de GnRH (Malpaux et al., 2001). Según

Goodman (1994), los cambios en la secreción de GnRH de ovinos se deben a dos mecanismos complementarios: una regulación de la GnRH independiente de la esteroidea, y cambios en la retroalimentación negativa de la secreción de GnRH. El aumento en la frecuencia de pulsos de GnRH provoca un aumento en la frecuencia de pulsos de LH y en consecuencia un aumento de la concentración de esteroides gonadales (ver revisión: Lincoln & Short, 1980; Malpoux, 2006).

La estación reproductiva de muchas especies de rumiantes domésticos ocurre en otoño, momento en el que los machos comienzan a aumentar la frecuencia de pulsos de LH, y las concentraciones de FSH y testosterona (Lincoln & Short, 1980). Junto con estos cambios hormonales, ocurre una mayor producción de espermatozoides, un aumento de las características sexuales secundarias (peso, tamaño testicular, y de los cuernos ó astas), y en la frecuencia de manifestación de comportamientos agonistas y de cortejo. En ovinos, el aumento en el tamaño y diámetro testicular se relacionó positivamente con un aumento en las concentraciones de melatonina, testosterona, y prolactina (Lincoln & Short, 1980). Además, el crecimiento de los cuernos de machos de muflón (*Ovis orientalis*) e íbex (*Capra pyrenaica*) se asocia negativamente con la concentración de testosterona (Toledano-Díaz et al., 2007). En estas especies el crecimiento ocurre cuando las concentraciones son bajas y previo a la estación reproductiva la tasa de crecimiento de los cuernos disminuye (Lincoln, 1984; Toledano-Díaz et al., 2007). Por otra parte, el patrón reproductivo estacional de los ciervos varía notablemente según la especie y la ubicación geográfica, existiendo desde especies de ciervos no estacionales, hasta otros con una estacionalidad muy marcada (Bronson, 1989). En especies de ciervos estacionales se produce un aumento del peso corporal, tamaño testicular, y del perímetro del cuello de los machos asociado a la estación reproductiva (Lincoln et al., 1972; Clutton-Brock et al., 1982). También se ha descrito que previo a la estación reproductiva y asociado al aumento de la concentración de testosterona ocurre un aumento del número de espermatozoides en el eyaculado (Haigh et al., 1984). Según los autores se alcanza simultáneamente en ese momento el máximo porcentaje de espermatozoides con morfología normal. Además, se describen cambios estacionales en el diámetro de los túbulos seminíferos y del epidídimo, número de espermatogonias en los túbulos seminíferos, y en el tamaño, peso y actividad de las glándulas sexuales secundarias (Lincoln, 1971; Reyes et al., 1997). Se ha reportado también un oscurecimiento en el color del pelaje (Bubenik & Bubenik, 1985), y mayor tamaño y actividad de las glándulas apócrinas y sebáceas del cuerpo (Ebling, 1972) vinculados a la estación reproductiva. Todos

estos cambios han sido vinculados con la concentración de testosterona en cérvidos de diferentes especies (Ebling, 1972; Gaspar López et al., 2010). Las astas de cérvidos son estructuras que presentan un marcado patrón estacional de crecimiento, el que se vincula a las concentraciones séricas de testosterona (Bubenik, 2006). Según este autor el crecimiento de las astas comienza con concentraciones de testosterona aún bajas, la mineralización y el fin del crecimiento cuando éstas ya han alcanzado concentraciones altas, y la caída 2 a 4 semanas después de la disminución anual de la concentración de testosterona. El crecimiento de las astas se vincula también con los cambios estacionales en las concentraciones de melatonina y prolactina (Bubenik, 2006).

El momento de inicio y la duración de la estación reproductiva pueden ser modificados por la presencia de individuos del otro sexo. Por ejemplo, se ha observado que las ovejas alojadas en contacto directo con un carnero, o en un corral contiguo a éste, comenzaron a ciclar antes que las ovejas que permanecieron aisladas de machos (Eldon, 1993; O'Callaghan et al., 1994). La duración de la estación reproductiva fue mayor en las ovejas en contacto con machos, aunque la fecha de finalización de la misma no fue diferente entre ovejas que permanecieron en presencia o no de machos (Eldon, 1993; O'Callaghan et al., 1994). Sumado a esto, O'Callaghan et al. (1994) reportaron que la siguiente estación reproductiva se adelantó en las ovejas que fueron expuestas a carneros, resultando en una menor duración del anestro estacional. Aunque no hay trabajos que lo estudiaran, en forma similar, tanto el inicio como la duración de la estación reproductiva de machos de rumiantes podría ser influida por la presencia de hembras.

1.2.2 Efecto hembra

Como se explicó anteriormente, dentro de los factores externos que afectan la reproducción se encuentran los estímulos sociales generados por la presencia de otros individuos, como la jerarquía y la estimulación socio-sexual. En rumiantes domésticos el efecto estimulante de la presencia de machos sobre la reproducción de hembras ha sido ampliamente estudiado (ver revisiones: Ungerfeld, 2006; 2007; Delgadillo et al., 2009). Por otra parte, también existen estudios sobre la respuesta de machos de diferentes especies al ser expuestos a hembras. La concentración de LH y testosterona de los machos aumenta como resultado de la presencia de hembras en hámster (Macrides et al., 1974), cerdo (Liptrap & Raeside, 1978), toro (Katongole et al., 1971), rinoceronte (Christensen et al., 2009), búfalo

(Malfatti et al., 2006), carnero (González et al., 1988a, b), y chivo (Walkden- Brown et al., 1994).

El ovino es la especie de rumiantes en que este fenómeno ha sido más ampliamente estudiado. Luego de ser expuestos a hembras en celo, los carneros presentan un aumento agudo en la frecuencia de pulsos, concentración basal y concentración media de LH, y en la concentración sérica de testosterona (Illius et al., 1976; González et al., 1988a; b). Asimismo, las concentraciones de LH y testosterona se mantienen altas mientras las hembras permanezcan en celo (Ungerfeld & Silva, 2004). Además de la respuesta endócrina, se observan cambios comportamentales en los machos expuestos a hembras. Price et al. (1991) sugirieron que el desempeño sexual de carneros mejora si estos son expuestos a hembras en celo antes de su uso como reproductores. Por otra parte, machos caprinos estimulados por hembras en celo previamente a ser usados como reproductores, despliegan mayor intensidad de comportamiento de cortejo, y logran un mayor porcentaje de hembras en celo, y de preñez (Carrillo et al., 2011).

Existen reportes sobre el efecto de la presencia crónica de hembras en la reproducción de los machos, aunque la información es más escasa que sobre su efecto agudo. Corderos criados en contacto con hembras, presentan mayor volumen testicular y despliegan un comportamiento sexual más intenso que aquellos criados en ausencia de hembras (Illius et al., 1976; Katz et al., 1988; Kridli & Said, 1999). Contrariamente, corderos de 10 meses de edad, criados solos desde el destete a los 70 días hasta la pubertad, presentaron mayor peso corporal, circunferencia escrotal, y desarrollaron más olfateos anogenitales frente a una oveja en celo que corderos criados con hembras (Kridli & Al-Yacoub, 2006). Por otra parte, durante la estación reproductiva, los machos adultos que permanecen con hembras poseen testículos más grandes, mayores concentraciones de testosterona, y despliegan mayor comportamiento sexual y agresividad que aquellos alojados solo entre machos (Illius et al., 1976). En ovinos salvajes de *Ovis canadensis* también se reportó que machos formando grupos con hembras presentan mayores concentraciones de testosterona en fecas que aquellos en grupos compuestos únicamente por machos (Pelletier et al., 2003).

Sumado a los efectos de la presencia directa de hembras sobre la reproducción de machos ya mencionados, se han documentado efectos de la presencia indirecta de las mismas. En este sentido, corderos de cinco meses de edad, expuestos a caretas conteniendo mucus

vaginal de ovejas en celo presentaron mayor concentración de testosterona que aquellos expuestos a orina o agua destilada (Vázquez & Orihuela, 2001). Además, carneros a los que se les colocaron caretas con lana, orina o secreción vaginal de ovejas en celo aumentaron su concentración sérica de LH (González et al., 1991a). También, carneros estimulados con mucus vaginal de ovejas en celo previo a la obtención de semen mediante un maniquí y vagina artificial, eyacularon un volumen de semen mayor (Aguirre et al., 2011).

La respuesta a este tipo de estímulos en la reproducción de los machos varía según la experiencia previa de los mismos. Al exponer carneros a ovejas en celo, aquellos previamente expuestos a estas, presentaron un aumento en la concentración sérica de testosterona, mientras que aquellos sin contacto previo no lo hicieron (González et al., 1991b). Sin embargo, otros trabajos reportan que machos experientes e inexperientes aumentan en forma similar su concentración de testosterona al ser expuestos a hembras (Rosa et al., 2000; Ungerfeld & Silva, 2004). Además, carneros sin experiencia con ovejas en celo respondieron a la exposición a ovejas que no estaban en celo aumentando la frecuencia de pulsos de LH, mientras que carneros experientes no lo hicieron (González et al., 1991b).

El desempeño reproductivo de los machos también influye sobre la respuesta a la exposición a hembras en celo. La concentración de testosterona de carneros con alto desempeño reproductivo aumentó luego de ser expuestos a hembras en celo durante 15 minutos, y la frecuencia de pulsos y la concentración de LH aumentaron luego de 11 horas de exposición (Perkins et al., 1992). Sin embargo, machos con bajo desempeño reproductivo no manifestaron cambio alguno (Perkins et al., 1992). La respuesta de machos expuestos a hembras varía también según su estatus nutricional, siendo mayor el aumento de la concentración de LH y testosterona en chivos con alto estado nutricional (Walkden-Brown et al., 1994).

Por otra parte, el tipo de estímulo que reciben los machos a partir de la hembra influye notablemente sobre su respuesta. Es así que, al menos fuera de la estación reproductiva, la frecuencia de pulsos y concentración de LH, y la concentración de testosterona no aumentó al separar a los carneros de ovejas en celo por tan sólo 30 cm (González et al., 1988b). Estos hallazgos sugieren que al menos en los ovinos, el contacto físico constituye una señal de gran importancia en el efecto hembra. Además, González et al. (1991a) reportaron que carneros anósmicos (con el epitelio olfativo lesionado) expuestos a hembras en celo aumentaron la

frecuencia de pulsos de LH y la concentración de testosterona de igual forma que carneros intactos. Por tanto, el olfato no jugaría un papel crítico en la estimulación de ovejas a carneros, y/o la estimulación a través de otras vías es suficiente para desencadenar la misma respuesta.

En la orina de búfalas se identificaron compuestos volátiles relacionados con la realización de flehmen, y con la erección del pene y el despliegue del comportamiento de monta por los machos (Rajanarayanan & Archunan, 2011). En el caso de carneros, estos son capaces de discriminar entre la orina de ovejas en celo de la que proviene de ovejas no en celo, lo que se vincularía con la capacidad de discriminar cualitativa o cuantitativamente sustancias químicas vinculados al celo presentes en la orina (Blissitt et al., 1990; 1994). Además, se determinó que el estímulo visual de observar a un macho montando a una hembra podría ser suficiente para generar una respuesta reproductiva endócrina en un carnero (Yarney & Sanford, 1983).

La información existente en ciervos sobre los estímulos sociales es escasa y se relaciona mayormente al efecto de la presencia de machos sobre las hembras (Verme et al., 1987; Komers et al., 1999; Whittle et al., 2000; Adams et al., 2001). Se sugirió que las feromonas producidas por hembras prolongan el tiempo durante el que se secreta una mayor cantidad de testosterona, influyendo entonces en la duración del ciclo de astas (Bubenik & Bubenik, 1986). Recientemente se reportó que machos adultos de venado de campo alojados con hembras presentan mayor proporción de tejido óseo compacto en algunas zonas de las astas y poseen una mayor convexidad de la corona de las mismas que machos alojados sin contacto con hembras (Canabal & Ungerfeld, 2011). Ambas características se vinculan con la concentración de testosterona presente durante el crecimiento de las astas (Bubenik, 1990). Por lo tanto las diferencias reportadas por Canabal & Ungerfeld (2011) podrían vincularse con mayores concentraciones de testosterona debidas a la estimulación de los machos por la presencia de hembras. Además, observaciones casuales realizadas en la ECFA podrían sugerir que los machos alojados con hembras poseen astas más oscuras que los machos alojados sin contacto con hembras.

1.3 Venado de campo

1.3.1 Descripción de la especie

El venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus, 1758) es un mamífero autóctono perteneciente a la familia *Cervidae*, que posee un tamaño medio, y variaciones de coloración que van desde el marrón rojizo al bayo claro según su distribución geográfica (González et al., 2010). La zona ventral del abdomen, tórax, cuello, y la región que rodea los ojos y la boca son de color blanco. Los machos tienen un peso mayor al de las hembras (Jackson, 1987). En poblaciones silvestres los machos presentan una longitud (desde la punta de la nariz a la base de la cola) de 130 cm, una altura a la cruz de 75 cm y un peso de 35 kg (Jackson, 1987). Sin embargo, machos en condiciones de semicautiverio poseen un tamaño menor: 90-100 cm de largo, una altura a la cruz de 65-70 cm y un peso de 30-35 kg (Ungerfeld et al., 2011). A diferencia de las hembras, los machos adultos presentan astas, las que poseen tres puntas, 25 cm de altura y un peso aproximado de 140 g (Ungerfeld et al., 2008a) (Figura 1).



Figura 1. Las fotografías muestran individuos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) pertenecientes a la población de la ECFA: a la izquierda una hembra amamantando a su cría y a la derecha un macho con sus astas sin felpa.

1.3.2 Estacionalidad reproductiva

El venado de campo presenta una moderada estacionalidad reproductiva, adaptando la misma a las condiciones ambientales en que se encuentra. En este sentido, las hembras pertenecientes a poblaciones ubicadas en zonas subtropicales (Uruguay) presentan partos

durante todo el año, con un pico en primavera (Jackson et al., 1980; González, 1997; Ungerfeld et al., 2008b), mientras que poblaciones que habitan zonas tropicales de Brasil limitan sus pariciones al período lluvioso (Tomás, 1988). En Uruguay, en condiciones de semicautiverio, se determinó que la mayor frecuencia de actividad de cortejo ocurre en marzo-abril (Morales-Piñeyría, 2010). En esta misma población, la estacionalidad reproductiva de los machos fue recientemente estudiada por González-Pensado (2011), quien reportó que los machos presentan el mayor desarrollo de las características reproductivas - concentraciones séricas de testosterona, volumen testicular y características seminales- y la mayor frecuencia de comportamientos agonísticos entre los machos durante verano-otoño.

El ciclo de las astas de ciervos se relaciona directamente con el ciclo reproductivo de los machos, fundamentalmente con los cambios en la concentración sérica de testosterona ocurridos durante el año (Bubenik, 1991). El ciclo de las astas de machos de venado de campo en condiciones de cautividad fue descrito por Ungerfeld et al. (2008c). En estas condiciones, los machos adultos pierden la primer asta aproximadamente el 3 de agosto, se observa la emergencia de la segunda punta el 17 de setiembre y pierden la felpa el 15 de noviembre. Por otra parte, durante el primer ciclo de las astas (machos de un año de edad), la caída de la primer asta ocurre después que en los machos adultos (Ungerfeld et al., 2008c). Existe información que relaciona el ciclo de las astas de machos en vida libre con las concentraciones de testosterona fecal (García-Pereira et al., 2005). Estos autores reportaron que la pérdida de las astas ocurre cuando la concentración de testosterona comienza a disminuir, y la caída de la felpa se produce en el periodo de altas concentraciones.

1.3.3 Distribución histórica y estado de conservación

Antiguamente el venado de campo se encontraba distribuido en América del Sur, entre los 5° y 41° S (Jackson & Langguth, 1987). Recientemente fueron hallados restos arqueológicos de venado de campo a 0° S (González et al., 2010), y aunque se desconoce si estos fueron llevados hasta allí por el hombre, su distribución podría haber sido aún mayor. Historiadores y naturalistas reportan una gran abundancia y amplia distribución de la especie en el siglo XVIII (Cabrera, 1943; Jackson et al., 1980; Jackson & Langguth, 1987). A pesar que fue considerado el cérvido más abundante del Uruguay (Jackson et al., 1980), la especie sufrió una significativa disminución vinculada con la acción directa e indirecta del hombre. En este sentido, su reducción poblacional puede ser explicada por la caza excesiva (Jackson

& Giullieti, 1988), la pérdida de territorio por competencia con especies domésticas (Demaría et al., 2003) y exóticas silvestres (Pérez-Carusi et al., 2009), la modificación del hábitat (Giménez-Dixon, 1987), y la transmisión de enfermedades infecciosas (Junguis, 1975/76).

Desde 1975, la Convención Internacional para el Tráfico y Comercio de especies amenazadas incluye al venado de campo en su Apéndice I, lo que significa que está amenazada de extinción (CITES, 2012). Por otra parte, la Lista Roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) cataloga la especie como “Casi Amenazada” (UICN, 2012). Ambas categorizaciones se refieren a la especie *Ozotoceros bezoarticus*, sin discriminar según subespecie o población, lo que quizás colocaría a algunas de ellas en una situación aún más vulnerable. La protección de especies autóctonas que, como el venado de campo, se encuentran amenazadas de extinción tiene gran importancia para la región. Sin embargo, al menos en Uruguay existen escasas medidas orientadas a la protección de dichas especies.

1.3.4 Poblaciones actuales

Actualmente se encuentran pequeñas poblaciones aisladas de la especie (González et al., 2010) (Figura 2). En Argentina se reportan poblaciones en las provincias de Buenos Aires (Vila & Beade, 1997; Pérez-Carusi et al., 2009), Corrientes (Parera & Moreno, 2000), San Luis (Dellafiore et al., 2003) y Santa Fé (Pautasso et al., 2002). En Brasil las poblaciones se encuentran en el Parque Nacional Emas (Rodrigues & Monteiro-Filho, 1999) y Pantanal (Goss-Braga, 1999), aunque recientemente se reportó la existencia de otras pequeñas poblaciones en los estados de Paraná, Rio Grande do Sul y Santa Catarina (Mazzolli & Benedet, 2009). En Bolivia (Tarifa, 1993) la presencia de la especie fue reportada hace algunos años pero no existe información actualizada al respecto. De igual forma, aunque la especie fue descrita en Paraguay (Cabrera, 1943) se desconoce su situación actual para este país.

En Uruguay, existen dos poblaciones en estado silvestre (Figura 2), las que fueron descritas como dos subespecies endémicas y diferentes a las encontradas en Brasil (*O. b. bezoarticus* y *O. b. leucogaster*) (González et al., 1998), y Argentina (*O. b. celer*) (González et al., 1998; Jackson & Langguth, 1987). A partir de información citogenética, molecular (González et al., 1998) y morfométrica (González et al., 2002) se determinó que la población ubicada en Salto corresponde a *O. b. arerunguaensis*, mientras que la ubicada en Rocha

pertenece a *O. b. uruguayensis*. En efecto, *O. b. arerunguaensis* se encuentra únicamente en las localidades de Arerunguá y El Tapado en el Departamento de Salto, con una población aproximada de 700 animales (Weber & González, 2003). La otra subespecie, *O. b. uruguayensis* se halla únicamente en la localidad de Sierra de los Ajos en el Departamento de Rocha, con una población estimada en 300 animales (Weber & González, 2003). Es importante destacar que no existen trabajos recientes en que se realice un relevamiento de la presencia de la especie en todo el territorio nacional, y en que se determine el tamaño y la distribución de las poblaciones ya conocidas.

Una tercera población de venado de campo se encuentra alojada en la Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (ECFA, 33°47'S, 54°00'O), Piriápolis, Maldonado (Figura 2). La misma se originó en 1981 y 1982 a partir de la extracción y relocalización de individuos pertenecientes a la población silvestre de *O. b. arerunguaensis* ubicada en Salto. Actualmente la población de la ECFA cuenta con aproximadamente 80 individuos.

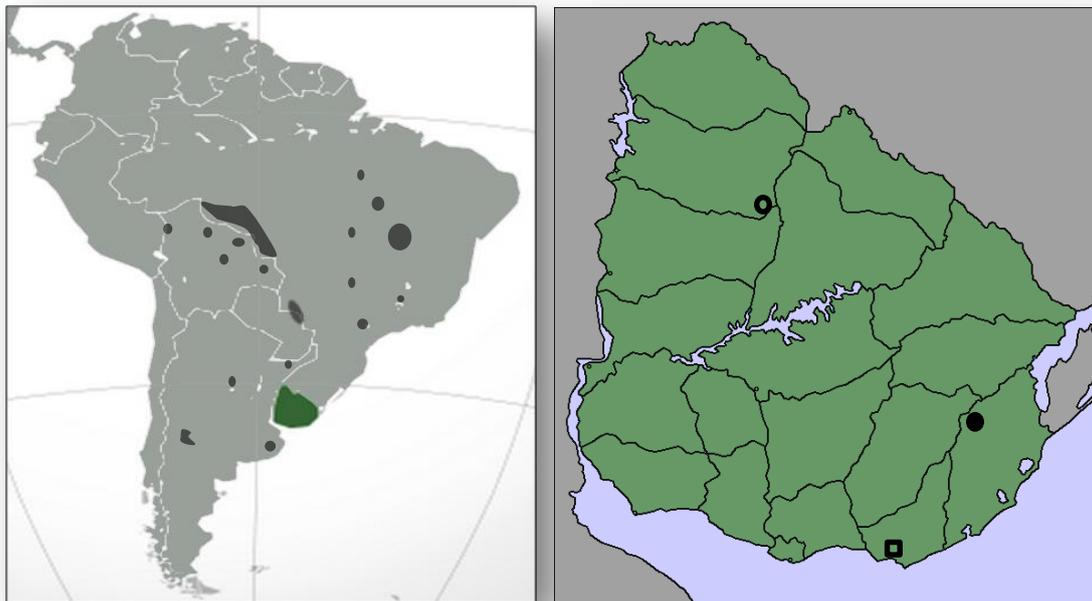


Figura 2. Distribución actual del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*): a la izquierda se representan las poblaciones silvestres de Sudamérica (zonas gris oscuro); a la derecha las poblaciones presentes en Uruguay en estado silvestre en Salto (○) y Rocha (●), y en semicautiverio en la ECFA (□).

1.4 Estrategias para el estudio de especies silvestres

El manejo de los individuos constituye una importante limitante en el estudio de la biología de las especies silvestres. Esto se debe a que, con la excepción de individuos entrenados, no es posible manipular a los animales. Por otra parte, la manipulación forzada de los mismos, a través de su captura con redes o prensas hidráulicas, genera un estrés importante en los animales, alterando la temperatura corporal, las frecuencias cardíaca y respiratoria, y las concentraciones sanguíneas de cortisol, calcio, potasio, glucosa, y enzimas hepáticas (Kock et al., 1987; Read et al., 2000). En este sentido, la utilización de técnicas que permitan manipular los animales, al mismo tiempo que minimicen las alteraciones fisiológicas provocadas por la misma resulta fundamental para el estudio de especies silvestres. Además, es deseable que dichas maniobras impliquen el menor riesgo posible para la vida del animal, siendo esto aún más importante si la especie estudiada se encuentra en riesgo de extinción.

La determinación de esteroides en materia fecal ha permitido evaluar estados fisiológicos de gran número de especies domésticas y silvestres sin necesidad de su manipulación. Esta técnica ha sido utilizada en especies domésticas para conocer el impacto de distintos manejos, procedimientos anestésicos, e instalaciones (Brousset et al., 2005). De igual forma, estos autores describen su uso para evaluar el bienestar animal de especies silvestres luego de ser reintroducidas. El mismo constituye un método especialmente interesante para monitorear la función gonadal, conocer el estatus reproductivo, y confirmar la preñez (Graham et al., 2001).

El uso de anestesia en individuos de especies silvestres resulta fundamental para realizar manejos que requieran su manipulación. El manejo anestésico de ciervos ha sido utilizado entre otras cosas para trabajos de investigación que implicaron extracción de sangre (Bubenik et al., 1987), de semen mediante electroeyaculación, sincronización de celos, inseminación artificial (García et al., 1998 ; Asher et al., 2000), y transferencia de embriones (Waldhalm et al., 1989; Fennessy et al., 1994). En ciervos neotropicales, entre los que se encuentra el venado de campo, se describe el uso de numerosos protocolos anestésicos (Veloso-Nunez et al., 1997). Recientemente fue descrito el uso de ketamina, xilazina, y atropina como protocolo anestésico para extraer semen mediante electroeyaculación en

venado de campo (Fumagalli et al., 2012). En este trabajo también se describieron los cambios en los parámetros fisiológicos, bioquímicos y sanguíneos provocados por la electroeyaculación.

2. Hipótesis

2.1 *Hipótesis general*

La presencia crónica de hembras estimula la actividad reproductiva de machos adultos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) alojados en semicautiverio.

2.2 *Hipótesis específicas*

La presencia crónica de hembras determina en los machos de venado de campo:

- una mayor producción de testosterona
- un mayor volumen, peso, tamaño, número de perlas y coloración de las astas
- un retraso en la fecha de caída de las astas
- un mayor peso corporal y perímetro de cuello
- un aumento en la intensidad del color del pelaje
- un mayor tamaño testicular, y una mayor proporción de parénquima testicular
- una mayor sensibilidad a la electroeyaculación
- mejores características seminales

3. Objetivo general

Determinar el efecto de la presencia de hembras sobre la producción de testosterona, las características morfológicas, seminales, de las astas, la estructura testicular, el color del pelaje y el momento de eyaculación durante la electroeyaculación de machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*).

4. Estrategia de investigación

Para cumplir con el objetivo planteado, se realizaron tres estudios, los que fueron desarrollados utilizando machos adultos de venado de campo alojados en la ECFA. Dada la dificultad de manipular los animales, y el riesgo que ello conlleva, se planteó realizar primero los trabajos no invasivos que generaran información de base, para luego, considerando los resultados de los mismos, realizar los trabajos que implicaron manipulación de los animales.

El primer estudio fue realizado utilizando las astas, ya que como se explicó, las mismas constituyen un excelente indicador de la actividad reproductiva de los machos. Además, dado que caen anualmente, su estudio no requiere de la manipulación de los individuos, sino solamente de una recolección y estudio cuidadoso de las mismas. Las astas utilizadas en este estudio fueron colectadas el año anterior al año en que se realizaron los estudios II y III. El objetivo fue determinar el efecto de la presencia de hembras sobre la fecha de caída, la morfología, y la coloración de las astas de los machos. Para ello se colectaron astas de machos que permanecieron alojados con hembras, y machos alojados en grupos de machos solos durante todo el ciclo de crecimiento de las astas estudiadas. Se registró la fecha de caída de ambas astas y posteriormente se determinó su peso, volumen, número de perlas, coloración y medidas de las mismas.

A partir de haber observado diferencias claras entre las astas de ambos grupos, se planteó estudiar las concentraciones de testosterona a lo largo de la estación reproductiva. Para ello, tal como se explicó, se optó por cuantificar la testosterona en materia fecal, ya que hubiera sido imposible anestésiar a los animales con la frecuencia necesaria para comparar los perfiles a lo largo de todo el período (muestras semanales durante ocho meses, comenzando previo al inicio de la estación reproductiva y finalizando luego de terminada la misma). Pero para poder realizar la cuantificación, previamente fue necesario poner a punto la técnica de extracción de esteroides en materia fecal de esta especie (Estudio II).

Finalmente, en el Estudio III se evaluó el efecto de la presencia de hembras sobre la producción de testosterona, el peso, las medidas corporales, la coloración del pelaje, dimensiones y ecogenicidad testicular, voltaje de eyaculación durante la electroeyaculación, y

las características del semen. Para este trabajo fue necesario manipular los animales, lo que se realizó bajo anestesia general.

5. Materiales & métodos generales

5.1 Alojamiento y manejo de los animales

Todos los estudios fueron realizados en la ECFA, donde todos los individuos se encontraban identificados mediante caravanas. La alimentación consistió en pastura natural, árboles y arbustos nativos, además de ser suplementados de lunes a sábados con 600 g/animal de ración para vacas lecheras.

Se utilizaron machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) pertenecientes a cinco grupos de cría (constituidos por 1 macho adulto de 4-7 años de edad y 5-10 hembras) alojados en encierros de 0,5 ha (Figura 3). Además se utilizó un grupo de 6 machos adultos de edad y características similares, alojado en un encierro separado por al menos 3 m del recinto más cercano en que se alojaban hembras (Figura 3). Dada la distancia entre los potreros de la ECFA, y que la separación entre los mismos era de tejido metálico, el grupo de machos solos permaneció aislado físicamente de las hembras, aunque no visual, ni auditiva, ni olfativamente. El grupo de machos permaneció integrado por los mismos individuos desde tres años previos a comenzar este trabajo. Por otra parte, no ingresaron o salieron individuos del grupo de machos alojados con hembras desde al menos 3 meses antes de comenzar el trabajo. Dos individuos del grupo de machos sin contacto directo con hembras murieron naturalmente durante la última etapa del Estudio III.

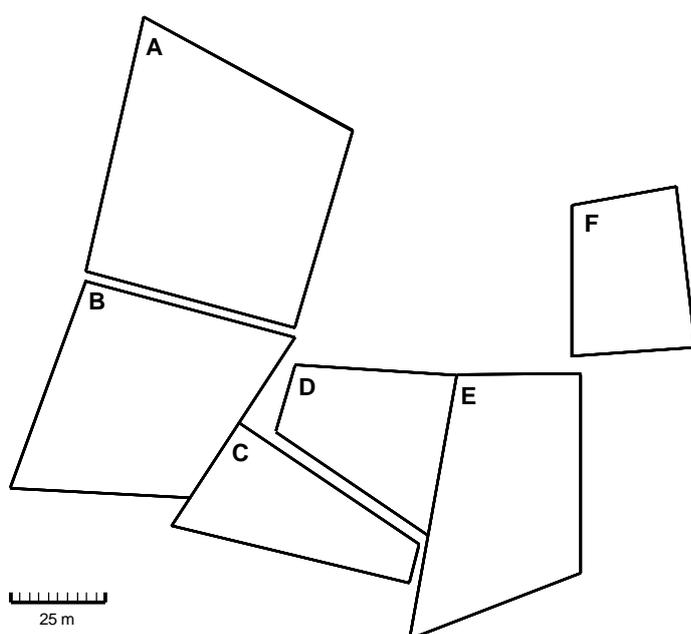


Figura 3. Esquema de los encierros de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) de la ECFA, en los que se encontraban alojados los grupos de cría (A-E) y el grupo de machos sin contacto directo con hembras (F).

Se determinaron algunas características de las astas luego de su caída, y se colectó materia fecal en forma semanal, para lo que no fue necesario manipular los animales. La determinación de las restantes variables consideradas en este trabajo requirió la manipulación de los animales, por lo que fue necesario obtener las muestras bajo anestesia general. Previo a su realización, el protocolo experimental utilizado en la presente tesis fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Facultad de Veterinaria.

6. Estudio I. Efecto de la presencia de hembras sobre las características de las astas de machos de venado de campo

6.1 Introducción

En cérvidos, la información disponible sobre la influencia de la estimulación socio-sexual sobre la reproducción es escasa. Esta se relaciona exclusivamente al efecto de la presencia de machos sobre la reproducción de las hembras (Verme et al., 1987, Komers et al., 1999; Whittle et al., 2000; Adams et al., 2001). Por otra parte, fue sugerido que las feromonas producidas por las hembras prolongarían en el año la secreción de testosterona de los machos, afectando la duración del ciclo de las astas (Bubenik & Bubenik, 1986). La formación de perlas en las astas se vincula con periodos de altas concentraciones de testosterona (Bubenik, 1966) y la pérdida de las astas con una disminución en la concentración de testosterona (Bubenik, 1990). Además, los estrógenos -formados a partir de la aromatización de la testosterona- incrementan la formación de tejido compacto de las astas (Bubenik et al., 1987; Bubenik, 1990; Price & Allen, 2004). En coincidencia, los machos adultos de venado de campo de la EFCA alojados con hembras presentaron una mayor proporción de tejido óseo compacto en algunas zonas de las astas, y poseen una mayor convexidad de la corona de las mismas que machos alojados sin contacto con hembras (Canabal & Ungerfeld, 2011). Además, a través de observaciones casuales es posible sugerir que las astas de machos de venado de campo alojados con hembras son más oscuras que las de aquellos machos que habitan en grupos de machos solos.

6.2 Objetivo

Determinar el efecto de la presencia de hembras sobre la fecha de caída, el volumen, peso, medidas, coloración, y número de perlas de las astas de los machos de venado de campo.

6.3 Materiales & métodos

6.3.1 Alojamiento de los animales

Como fue explicado previamente (ver *sección 5.1*), se utilizaron cinco machos adultos, que se encontraban alojados con hembras, y un grupo de seis machos adultos que nunca tuvo contacto directo con hembras. Ambos grupos permanecieron sin cambios en su estructura social desde al menos 2 meses antes de la caída de las astas del ciclo anterior al utilizado en este estudio.

6.3.2 Características de las astas

Diariamente, entre fines de julio y principios de agosto, se observó el estado de las astas en los animales. Posteriormente a la caída de un asta, la misma fue buscada y recogida del encierro, identificada, pesada y se determinó su volumen. Este último parámetro fue determinado cuantificando el desplazamiento de una columna de agua resultante de sumergir un asta en un recipiente graduado. Además, se contabilizaron las perlas y se tomaron las medidas utilizadas por Ungerfeld et al. (2008a): circunferencia de la corona, de la base de la primera, segunda, y tercera punta; longitud de la primera, segunda y tercera punta; distancia de la base a la primera y segunda bifurcación, y a la primera, segunda y tercera punta.

El color de las astas fue evaluado utilizando un colorímetro (Minolta CR10, Minolta Camera Co, Osaka 541, Japón). Los resultados fueron expuestos según las recomendaciones de la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE, 1976): valores de luminosidad (L^*) (desde 10 el más oscuro hasta 100 el más blanco), enrojecimiento (a^*) [desde el verde (valor negativo) al rojo (valor positivo)], y amarillamiento (b^*) [a partir de azul (valor negativo) a amarillo (valor positivo)]. Se determinó por triplicado en 11 puntos por asta. Estos puntos incluyeron la parte interior de la corona, y la cara interna y externa de los siguientes puntos: punto medio desde la corona a la primer bifurcación, segunda bifurcación, y en el punto medio de la longitud de cada punta.

6.3.3 Análisis estadístico

La fecha de caída de las astas y sus medidas y color fueron analizadas por ANOVA. El número de perlas en ambas astas fue comparado mediante el test de Kruskal-Wallis.

6.4 Resultados

6.4.1 Fecha de caída de astas

La caída de la primer asta tendió a ser más tardía en los machos en contacto con hembras que en aquellos del grupo sin hembras ($2,0 \pm 4,4$ de agosto vs $21,8 \pm 3,9$ de julio; $p=0,08$). La caída de la segunda asta se observó en todos los animales menos de un día después de la primera.

6.4.2 Tamaño de astas y número de perlas

El peso y volumen de las astas de los machos expuestos a hembras fue mayor que en los machos solos [$148,7 \pm 7,4$ vs $121,3 \text{ g} \pm 8,0 \text{ g}$ ($p=0,02$) y $85,8 \pm 5,3 \text{ cm}^3$ vs $68,8 \pm 6,3 \text{ cm}^3$ ($p=0,04$) respectivamente]. La circunferencia en la base de la primer y segunda punta fue mayor en las astas de los machos que estuvieron en contacto con hembras que en los machos aislados físicamente de hembras ($p=0,05$ y $0,002$ respectivamente; Tabla 1). Las astas de machos alojados con hembras tendieron a presentar mayor circunferencia de la tercer punta ($p=0,07$), largo desde la corona a la primer bifurcación ($p=0,07$), y largo de la primer punta ($p=0,08$) (Tabla 1). El número de perlas fue mayor en las astas de los machos en contacto con hembras ($299,8 \pm 48,1$ vs $106,7 \pm 29,3$; $p=0,02$).

Tabla 1. Circunferencia y largo (cm) de las astas de los machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) que estuvieron en contacto permanente con hembras o aislados físicamente de ellas (media \pm EE).

Parámetro		Contacto con hembras	Aislado de hembras	p
Circunferencia	Corona	6,9 \pm 0,2	6,8 \pm 0,1	ns
	Base de la primer punta	6,2 \pm 0,2	5,7 \pm 0,2	0,05
	Base de la segunda punta	5,6 \pm 0,2	4,9 \pm 0,1	0,002
	Base de la tercer punta	4,9 \pm 0,2	4,4 \pm 0,2	0,07
Largo	Desde la corona hasta la primera bifurcación	4,9 \pm 0,2	5,4 \pm 0,2	0,07
	Desde la corona hasta la segunda bifurcación	15,2 \pm 0,5	14,6 \pm 0,7	ns
	Primera punta	16,6 \pm 0,4	14,6 \pm 1,1	0,08
	Segunda punta	15,0 \pm 0,4	14,8 \pm 0,9	ns
	Tercer punta	13,2 \pm 0,3	12,3 \pm 1,2	ns

6.4.3 Color de astas

En general, las astas de los machos en contacto con hembras fueron más oscuras que las astas de los machos aislados físicamente de estas (Tabla 2; Figura 4). El color en el interior de la corona fue similar en las astas colectadas de machos que permanecieron en, o sin contacto con hembras. Las astas de los machos que estuvieron en contacto con hembras fueron más oscuras (menor L*) que aquellas de los machos que estuvieron en el grupo sólo de machos. No se observaron diferencias en los valores de a*, salvo en la segunda bifurcación, la que tuvo un valor más alto en las astas de los machos que estuvieron en contacto con hembras (p= 0,006). Con la excepción de la segunda bifurcación y la cara interna de la corona, en las que no se observaron diferencias, el valor b* fue menor en las astas de machos en contacto con hembras.



Figura 4. Astas derechas de 8 machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) que permanecieron alojados con hembras (arriba) o aislados de ellas (abajo).

En general, no hubo diferencias en los colores entre las astas derecha e izquierda en los machos que permanecieron aislados de hembras. En los machos en contacto con hembras, las astas derechas tuvieron mayor valor de a^* ($3,8 \pm 0,2$ vs $3,5 \pm 0,1$, $p= 0,04$) y b^* ($24,7 \pm 0,3$ vs $24,0 \pm 0,3$, $p= 0,04$). Sin embargo, los valores L^* de las astas izquierda y derecha fueron similares ($39,0 \pm 0,6$ vs $38,1 \pm 0,6$). No hubieron diferencias en los valores L^* y b^* medidos en la cara interna y externa de las astas en los machos mantenidos en contacto con hembras. El valor de a^* en la cara externa fue mayor que en la cara interna ($3,8 \pm 0,1$ vs $3,4 \pm 0,1$; $p= 0,05$). En los machos sin contacto físico con hembras, el valor b^* no difirió entre la cara interna y externa de las astas. Sin embargo, el valor L^* de la cara externa ($48,6 \pm 0,6$) fue menor al de la interna ($50,2 \pm 0,6$; $p= 0,03$), y el valor a^* de la cara externa ($4,0 \pm 0,2$) fue mayor que la interna ($3,2 \pm 0,1$; $p< 0,001$).

Tabla 2. Medidas de los parámetros de color L*, a* y b* en el interior de la corona y en otros 5 puntos según las recomendaciones de CIE (1976) en las astas de los machos de venado de campo que estuvieron en contacto permanente con hembras o aislados físicamente de ellas (media \pm EE).

Parámetro de color	Zona medida	Contacto con hembras	Aislados de hembras	p
L*	Cara interna de la corona	62,3 \pm 1,4	61,4 \pm 1,7	ns
	Punto medio desde la corona a la primer bifurcación	36,0 \pm 0,9	46,6 \pm 1,9	<0,0001
	Segunda bifurcación	43,4 \pm 0,6	46,1 \pm 1,0	0,006
	Primer punta	37,0 \pm 1,0	51,5 \pm 1,3	<0,0001
	Segunda punta	37,9 \pm 1,2	51,5 \pm 0,9	<0,0001
	Tercer punta	38,8 \pm 0,5	51,3 \pm 1,6	<0,0001
	a*	Cara interna de la corona	3,6 \pm 0,5	4,3 \pm 0,6
Punto medio desde la corona a la primer bifurcación		3,3 \pm 0,4	4,0 \pm 0,4	ns
Segunda bifurcación		3,7 \pm 0,4	2,5 \pm 0,4	0,006
Primer punta		3,3 \pm 0,3	3,8 \pm 0,4	ns
Segunda punta		3,6 \pm 0,3	3,5 \pm 0,2	ns
Tercer punta		4,0 \pm 0,3	3,9 \pm 0,6	ns
b*		Cara interna de la corona	32,5 \pm 0,7	33,1 \pm 1,1
	Punto medio desde la corona a la primer bifurcación	23,4 \pm 0,5	27,7 \pm 0,6	<0,0001
	Segunda bifurcación	26,3 \pm 0,5	26,3 \pm 0,8	ns
	Primer punta	23,6 \pm 0,5	29,7 \pm 0,5	<0,0001
	Segunda punta	24,0 \pm 0,7	29,2 \pm 0,6	<0,0001
	Tercer punta	24,6 \pm 0,2	29,2 \pm 0,7	<0,0001

6.5 Discusión

Las características de las astas son un excelente indicador de la concentración de testosterona alcanzada durante su desarrollo (Bubenik, 1990). En este sentido, este trabajo describe a través de las astas el efecto del contacto directo con hembras sobre la actividad reproductiva de los machos. El mayor peso, volumen, y medidas de las astas, así como la tendencia a caer más tarde en los machos con hembras, puede estar reflejando una mayor actividad gonadal debido a la estimulación con hembras. Las características morfológicas y la fecha de caída de las astas están dentro de los rangos descritos anteriormente en esta misma población (Ungerfeld et al., 2008a; c). Las astas de machos en contacto con hembras también tuvieron un mayor número de perlas que las de machos sin contacto con estas, lo que se ha reportado que se relaciona con las concentraciones de testosterona (Bubenik, 1966). Además las astas de machos con hembras cayeron 11 días después que la de los machos solos, lo que podría implicar que la concentración de testosterona se mantuvo más alta por más tiempo (Bubenik, 1990). En síntesis, tanto las observaciones sobre mayor peso, medidas de tamaño, fecha de caída y número de perlas podrían relacionarse con una mayor actividad gonadal debido al estímulo de las hembras.

A pesar que la distancia a las hembras del grupo de machos solos fue de tan sólo algunos metros, igualmente existieron diferencias a favor de los machos en contacto con hembras. En este sentido, los resultados del presente trabajo concuerdan con lo reportado en rumiantes domésticos (González et al., 1988b, 1991a), dado que el contacto directo con hembras jugaría un rol más importante que la estimulación visual, auditiva, y química en la reproducción de los machos. De igual forma, aunque su existencia ha sido sugerida, la estimulación de machos de ciervos a través de feromonas de las hembras (Bubenik & Bubenik, 1986) sería menos importante que el contacto directo con ellas. Por tanto, en venado de campo los comportamientos de cortejo y cópula probablemente resulten de gran importancia para la estimulación de la reproducción de los machos.

Las astas de los machos alojados con hembras fueron más oscuras que las de machos sin contacto directo con hembras. Sin embargo, dado que la coloración de la zona interna de la base de las astas no fue diferente, el efecto parece presentarse solamente en la superficie externa. Esto es coincidente con que aparentemente las diferencias de coloración ya se observarían desde la caída de la felpa. Durante este período los machos de venado de campo

marcan con las astas contra árboles, arbustos y otros sustratos (Ungerfeld et al., 2011). En tal sentido, una posible explicación podría ser que los machos con hembras marquen con una mayor frecuencia durante el periodo de pérdida de la felpa. Si bien las astas son estructuras orientadas a la atracción de las hembras (Bubenik, 2002), se desconoce aún cómo la coloración de las mismas afecta la atractividad de los machos.

Se observó que machos aislados físicamente de hembras poseían la cara interna de sus astas más clara que la cara externa. Esto podría relacionarse con que durante la marcación la cara externa tiene mayor contacto con el sustrato que la cara interna. Además, existieron diferencias en la coloración entre las astas derecha e izquierda, lo que coincide con una pequeña diferencia en el peso entre las astas derecha e izquierda (Ungerfeld et al., 2008a). En ciervo cola blanca la asimetría de las astas se relaciona negativamente con el tamaño de las mismas, la edad y el tamaño corporal de los machos (Ditchkoff et al., 2001). Por su parte, machos más grandes de alces poseen menor asimetría de sus astas (Bowyer et al., 2001). Por este motivo estos autores sugieren que en ciervos la simetría de las astas constituye una señal honesta sobre los atributos del macho, la que se vincularía con la selección sexual. En ciervo rojo la simetría de las astas no estaría vinculada con la capacidad del macho de tener un harem de hembras, aunque sí el tamaño de dichas estructuras (Bartoš & Bahbouh, 2006). Además, el tamaño y la complejidad de las astas es una señal honesta de la producción y velocidad espermática (Malo et al., 2005). Por lo tanto, se podría especular que la exposición a las hembras estimuló la actividad gonadal de los machos de venado de campo, lo que produjo cambios en el tamaño, en la simetría, y la coloración de las astas. A su vez, y como se sugiere en otras especies de ciervos, estos cambios en las características de las astas podrían constituir señales dirigidas hacia las hembras que podrían estar indicando la calidad de dichos machos.

6.6 Conclusiones

Se concluyó que el contacto con hembras estimuló el peso, volumen, tamaño, y coloración de las astas de machos de venado de campo, y probablemente retrasó la fecha de caída de las mismas.

7. Estudio II. Desarrollo de una técnica de extracción de testosterona en materia fecal de machos de venado de campo

7.1 Introducción

La medición de esteroides sexuales y corticoesteroides en materia fecal es utilizada para valorar el estado reproductivo y de bienestar de los animales. Esta técnica ha sido utilizada en muchas especies animales: carnívoros silvestres (lince: Dehnhard et al., 2008; licaon: Monfort et al., 1998), conejo (Korndörfer et al., 1998), armadillo (Superina et al., 2009; Superina & Jahn, 2009), jirafa (Lueders et al., 2009), rinocerontes (Graham et al., 2001), elefante (Ghosal et al., 2010), y carneros silvestres (Pelletier et al., 2003). La cuantificación de andrógenos en materia fecal de ciervos también ha sido ampliamente utilizada para estudiar su fisiología reproductiva (guazubirá: Fraguas-Versiani et al., 2009; ciervo rojo: ShuLing et al., 2008; ciervo sika: Yamauchi et al., 1999; ciervo del padre David: Li et al., 2001; ciervo cola blanca: Taillon & Côté, 2008; venado de campo: García-Pereira et al., 2005). El método de determinación de hormonas en materia fecal debe ser validado para cada especie ya que el metabolismo de los esteroides y su vía de excreción difiere en forma importante entre especies (Palme, 2005).

Previo a determinar la concentración de hormonas en materia fecal es necesario realizar un proceso de extracción hormonal. En forma sintética, las técnicas utilizadas en diferentes especies consisten en mezclar una cantidad conocida de materia fecal con un volumen determinado de una solución lipofílica. Se puede partir de materia fecal fresca (Graham et al., 2001) o desecada (dos Santos-Zanetti et al., 2010). Según Wasser et al. (2000) los resultados de realizar la extracción hormonal utilizando ambas alternativas son similares. En el solvente orgánico se disuelven los esteroides presentes en las fecas, y luego ambas porciones se separan mediante congelación (Yamauchi et al., 1999), o centrifugación (Kusuda et al., 2006). En algunos casos la medición hormonal se realiza directamente en esta solución (Hamasaki et al., 2001). En otros protocolos la fracción lipofílica es desecada y reconstituida en una solución bufferada, a la que en ocasiones también se le agrega un alcohol (Matsuura et al., 2004). En esos casos la medición hormonal se realiza a partir de esta última solución. Algunos protocolos utilizan una doble extracción hormonal (Superina & Jahn, 2009; Superina et al., 2009), lo que permitiría aumentar el porcentaje de extracción hormonal

a partir de la misma muestra de materia fecal. Por otra parte, la concentración hormonal puede ser determinada mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Pickard et al., 2001), ensayo inmunoenzimático (EIA) (García-Pereira et al., 2006), o radioinmunoensayo (RIA) (Li et al., 2001). En síntesis, existen numerosos protocolos de extracción hormonal, los que utilizan diferentes solventes, proporciones y métodos de desecado, agitado y separación y determinación hormonal.

Existe un antecedente de determinación de la concentración de testosterona y cortisol presente en la materia fecal de machos de venado de campo en vida libre mediante EIA (García-Pereira et al., 2005; 2006). Por otra parte, en un trabajo anterior determinamos la concentración de progesterona en fecas de hembras de venado de campo para lo que se utilizó una técnica de extracción de hormonas similar a la descrita por Yamauchi et al. (1997). Sin embargo los datos de algunas muestras no fueron consistentes con el estado reproductivo en que se encontraban las hembras, sugiriendo que parte de la hormona no era extraída de la materia fecal (datos no publicados). Por tal motivo, se consideró que al igual que en otras especies, el uso de una doble extracción de esteroides (Superina & Jahn, 2009; Superina et al., 2009) podría mejorar la tasa de recuperación hormonal obtenido mediante una única extracción.

7.2 Objetivo

Comparar la extracción de testosterona en materia fecal de venado de campo utilizando una técnica de referencia y una con doble extracción.

7.3 Materiales & métodos

7.3.1 *Colecta de materia fecal*

Se obtuvo materia fecal de machos adultos de venado de campo en forma semanal desde principios de octubre hasta principios de febrero del siguiente año, y desde mediados de abril hasta mediados de mayo. La misma fue colectada inmediatamente de que se observó la defecación, almacenada en bolsas plásticas, identificada y refrigerada a -20 °C hasta su procesamiento. Al final del periodo de muestreo se totalizaron 218 muestras de materia fecal.

7.3.2 *Extracción de testosterona de las heces*

Una fracción de aproximadamente 3 g de cada muestra de materia fecal colectada fue colocada en un tubo con tapa rosca teflonada de 25 cm³ para su liofilización durante 60 h (Alpha-I-6, Christ Martin Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Alemania). La materia fecal fue pulverizada utilizando un mortero, y posteriormente mezclada para lograr una muestra homogénea. Se pesaron 0,25 g de materia fecal pulverizada en una balanza de precisión (SA 210, Scientech Inc., Boulder, EEUU), y se colocaron en un tubo de tapa rosca teflonada de 25 cm³ para la extracción de testosterona. Para ello se adicionaron 1,5 mL de agua destilada y 5 mL de eter dietílico (RBenzo, Montevideo, Uruguay), se agitó durante 2 min utilizando un vortex, y se colocó en un freezer a -80 °C durante 1 h, para separar la fracción sólida (materia fecal y agua destilada) de la líquida (éter). La fracción líquida fue traspasada a un tubo de vidrio de 5 cm³ y colocado en un baño maría a 45 °C durante aproximadamente 6 h, hasta su evaporación. La pared del tubo fue lavada utilizando 0,5 mL de etanol 95% (RBenzo, Montevideo, Uruguay), y agitado durante 1 min utilizando un vortex. Posteriormente se agregó 0,5 mL de fosfato salino bufferado con 1 % de albumina sérica bovina (BSA, A-4503, Sigma, St. Louis, EEUU) (PBS-BSA) tapados con film, y fue mantenido a 4 °C durante 12 h. Por otra parte, la fracción sólida (materia fecal y agua destilada) fue sometida a un nuevo proceso de extracción igual al anteriormente descrito. La primera y segunda fracción (A y B respectivamente) fueron colocados en tubos eppendorf independientes, identificados y mantenidos a -20 °C hasta la determinación hormonal.

7.3.3 Elaboración de la curva estándar

Los kits comerciales de radioinmunoanálisis disponibles para la determinación hormonal cuentan con una curva estándar desarrollada a partir de suero sanguíneo. Por tal motivo, para la presente determinación se consideró más apropiado elaborar una curva estándar partiendo de materia fecal. Para ello y para contar con fecas con concentraciones despreciables de esteroides sexuales, se colectó materia fecal de una oveja ovariectomizada. La materia fecal fue liofilizada durante 60 h, realizándose luego el mismo proceso de extracción hormonal descrito anteriormente. Como fuente de testosterona, se extrajo suero de un carnero al que se le administraron 8,4 µg de un análogo sintético de GnRH (Buserelina: Receptal, Intervet, Alemania) 1 y 2 h antes.

La concentración de testosterona sérica se determinó mediante radioinmunoanálisis. La solución obtenida del proceso de extracción de materia fecal fue mezclada con el suero del carnero en una dilución de 1:25. Luego se realizaron diluciones de 1:2 utilizando fosfato salino bufferado con 1 % de albúmina para obtener una curva estándar de testosterona con concentraciones decrecientes.

7.3.4 Determinación de testosterona

La determinación de testosterona fue realizada mediante RIA ¹²⁵I de fase sólida (Coat-A-Count TKTT, Siemens, Los Angeles, CA, EEUU). Los coeficientes de variación intraensayo fueron 5,7 y 7,5 % para controles altos y bajos respectivamente. A partir de la concentración obtenida se calculó la concentración por gramo de materia fecal desecada (ng/g). Ambas fracciones de extracción fueron medidas por separado y su concentración se expresa como media ± EE.

7.3.5 Análisis estadístico

Una vez determinada la concentración extraída en cada fracción, se realizó una regresión lineal simple considerando como variable independiente la primera fracción (A), y como variable dependiente la suma de ambas fracciones (A+B).

7.4 Resultados & discusión

La concentración de testosterona presente en la fracción A y el total recuperado mediante la doble extracción (fracciones A+B) fue $21,7 \pm 1,0$ ng/g y $48,7 \pm 2,1$ ng/g respectivamente. Por tanto, una doble extracción permitió recuperar 55,3 % más de testosterona que al realizar una única extracción. Aunque se desconoce la concentración hormonal total, la doble extracción permitió recuperar una cantidad bastante mayor que la obtenida solamente con la fracción A, obteniendo por tanto valores más aproximados a la concentración hormonal real presente en las muestras analizadas. En este sentido, a pesar que la técnica implica más manipulación y gasto de materiales, el resultado obtenido refleja en forma más precisa el estado reproductivo de los animales. A partir de esta información es posible especular que la inconsistencia encontrada entre las concentraciones de progesterona en materia fecal y el estado reproductivo de las hembras de venado de campo (datos no publicados) se vincule con un bajo porcentaje de recuperación hormonal debido a que fue realizada una única extracción hormonal.

De todas formas, la concentración de testosterona obtenida a partir de la fracción A permitió predecir con alta probabilidad el valor final de ambas extracciones sumadas (fracción A+B) ($r^2 = 0,86$; $p < 0,0001$; Figura 5). Por tanto, si lo que interesa es comparar valores y no ajustarse al valor real, no sería necesario realizar dos extracciones.

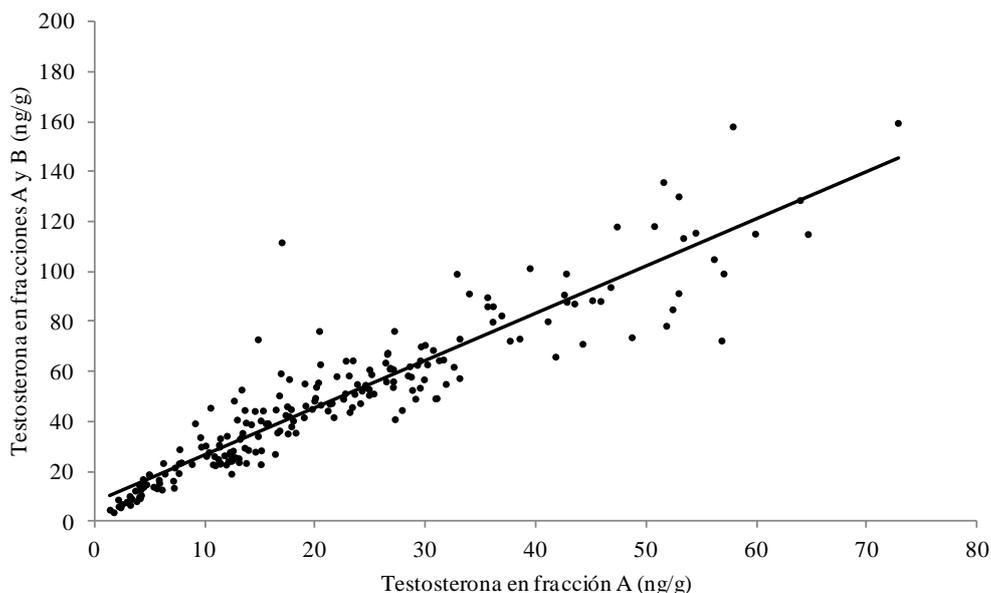


Figura 5. Concentración de testosterona de machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) obtenida de la primera fracción (A) y del total (A+B) de una doble extracción de esteroides en materia fecal ($r^2=0,86$; $p< 0,0001$). Cuatro valores fueron eliminados para mejorar la visualización del gráfico.

La concentración de testosterona fecal obtenida en este trabajo fue similar a lo reportado previo a la estación reproductiva en carneros silvestres (*Ovis canadensis*: Pelletier et al., 2003; *Pseudois nayaur*: Kusuda et al., 2006), y ligeramente inferiores a los descritos anteriormente en venado de campo (García-Pereira et al., 2005). El valor máximo reportado por los autores fue aproximadamente 200 ng/g de materia fecal, mientras en el presente trabajo fue de 159,3 ng/g. Sin embargo las técnicas utilizadas difieren con la del presente trabajo, ya que extrajeron la testosterona a partir de materia fecal fresca conservada en etanol y agua destilada (Pelletier et al., 2003), utilizando metanol en vez de éter como solvente (García-Pereira et al., 2005; Kusuda et al., 2006), y sin realizar una evaporación del mismo (Pelletier et al., 2003; García-Pereira et al., 2005). La similitud en las concentraciones reportadas por estos trabajos, pese a las diferentes técnicas utilizadas permite plantear que en este trabajo se obtuvo un alto porcentaje de recuperación de testosterona.

7.5 Conclusión

Se concluyó que aunque una única extracción hormonal permitió predecir con alta probabilidad la concentración obtenida de una doble extracción, a partir de esta última técnica fue posible recuperar una concentración hormonal más de dos veces mayor.

8. Estudio III. Efecto de la presencia de hembras sobre las características morfológicas y seminales, y la producción de testosterona de machos de venado de campo

8.1 Introducción

El estímulo de la presencia de hembras sobre la reproducción y en particular sobre la producción de testosterona de los machos, fenómeno conocido como “efecto hembra”, ha sido ampliamente reportado de rumiantes (ver *sección 1.2.2*). Gran número de características morfológicas y reproductivas de los machos de rumiantes presentan cambios a lo largo del año, las que han sido vinculadas con los cambios estacionales en la concentración sérica de testosterona. Sin embargo, y pese a su vinculación con este andrógeno, el efecto de la presencia de hembras sobre la mayoría de estas características no ha sido estudiado hasta el momento en cérvidos.

8.1.1 Cambios morfométricos

Numerosos trabajos describen cambios asociados a la estación reproductiva en el cuerpo de machos de diferentes especies de cérvidos. En machos de ciervo rojo el peso corporal, y los perímetros torácico y del cuello aumentan antes de la estación reproductiva (Lincoln et al., 1972; Clutton-Brock et al., 1982). Estos cambios aumentarían la habilidad para pelear con otros machos durante este período (Clutton-Brock et al., 1982). Los cambios estacionales en las características sexuales secundarias, así como en la actividad espermatogénica, y el comportamiento agresivo y sexual de los machos están asociados con los cambios en la concentración sérica de testosterona (Lincoln, 1992). El crecimiento muscular se relaciona con el efecto anabólico de este andrógeno (Mystkowski & Schwartz, 2000).

El tamaño testicular también presenta cambios estacionales. En ciervo rojo, el diámetro testicular acompaña los cambios en la concentración de testosterona (Gaspar-López et al., 2010). En los machos de esta especie el aumento drástico en la concentración sérica de testosterona observado aproximadamente dos meses antes del inicio de la estación

reproductiva fue directamente correlacionado con el aumento en la circunferencia escrotal y el porcentaje de espermatozoides normales (Haigh et al., 1984; Fourie et al., 2005). De igual forma, se determinó una alta correlación entre la circunferencia escrotal y el porcentaje de espermatozoides normales en carneros (Mickelsen et al., 1981). Incluso en ciervos axis (*Axis axis*) habitando regiones tropicales, donde las especies tienden a presentar una estacionalidad menos marcada debido a menores fluctuaciones fotoperiódicas, existe una estrecha correlación entre el tamaño testicular, la secreción de testosterona y el crecimiento de las astas (Loudon & Curlewis, 1988). El perímetro del cuello y las medidas testiculares - circunferencia escrotal, volumen testicular, y la relación volumen testicular:peso corporal- de machos adultos de venado de campo presentaron aumentos estacionales similares a los observados en la concentración sérica de testosterona, alcanzando los mayores valores durante la época de celos (verano-otoño) (González-Pensado, 2011). Tomando en cuenta que la presencia de hembras estimularía la secreción de testosterona (ver *sección 1.2.2*), y que existe una asociación entre las características morfológicas antes mencionadas y la concentración de la misma, es posible especular con que la presencia de hembras podría afectar positivamente las características morfológicas de los machos.

8.1.2 Cambios en la coloración del pelaje

Los machos de numerosas especies de rumiantes poseen un pelaje completa o parcialmente más oscuro que el de las hembras. Sin embargo en caprinos silvestres del Himalaya (*Hemitragus jemlahicus*) los machos tienden a poseer el pelaje del cuello más dorado y largo que las hembras (Lovari et al., 2009). Alguna de las zonas de diferente color entre sexos son la cabeza (ciervo cola blanca: Atkeson & Marchinton, 1982; Bubenik & Bubenik, 1985; *Ovis dalli*: Loehr et al, 2008), y el cuello (ciervo rojo: Lincoln, 1971). Estas diferencias se acentúan durante la estación reproductiva, ya que la melanogénesis es estimulada por la testosterona (Bubenik & Bubenik, 1985). Otra región donde se observan cambios de coloración vinculados a la estación reproductiva es el pelaje del escroto (Bubenik & Bubenik, 1985). Estos autores, describieron una alta correlación entre el grado de pigmentación de la cabeza, mejillas y la nariz y la concentración sérica de testosterona de los machos de ciervo cola blanca. Además, en estas zonas los machos poseen frecuentemente mayor número de glándulas apócrinas, sebáceas y sudoríparas que en el resto del cuerpo (Ebling, 1972; Atkeson & Marchinton, 1982; Thornton et al., 2001). La actividad y el tamaño de las glándulas cutáneas de estas regiones también presentan cambios estacionales, ya que

son estimuladas por la secreción de andrógenos (Ebling, 1972). Además, en estas glándulas y en los folículos pilosos de estas regiones de la piel fueron hallados receptores para testosterona (Bubenik & Bubenik, 1985). Por otra parte, en machos de ciervo rojo y carneros silvestres y domésticos el oscurecimiento del pelo del cuello coincide con el crecimiento del pelo (Lincoln, 1971; 1990).

En artiodáctilos que viven en grupos sociales, el oscurecimiento del pelaje de los machos constituiría una señal visual dirigida tanto hacia machos como hembras (Caro, 2005) Según este autor esta característica se vincularía con el estatus jerárquico, el potencial reproductivo, e incluso con las cualidades genéticas del individuo, y en ocasiones podría relacionarse con la selección sexual. La oscuridad del pelaje de la cara de carneros Dall (*Ovis dalli*) se relaciona con el rango jerárquico, con la oportunidad de aparearse y con el crecimiento de los cuernos (Loehr et al, 2008). Sin embargo, machos caprinos del Himalaya de alto rango jerárquico poseen un pelaje del cuello más dorado, mientras que en los subordinados tiende más al marrón (Lovari et al., 2009). Considerando que el rango jerárquico se vincula estrechamente con la concentración de testosterona, podría especularse que machos más oscuros posean mayores concentraciones séricas de testosterona. Estos cambios han sido interpretados como señales visuales desarrolladas por los machos para demostrar entre otras cosas su capacidad reproductiva (Bubenik & Bubenik, 1985) y estatus jerárquico (Lincoln, 1971; Atkeson & Marchinton, 1982). Esta estrategia sería más importante en especies en que el tamaño corporal y de la cornamenta es menor (Caro, 2005; Lovari et al., 2009).

8.1.3 Ecogenicidad testicular

La ultrasonografía es una técnica no invasiva de obtención de imágenes, ampliamente utilizada para examinar el tracto reproductivo de rumiantes domésticos. En las hembras de estas especies es frecuentemente utilizada para la determinación de la preñez y el estudio de la actividad ovárica, y también para la detección de patologías en el tracto reproductivo de machos y hembras (González-Bulnes et al., 2010). Mediante la eco-densidad testicular, determinada a partir de la cuantificación de píxeles, es posible establecer la variación estructural del parénquima testicular, la proliferación celular y producción de fluidos del testículo (Wu et al., 2010). La determinación de la ecogenicidad testicular es un procedimiento subjetivo, excepto si se cuantifican los píxeles mediante un software (Kauffold

et al., 2011). Sin embargo, pocos trabajos han utilizado este procedimiento para estudiar la actividad testicular. En cetáceos se determinó que la intensidad de pixeles presentes en imágenes ecográficas de testículo se relaciona positivamente con la concentración sérica de testosterona (Wu et al., 2010). Por otra parte, la ecogenicidad testicular de corderos prepúberes aumentó a medida que se acercaba la pubertad, lo que fue interpretado como un aumento del número de células germinales presentes en el parénquima testicular (Chandolia et al., 1996). En carneros tratados con GnRH se observó una disminución aguda en la intensidad de pixeles del testículo, lo que fue interpretado como un incremento en el contenido de líquido en el mismo consecuencia del mayor flujo sanguíneo estimulado por la LH (Ungerfeld & Fila, 2011a). En forma similar carneros expuestos a hembras en celo disminuyeron su ecogenicidad testicular, al tiempo que aumentaban la concentración sérica de testosterona (Ungerfeld & Fila, 2011b). En función de estos antecedentes es posible afirmar que el aumento de ecogenicidad testicular se vincula con una mayor relación de parénquima testicular/líquido, y una menor ecogenicidad se relaciona con una mayor proporción de líquido en el testículo. Hasta el momento no existen trabajos en que se cuantifique la eco-densidad testicular de ciervos, ni cómo ésta cambia en presencia de hembras.

8.1.4 Semen

La espermatogénesis presenta cambios estacionales que se vinculan con la concentración de testosterona. En este sentido, se reportó una asociación entre los cambios en la concentración de testosterona y el aumento del tamaño testicular, de los túbulos seminíferos y células germinales en carneros (Hochereau de Reviere & Lincoln, 1978). De igual forma, fue descrita una asociación entre la concentración sérica de testosterona, la producción espermática y la calidad seminal de varias especies de ciervos (wapiti: Haigh et al., 1984; axis: Loudon & Curlewis, 1988; de Eld: Monfort et al., 1993; corzo: Blottner et al., 1996). Dado que la espermatogénesis requiere altas concentraciones de testosterona en el testículo (McLachlan et al., 1995), machos de ciervo rojo y gamo manifiestan un cese casi completo de la producción de espermatozoides, una disminución brusca del volumen eyaculado, e infertilidad durante otoño-invierno, lo que se asocia a bajas concentraciones de testosterona (Haigh et al., 1984). Según González-Pensado (2011) los machos de venado de campo presentan el mayor desarrollo de sus características reproductivas (concentraciones séricas de testosterona, volumen testicular y características seminales) en verano-otoño. A

pesar de que la presencia de hembras estimula la producción de testosterona en los machos, hasta el momento no ha sido estudiado si dicha presencia repercute en las características seminales.

8.2 Objetivos

Determinar si el contacto con hembras determina:

- una mayor concentración fecal de testosterona
- un aumento en peso corporal y perímetro del cuello
- un aumento en la coloración del pelaje
- aumento en el tamaño testicular, y en la proporción de parénquima
- una mayor sensibilidad a la electroeyaculación
- mejores características del semen fresco y luego de ser expuesto a diferentes diluyentes (calidad, total de espermatozoides en el eyaculado, porcentaje y total de espermatozoides vivos, porcentaje y total de espermatozoides móviles, porcentaje y total de espermatozoides móviles progresivos, porcentaje y total de espermatozoides con anomalías morfológicas y porcentaje y total de espermatozoides con funcionalidad de membrana normal)

8.3 Materiales & métodos

8.3.1 *Colecta, extracción y medición hormonal a partir de materia fecal*

Desde el 1 de octubre al 14 de mayo se colectó materia fecal de todos los machos de ambos grupos (en contacto con o aislados físicamente de hembras; ver *sección 5.1*) en forma semanal para medición de testosterona. La materia fecal fue colectada inmediatamente de que se observó la defecación, fue almacenada en bolsas plásticas, identificada y refrigerada a -20 °C hasta su procesamiento. A partir de cada muestra se realizó una extracción de testosterona en materia fecal mediante la técnica de doble extracción hormonal descrita previamente (ver Estudio II), y la medición de testosterona mediante RIA ¹²⁵I de fase sólida (Coat-A-Count TKTT, Siemens, Los Ángeles, CA, EEUU). Los coeficientes de variación intraensayo fueron 5,7 y 7,5 % para controles altos y bajos respectivamente, y el límite de detección fue 7,49 ng/dL. A partir de la concentración obtenida en 0,25 mg de materia fecal, se calculó la concentración por gramo de la misma (ng/g). Debido a que hubo un desperfecto eléctrico en la ECFA las muestras colectadas entre el 4 de febrero y el 17 de abril, permanecieron descongeladas por varias semanas, por lo que fueron descartadas.

8.3.2 *Manejo anestésico*

Los animales fueron capturados según la técnica descrita por Fumagalli et al. (2012). Sintéticamente, se les disparó un dardo (Telinject, California, EEUU), cargado con 1,6 mg/kg de ketamina al 5% (Vetanarcol, Laboratorios König, Buenos Aires, Argentina), 0,2 mg/kg de xilacina al 10% (Sedomin, Laboratorios König, Buenos Aires, Argentina) y 0,013 mg/kg de atropina al 1‰ (Sulfato de Atropina, Laboratorio Ion, Montevideo, Uruguay) con una cerbatana. Luego que los animales estuvieron bajo el efecto de la anestesia fueron trasladados a la sala veterinaria, donde se realizó la extracción de semen y la obtención de la información relacionada a las restantes variables consideradas. Los individuos permanecieron en decúbito lateral sobre una camilla, y sus signos vitales fueron controlados (frecuencia cardiaca, respiratoria, pulso y saturación sanguínea de oxígeno) durante toda la manipulación. Además, mediante un catéter colocado en la vena antebraquial se administró solución salina fisiológica (0,9 % de cloruro de sodio) en forma continua mientras el animal permaneció en la sala

veterinaria. Los animales fueron devueltos a su encierro una vez finalizada la toma de muestras, donde se les administró 0,25 mg/kg de clorhidrato de yohimbina al 1 % por vía intravenosa (Reverse, Laboratorio Vetcross, Montevideo, Uruguay) para revertir el efecto anestésico.

8.3.3 Morfometría

Estando el animal anestesiado y en decúbito lateral se registró su peso corporal, y se midió el perímetro de cuello. Se midió la circunferencia escrotal utilizando una cinta métrica, y el largo, ancho y profundidad de cada testículo se determinó mediante un calibre para calcular el volumen de cada testículo. El volumen testicular fue calculado utilizando la fórmula para un elipsoide ($V = L/2 \times A/2 \times P/2 \times 4\pi/3$). A partir del volumen de cada testículo se calculó el volumen testicular total. El índice gonado-somático fue calculado como la relación entre el volumen total de ambos testículos y el peso corporal.

8.3.4 Color del pelaje

En abril se determinó el color del pelaje utilizando un colorímetro (Minolta CR10, Minolta Camera Co, Osaka 541, Japón), utilizando las mismas variables que para el color de las astas (ver *sección 6.3.2*). Se consideraron los siguientes 9 puntos del cuerpo: zona dorsal (región de la cabeza entre las astas, entre ambas escápulas, límite tórax-abdomen, y en la grupa); lateral izquierdo (punto medio de la escápula, límite tórax-abdomen, y punto medio del muslo); y ventral (pecho, y ombligo).

8.3.5 Ecografía Testicular

En abril, se realizó ultrasonografía en modo B de ambos testículos utilizando un ecógrafo (Veterinary Ultrasound Scanner WED 9618v, Shenzhen Welld Medical Electronics Co. Ltda., Shenzhen, China) equipado con una sonda de 7,5 Mhz. Se obtuvo una imagen de ambos testículos de cada macho. Dichas imágenes ecográficas fueron almacenadas, y posteriormente analizadas utilizando un software (Image Proplus 3.01, Media Cybernetics, EEUU) para cuantificar los píxeles. En cada imagen se midieron seis puntos de 0,5 cm de diámetro, tres por encima y tres por debajo del mediastino testicular, denominándolos correlativamente del 1 al 6 (de izquierda a derecha y de arriba abajo) (Figura 6). Los puntos

fueron ubicados a una distancia similar entre ellos, intentando cubrir un área representativa del total de la superficie testicular observada en la imagen.

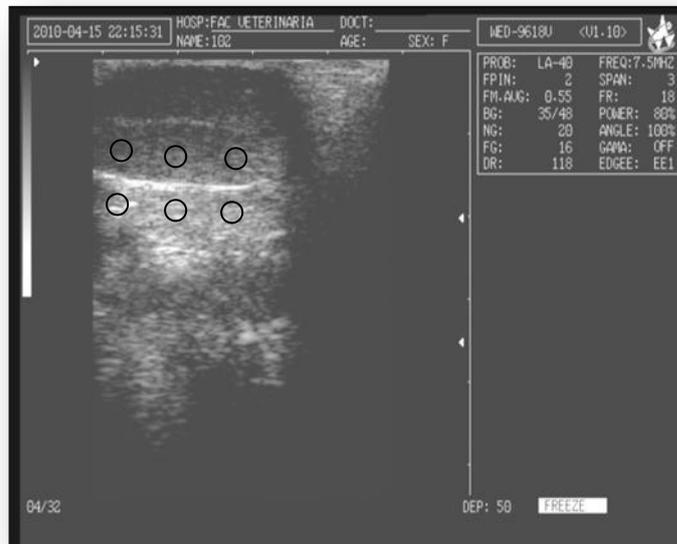


Figura 6. Ecografía de un testículo de macho de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Los círculos corresponden a ejemplos de los lugares utilizados para medir la intensidad de píxeles.

8.3.6 Electroeyaculación

La obtención de semen fue realizada en dos ocasiones utilizando un electroeyaculador (noviembre: P-T Electronic, modelo 303, Oregon, EEUU; abril: Fuhijira Industry, Tokyo, Japón) equipado con un vástago (noviembre: 24 x 1,5 cm con 4 electrodos longitudinales de 4 cm de largo; abril: 30 x 1,5 cm con 4 electrodos circulares de 1 cm de ancho). La estimulación eléctrica consistió en 10 pulsos de 3-5 segundos de duración para cada voltaje, comenzando en 1 v y aumentando en forma creciente hasta un máximo de 4 v. En cada caso, el voltaje en que comenzó la eyaculación fue registrado, lo que fue considerado como la sensibilidad a la electroeyaculación.

8.3.7 Evaluación seminal

Se obtuvo semen de todos los machos de ambos grupos en noviembre y abril. Se determinó el volumen eyaculado mediante una micropipeta (Gilson P5000, Valle del Oise, Francia). Se evaluó la calidad seminal (escala de 1-5), el porcentaje de espermatozoides

móviles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva utilizando un microscopio óptico con contraste de fase a 400x (Nikon Eclipse E200, Shanghai, China) (Evans & Maxwell, 1990). Se determinó la concentración espermática (espermatozoides/mL), el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y el porcentaje de espermatozoides con integridad acrosómica (clasificándolo en integro, dañado y perdido) en muestras de 5 μ L de semen fijadas con 45 μ L de glutaraldehído % 2 con buffer cacodilato % 2 (Noakes et al., 2001). Por otra parte, se determinó el porcentaje de espermatozoides con funcionalidad de membrana normal utilizando 10 μ L de semen, que fue evaluado a los 15 y 30 min de agregar 100 μ L de solución HOS (Jeyendran et al., 1984). A partir de la concentración y el volumen de semen eyaculado fue calculado el total de espermatozoides en el eyaculado. En base a éste último, se calculó el total de espermatozoides móviles, total de espermatozoides móviles progresivos, total de espermatozoides normales, total de espermatozoides con acrosoma normal, y total de espermatozoides con funcionalidad de membrana normal a los 15 y 30 min.

Dado que los diluyentes de semen pueden provocar alteraciones morfológicas y funcionales en el espermatozoide (Paulenz et al., 2002; Fernández-Santos et al., 2006), los mismos fueron utilizados como una forma indirecta de evaluar la resistencia espermática. Para ello se adicionó un diluyente diferente en ambos período de extracción: en noviembre FTG (Fructosa-Tris-Glicina) con el agregado de % 5 de glicerol y % 20 de yema de huevo, y en abril AndroMed (Minitüb GmbH & Co, Tiefenbach, Alemania). Luego de agregado el diluyente, el semen fue mantenido en baño maría a 37°C durante aproximadamente 30 min para su estabilización, siendo evaluada posteriormente la calidad seminal, el porcentaje de espermatozoides móviles, porcentaje de espermatozoides normales, porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, e integridad acrosómica.

8.3.8 *Análisis estadístico*

Se testó la normalidad de los datos correspondientes a cada variable considerada, comparando luego los datos de machos con o sin hembras. El voltaje en que ocurrió la eyaculación, y las siguientes variables seminales fueron normalizadas a partir de una transformación logarítmica: total de espermatozoides eyaculados, total de espermatozoides móviles, total de espermatozoides móviles progresivos, total de espermatozoides normales, total de espermatozoides con acrosoma normal, dañado y perdido, total de espermatozoides con funcionalidad de membrana normal a los 15 y 30 minutos, porcentaje de espermatozoides

con acrosoma normal y porcentaje de espermatozoides normales (FTG 20 % yema de huevo). Las variables seminales, morfológicas, voltaje de eyaculación, color del pelaje y número de pixeles registrados por ecografía en cada uno de los seis puntos de ambos testículos fueron comparadas mediante test t de student. La curva de concentración de testosterona, y el intervalo de tiempo en que se supondría que podría haber mayores diferencias (período en que la concentración de testosterona aumenta: 30 de diciembre al 29 de enero), fueron comparados por ANOVA para mediciones repetidas. Todas las variables se presentan como media \pm EE.

8.4 Resultados

8.4.1 Testosterona fecal

La concentración de testosterona fecal varió a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$), tendiendo además a ser mayor en machos en contacto con hembras que en machos alojados solos ($p = 0,07$; Figura 7). Por otra parte, durante el período en que se previó que las concentraciones de testosterona se encontrarían aumentando –entre el 30 de diciembre y el 29 de enero–, los machos con hembras presentaron mayores concentraciones de testosterona fecal que los machos solos ($p = 0,04$).

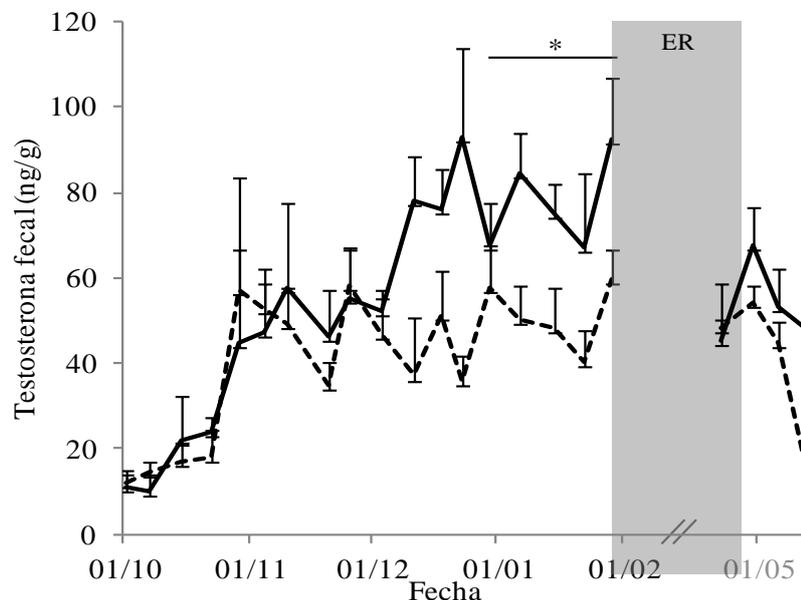


Figura 7. Concentración de testosterona en materia fecal, colectada semanalmente (1 de octubre-4 de febrero y 17 de abril-14 de mayo) a partir de machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) en semicautiverio, alojados con (—) o sin (---) hembras.

Expresado como ng/g de materia fecal (media \pm EE). ER corresponde a la estación reproductiva. * corresponde al periodo en que se observaron diferencias entre grupos ($p < 0,05$).

8.4.2 Morfometría

No se observaron diferencias en ninguna de las variables morfológicas consideradas, siendo el promedio general en noviembre y abril: peso corporal ($27,6 \pm 0,8$ kg y $26,2 \pm 1,2$ kg respectivamente), perímetro de cuello ($35,2 \pm 1,0$ cm y $39,8 \pm 1,4$ cm respectivamente), circunferencia escrotal ($10,6 \pm 0,3$ cm y $12,8 \pm 0,5$ cm respectivamente), volumen testicular ($6,3 \pm 0,5$ cm³ y $9,9 \pm 0,6$ cm³ respectivamente), e índice gonado-somático ($0,23 \pm 0,02$ y $0,38 \pm 0,03$ respectivamente).

8.4.3 Color del pelaje

La coloración del pelaje de machos alojados con y sin hembras se presenta en la Tabla 3. Los machos alojados con hembras presentaron más blanco y amarillo en la zona de la cabeza entre las astas (mayor L*; p= 0,04 y mayor b*; p= 0,03 respectivamente), y más amarillo en la zona dorsal del límite tórax-abdomen (mayor b*; p= 0,04), de la grupa (p= 0,004), y punto medio del muslo (p= 0,04). Por otra parte los machos sin contacto directo con hembras presentaron la zona dorsal del límite tórax-abdomen y de la grupa más rojizo (mayor a*; p= 0,05 y 0,01 respectivamente) que los machos alojados con hembras. Además, la zona lateral del límite tórax-abdomen tendió a ser más roja (mayor a*; p= 0,09) y la zona ventral del pecho más blanca (mayor L*; p= 0,06) y rojiza (mayor a*; p= 0,07) que los machos con hembras.

Tabla 3. Medidas de los parámetros de color L*, a* y b* según las recomendaciones de CIE (1976) en la zona dorsal, lateral y ventral del cuerpo de machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) que estuvieron en contacto permanente con hembras o aislados físicamente de ellas (media \pm EE).

Parámetro de color	Zona medida	Contacto con hembras	Aislados de hembras	p
L*	Zona entre las astas	36,02 \pm 1,60	31,57 \pm 0,71	0,04
	Entre ambas escápulas	37,54 \pm 0,59	36,45 \pm 2,08	ns
	Dorsal del límite tórax-abdomen	38,56 \pm 2,11	36,45 \pm 2,21	ns
	Dorsal de la grupa	38,60 \pm 1,26	35,45 \pm 2,24	ns
	Punto medio de la escápula	51,48 \pm 0,85	50,90 \pm 1,06	ns
	Lateral del límite tórax-abdomen	53,72 \pm 2,74	54,45 \pm 1,33	ns
	Punto medio del muslo	52,82 \pm 0,94	54,08 \pm 2,25	ns
	Ventral del pecho	78,72 \pm 4,84	88,02 \pm 1,64	0,06
	Ombliigo	88,00 \pm 2,39	92,05 \pm 0,83	ns
a*	Zona entre las astas	2,67 \pm 2,33	6,13 \pm 0,23	ns
	Entre ambas escápulas	5,8 \pm 0,61	6,7 \pm 0,34	ns
	Dorsal del límite tórax-abdomen	3,04 \pm 0,58	4,52 \pm 0,5	0,05
	Dorsal de la grupa	2,74 \pm 0,52	4,82 \pm 0,17	0,01
	Punto medio de la escápula	5,80 \pm 0,61	6,75 \pm 0,34	ns
	Lateral del límite tórax-abdomen	7,02 \pm 0,45	7,80 \pm 0,29	0,09
	Punto medio del muslo	6,16 \pm 0,67	7,25 \pm 0,54	ns
	Ventral del pecho	13,39 \pm 1,73	16,57 \pm 0,34	0,07
	Ombliigo	17,46 \pm 0,37	17,95 \pm 0,09	ns
b*	Zona entre las astas	17,65 \pm 1,73	12,17 \pm 0,11	0,03
	Entre ambas escápulas	20,60 \pm 1,08	18,58 \pm 1,68	ns
	Dorsal del límite tórax-abdomen	21,16 \pm 1,05	18,20 \pm 1,05	0,04
	Dorsal de la grupa	23,08 \pm 1,25	16,50 \pm 1,22	0,004
	Punto medio de la escápula	21,34 \pm 1,18	19,15 \pm 1,67	ns
	Lateral del límite tórax-abdomen	20,62 \pm 1,49	19,52 \pm 0,62	ns
	Punto medio del muslo	23,94 \pm 1,28	21,20 \pm 0,50	0,04
	Ventral del pecho	16,75 \pm 1,85	14,52 \pm 1,21	ns
	Ombliigo	12,54 \pm 1,47	12,80 \pm 0,29	ns

8.4.4 Ecografía testicular

El testículo derecho de los machos en contacto permanente con hembras presentó mayor intensidad de pixeles -más blanco- que el testículo derecho de machos aislados en el punto 1 ($132,0 \pm 14,1$ vs $102,0 \pm 7,7$ pixeles; $p= 0,05$), y una tendencia a ello en los puntos 2 ($131,9 \pm 13,4$ vs $104,0 \pm 6,2$ pixeles; $p= 0,06$), 3 ($127,2 \pm 9,4$ vs $100,7 \pm 7,4$ pixeles; $p= 0,07$), y 4 ($127,9 \pm 10,7$ vs $105,6 \pm 7,6$ pixeles; $p= 0,09$). La intensidad de pixeles de los 6 puntos medidos en el testículo izquierdo no fue diferente entre machos alojados con o sin hembras: 1 ($125,8 \pm 6,5$ pixeles), 2 ($123,2 \pm 4,9$ pixeles), 3 ($125,4 \pm 6,8$ pixeles), 4 ($113,9 \pm 10,7$ pixeles), 5 ($126,1 \pm 17,1$ pixeles), y 6 ($140,4 \pm 14,9$ pixeles).

8.4.5 Momento de eyaculación

El voltaje en que ocurrió la eyaculación noviembre y abril no fue diferente entre machos en contacto o aislados físicamente de hembras ($1,8 \pm 0,4$ volts y $2,2 \pm 0,3$ volts respectivamente).

8.4.6 Semen

En noviembre, los machos alojados con hembras presentaron mejor calidad seminal ($4,0 \pm 0,3$ vs $3,1 \pm 0,3$; $p= 0,03$), y mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva ($58,0 \pm 9,0$ vs $31,4 \pm 6,2$ %; $p= 0,02$) que los machos alojados solos. Además, el porcentaje de espermatozoides móviles tendió a ser mayor en los machos alojados con hembras ($72,0 \pm 6,6$ vs $57,7 \pm 8,0$ %; $p= 0,10$). Las restantes variables consideradas no fueron diferentes entre ambos grupos: concentración ($210,3 \pm 81,9 \times 10^6$ espermatozoides/ml), total de espermatozoides eyaculados ($98,3 \pm 45,9 \times 10^6$ espermatozoides), total de espermatozoides móviles ($67,8 \pm 33,3 \times 10^6$ espermatozoides), total de espermatozoides móviles progresivos ($51,1 \pm 24,9 \times 10^6$ espermatozoides), porcentaje y total de espermatozoides normales ($21,9 \pm 2,9$ % y $26,0 \pm 13,0 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides con funcionalidad de membrana normal evaluada a los 15 min ($72,9 \pm 2,7$ % y $76,1 \pm 38,0 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides con funcionalidad de membrana normal evaluada a los 30 min ($73,7 \pm 2,8$ % y $76,0 \pm 37,5 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides con acrosoma

normal ($69,6 \pm 3,2$ % y $71,0 \pm 31,7 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides con acrosoma dañado ($25,7 \pm 2,9$ % y $21,4 \pm 11,2 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), y porcentaje y total de espermatozoides con acrosoma perdido ($4,6 \pm 0,6$ % y $5,8 \pm 3,7 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente).

Por otra parte, el semen de machos alojados con hembras, luego de ser expuesto al diluyente FTG con 20 % de yema de huevo, presentó mayor calidad ($p= 0,04$), porcentaje de espermatozoides móviles ($p= 0,04$), porcentaje de espermatozoides móviles progresivos ($p= 0,01$), y porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal ($p= 0,03$; Tabla 4) que el de machos solos. Además, los machos alojados solos presentaron mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado ($p= 0,04$) y tendieron a presentar mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma perdido ($p= 0,09$; Tabla 4).

Durante abril no existieron diferencias entre grupos en ninguna de las variables evaluadas: calidad ($3,1 \pm 0,3$), concentración ($670,9 \pm 201,6 \times 10^6$ espermatozoides/ml), total de espermatozoides eyaculados ($321,9 \pm 118,6 \times 10^6$ espermatozoides), porcentaje y total de espermatozoides móviles ($64,4 \pm 6,3$ % y $229,8 \pm 99,4 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides móviles progresivos ($52,0 \pm 6,2$ % y $197,3 \pm 89,7 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides normales ($36,6 \pm 3,3$ % y $131,4 \pm 61,5 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides con funcionalidad de membrana normal evaluada a los 15 min ($89,3 \pm 1,6$ % y $275,6 \pm 95,5 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides con funcionalidad de membrana normal evaluada a los 30 min ($88,5 \pm 1,6$ % y $290,1 \pm 102,7 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides con acrosoma normal ($77,4 \pm 1,9$ % y $131,4 \pm 61,5 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente), porcentaje y total de espermatozoides con acrosoma dañado ($21,7 \pm 1,7$ % y $72,1 \pm 31,6 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente) y porcentaje y total de espermatozoides con acrosoma perdido ($0,9 \pm 0,3$ % y $4,2 \pm 1,7 \times 10^6$ espermatozoides respectivamente).

Luego de agregar el diluyente Andromed, el semen de machos con hembras presentó mayor porcentaje de acrosomas dañados ($p= 0,04$; Tabla 4). Por otra parte, el semen de machos solos tendió a poseer mayor porcentaje de acrosomas normales ($p= 0,07$; Tabla 4).

Tabla 4. Características seminales de machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) que se encontraban alojados con o sin contacto físico con hembras, luego de utilizar los diluyentes Fructosa-Tris-Glicina (FTG) con 20 % de yema de huevo y AndroMed.

Valores expresados como media \pm EE.

Diluyente	Parámetro	Contacto con hembras	Aislado de hembras	<i>p</i>
FTG 20 % yema de huevo	Calidad (1-5)	3,5 \pm 0,3	2,5 \pm 0,3	0,04
	Móviles (%)	66,0 \pm 7,5	43,3 \pm 8,3	0,04
	Móviles Progresivos (%)	50,0 \pm 9,5	20,0 \pm 7,2	0,01
	Normales (%)	25,4 \pm 9,9	30,3 \pm 5,0	ns
	Acrosomas íntegros (%)	71,0 \pm 3,6	62,2 \pm 2,5	0,03
	Acrosomas dañados (%)	24,4 \pm 3,6	32,5 \pm 2,2	0,04
	Acrosomas perdidos (%)	3,8 \pm 0,9	5,3 \pm 0,7	0,09
AndroMed	Calidad (1-5)	2,5 \pm 0,2	2,5 \pm 0,5	ns
	Móviles (%)	52,0 \pm 4,9	50,2 \pm 8,7	ns
	Móviles Progresivos (%)	41,6 \pm 2,7	42,2 \pm 8,9	ns
	Normales (%)	38,4 \pm 9,6	40,0 \pm 7,5	ns
	Acrosomas íntegros (%)	72,6 \pm 4,2	81,2 \pm 2,5	0,07
	Acrosomas dañados (%)	25,2 \pm 3,2	17,1 \pm 2,2	0,04
	Acrosomas perdidos (%)	2,2 \pm 1,1	1,4 \pm 0,6	ns

8.5 Discusión

Se confirma la hipótesis de que el contacto crónico con hembras estimula la actividad reproductiva de machos de venado de campo. Más aún, pese al bajo número de animales que fue posible utilizar, la mayor parte de las variables reproductivas registradas reflejaron este efecto. Ello implicó que los machos en contacto con hembras tuvieran mayor producción de testosterona, mejores características seminales, mayor proporción de parénquima testicular y diferente coloración del pelaje que los machos alojados aislados de hembras. Estos resultados coinciden con que durante la estación reproductiva, carneros adultos que permanecen con hembras poseen testículos más grandes, mayores concentraciones de testosterona, y despliegan mayor comportamiento sexual y agresivo que aquellos alojados sólo con otros machos (Illius et al., 1976). Aunque debido a las condiciones en que se realizó el trabajo no fue posible medirlo, las diferencias observadas en la concentración de testosterona entre ambos grupos probablemente se vinculen con un aumento en la frecuencia y concentración de LH que inducen las hembras (González et al., 1988a; 1989; Ungerfeld & Silva, 2004). Probablemente la mayor producción de testosterona de los machos alojados con hembras favoreció un mayor desarrollo del parénquima testicular, y de la espermatogénesis (Haigh et al., 1984; Blottner et al., 1996), todo lo que llevó a que presentaran mejores características seminales. En este sentido, el contacto directo con hembras generó una respuesta endócrina de los machos, lo que probablemente afectó las características morfológicas y fisiológicas de los mismos.

Dado que la distancia entre el encierro en que se alojaban los machos solos y el más cercano en que se alojaban hembras fue de unos pocos metros, probablemente estos machos igual fueron estimulados por señales visuales, químicas y auditivas provenientes de las hembras. Pese a ello existieron diferencias entre ambos grupos de machos, por lo que estas señales no sustituyeron al estímulo producido por el contacto directo. En vida libre el venado de campo forma grupos de aproximadamente 7 individuos, con una relación de machos y hembras de 0,61, y con un sistema de apareamiento sugerido de tipo poligínico (Cosse, 2010). Aunque los grupos cuentan con varios machos, quizás solo los de alto rango jerárquico acceden a las hembras (Cosse, 2010). Si esto ocurriera, podría existir diferente intensidad de contacto físico con las hembras entre los machos de un grupo. En ese caso, los machos de

venado de campo en vida libre podrían presentar diferencias reproductivas similares a las observadas en el presente trabajo.

El estímulo de la presencia de hembras determinó que al inicio de la estación reproductiva –noviembre–, los machos presentaran globalmente mejores características reproductivas. Más adelante, durante la estación reproductiva los machos alojados con hembras presentaron mayores concentraciones de testosterona fecal. En abril las diferencias a favor de los machos en contacto con hembras fueron más sutiles que en noviembre. Esto podría deberse a que a lo largo del período noviembre-abril la proporción de hembras ciclando probablemente fue disminuyendo debido a que muchas de ellas hubieran quedado preñadas. Esto habría determinado una disminución de la intensidad de las señales estimuladoras por parte de las hembras, lo que habría redundado en la disminución de la intensidad de los efectos de la presencia de las hembras a lo largo de la estación reproductiva.

La estimulación producida por la presencia de hembras indujo a los machos a producir mejores características seminales en el período previo a la estación reproductiva, adelantándose así al momento en que probablemente ocurren la mayor proporción de cópulas (Morales-Piñeyrúa, 2010). Si bien la concentración de testosterona en ese período no difirió entre grupos, el pequeño número de individuos utilizados no permite descartar que existieran diferencias y que éstas no fueran detectadas. Además, pequeños cambios en la concentración de testosterona son capaces de producir cambios importantes en la producción espermática (Sun et al., 1990). Las diferencias seminales observadas en noviembre podrían relacionarse con pequeñas diferencias en la concentración de testosterona de ambos grupos, las que más adelante alcanzaron significancia estadística. Por otra parte en abril no se observaron diferencias seminales entre grupos. Sin embargo estas muestras fueron obtenidas luego del período de mayor actividad sexual de los machos, lo que podría haber producido una depleción seminal. Por lo tanto estos resultados deben ser considerados con cautela.

En este trabajo se describió por primera vez la ecogenicidad testicular de machos de venado de campo, la que fue algo menor que la de carneros adultos en estación reproductiva (Ungerfeld & Fila, 2011a). El contacto directo con hembras produjo cambios en la estructura del testículo, lo que se evidenció en la ecogenicidad testicular de los machos de venado de campo. Carneros expuestos durante 20 minutos a hembras en celo en forma aguda disminuyeron en forma aguda su ecogenicidad testicular (Ungerfeld & Fila, 2011b), lo que se

asocia con un aumento de líquido en el testículo (Ungerfeld & Fila, 2011a). Por otra parte, la concentración de testosterona se relaciona positivamente con el tamaño testicular de carneros (Lincoln & Short, 1980), con cambios en las proporciones y número de células de la línea germinal, lo que resulta en un aumento del grosor de la pared de los túbulos seminíferos (Lincoln, 1971; Loudon & Curlewis, 1988). Ya que la estimulación con hembras del presente trabajo fue crónica, la mayor producción de testosterona podría haber estimulado la espermatogénesis, resultando en un mayor número de células, un menor diámetro de la luz de los túbulos, y una menor proporción de líquido en los testículos de machos de venado de campo. Esto podría explicar las diferencias observadas en la ecogenicidad testicular de ambos grupos de machos. Estas diferencias fueron observadas en abril, incluso cuando probablemente gran parte de las montas ya ocurrieron (Morales-Piñeyrúa, 2010). En este sentido, la diferente ecogenicidad testicular observada apoyaría la idea de que, aunque no fueron detectadas, en abril hubieran podido existir diferencias seminales entre grupos si no hubiera permitido la monta. Por lo tanto, las diferencias observadas en la estructura testicular en abril y en el semen obtenido en noviembre podrían indicar que tanto al inicio como al final de la estación reproductiva existieran diferencias en la reproducción entre machos alojados con o sin hembras.

Coincidentemente con las otras características mencionadas anteriormente, la presencia permanente de hembras estimuló cambios en coloración del pelaje de los machos constatada a través de una medición objetiva. En forma sintética, se puede afirmar que el pelaje de machos alojados con hembras fue más amarillento (mayor b^*), mientras que el de machos sin contacto directo con estas fue más rojizo (mayor a^*). Sin embargo, no es posible afirmar que el pelaje de los machos alojados con hembras fue más oscuro (menor L^*). La actividad melanogénica y de las glándulas cutáneas es altamente influida por la testosterona (Ebling, 1972; Atkeson & Marchinton, 1982; Bubenik & Bubenik, 1985). Por otra parte, el oscurecimiento del pelaje de machos de ciervos y otros artiodáctilos ha sido interpretado como una señal visual para demostrar su capacidad reproductiva (Bubenik & Bubenik, 1985; Caro, 2005). En este sentido, los machos de antílope puku (*Kobus vardonii*) con el pelaje del cuello más oscuro son preferidos por las hembras para reproducirse (Balmford et al., 1992). En venado de campo no se observan cambios claros en la coloración del pelaje como ocurre en otros ciervos (Bubenik & Bubenik, 1985). Sin embargo, las diferencias observadas en la coloración de los machos del presente trabajo podrían vincularse con las diferencias en la

concentración de testosterona. En función de esto resulta interesante especular que estos cambios de coloración podrían constituir una señal visual dirigida hacia las hembras.

Al desafiar el semen con un diluyente fue posible observar otras diferencias no detectadas en el semen fresco. En noviembre, al usar un diluyente con 20 % de yema de huevo, se observó una mayor integridad acrosómica en los machos alojados con hembras. En ciervo rojo se reportó una menor integridad acrosómica cuando se utilizaron diluyentes conteniendo yema de huevo en comparación con otros sin este agregado (Fernández-Santos et al., 2006). La yema de huevo, ampliamente utilizada en diluyentes de semen por su efecto crioprotector, induce sin embargo la capacitación espermática (Ijaz et al., 1989) y una desestabilización de la membrana acrosómica, resultando en un mayor número de espermatozoides con acrosomas dañados (Watson y Martin, 1973; Aboagla & Terada, 2004). Por lo tanto, la menor reducción de la integridad acrosómica observada en el semen de machos con hembras podría vincularse con una mayor resistencia de la membrana acrosómica de los espermatozoides de estos machos.

Por otra parte en abril, y pese a que el diluyente utilizado no contenía yema de huevo, los machos alojados solos presentaron mayor integridad acrosómica. Considerando que el período de mayor cantidad de celos de las hembras de venado de campo es de febrero a mayo (Morales-Piñeyrúa, 2010), probablemente en abril ya ocurrieron numerosas montas. El porcentaje de espermatozoides anormales en el eyaculado de carneros aumenta como consecuencia de una mayor frecuencia de eyaculaciones (Kaya et al., 2002). En este sentido, un menor tiempo de permanencia de los espermatozoides en el epidídimo debido a una alta frecuencia de montas de los machos con hembras podría reducir el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales en el eyaculado. Esto también podría explicar por qué no se mantuvieron las diferencias en la integridad acrosómica entre grupos observadas en noviembre.

Ninguna de las medidas testiculares y corporales consideradas fue diferente entre grupos en ninguno de los periodos de muestreo. Las mismas estuvieron dentro de los rangos reportados previamente en machos de la ECFA durante el mismo período del año (Ungerfeld et al., 2011), aunque fueron algo menores que las descritas en poblaciones silvestres (Jackson, 1987). Los ciervos con un alto grado de poliginia poseen gran dimorfismo sexual, siendo los machos fuertemente seleccionados a favor de poseer un gran tamaño corporal, y de

las astas (Clutton-Brock et al., 1982). Además, en especies en que las hembras copulan con varios machos, estos poseen mayor tamaño testicular y eyaculan un volumen de semen mayor, como una estrategia de competencia espermática (cervidos: Clutton-Brock et al., 1982; primates: Harvey & Harcourt, 1984). Este tipo de estrategias serían poco frecuentes en las especies de ciervos en que los machos montan guardia a una hembra en celo por varios días, evitando así la monta de otro macho (Clutton-Brock et al., 1982). Este comportamiento ha sido descrito en venado de campo (Morales-Piñeyrúa, 2010), siendo que el sistema de apareamiento predominante es poligínico, formando pequeños grupos mixtos (Cosse, 2010). Esto coincide además con un reducido dimorfismo sexual, pequeño tamaño corporal, testicular, volumen eyaculado, y pequeño tamaño y complejidad de las astas del venado de campo. En síntesis, la ausencia de diferencias morfométricas halladas en este trabajo podría relacionarse con que los machos de venado de campo son poco seleccionados a favor de desarrollar gran tamaño corporal, y testicular, lo que limitaría su capacidad de respuesta frente a estímulos sociales como la presencia de hembras.

Las diferencias en la ecogenicidad testicular entre ambos grupos fueron observadas sólo en el testículo derecho. A partir de estudios anatómicos del tracto reproductivo de machos y hembras del venado de campo, Pérez (2012) determinó que los testículos derechos son de mayor tamaño que los izquierdos. Además, este autor observó que el ovario derecho de las hembras tiende a pesar más que el izquierdo, y el cuerpo lúteo siempre se encontró del lado derecho. En ovejas se reportó una mayor frecuencia de ovulación del ovario derecho (Casida et al., 1966), y de gestación en el cuerno derecho (Erdheim, 1942; Settergreen & Galloway, 1965). Incluso en humanos la frecuencia de ovulación es mayor del lado derecho, y los ovocitos provenientes de este ovario poseen mayor fertilidad potencial que los del ovario izquierdo (Fukuda et al., 2000). Por tanto, que las diferencias ecográficas determinadas en el presente trabajo hayan sido observadas solamente en el testículo derecho podría relacionarse con una mayor actividad de este testículo. Aunque sin una explicación funcional para estas diferencias, resulta interesante resaltar la coincidencia entre ambos sexos y entre diferentes especies.

8.6 Conclusiones

- El contacto directo con hembras estimuló la actividad reproductiva de machos de venado de campo.
- Ello se reflejó en un aumento de la producción de testosterona durante el período de mayores concentraciones hormonales, una mejora de las características seminales previo a la estación reproductiva, una mayor proporción de parénquima testicular, y una coloración del pelaje más amarillento en varias regiones del cuerpo de machos de venado de campo.
- Las características morfológicas y la sensibilidad de respuesta a la electroeyaculación de los machos no fue modificado por el contacto con hembras.

9. Discusión general

Se determinó que la presencia de hembras promovió el desarrollo y un aumento en la intensidad del color de las astas (Estudio I), lo que probablemente se vincule con la mayor concentración de testosterona observada en estos animales (Estudio III). Además, el efecto de una mayor concentración de testosterona durante un período prolongado se reflejó en una mayor proporción de parénquima testicular, la que desafortunadamente sólo fue determinada en abril, al final de la estación reproductiva. Sin embargo, las mejores características seminales de los machos con hembras al principio de la estación reproductiva podrían sugerir que estas diferencias en la estructura testicular también existieron en ese momento. Malo et al. (2005) determinaron que el tamaño y complejidad de las astas de machos de ciervo rojo constituye una señal honesta del tamaño testicular, la producción seminal, y la velocidad espermática. En este sentido, machos con astas de mayor tamaño y complejidad producirían semen con mejores condiciones para competir dentro del tracto reproductivo femenino con el de otros machos, y serían capaces de evitar la depleción seminal producida por las sucesivas montas a lo largo de la estación reproductiva (Malo et al., 2005). Según los autores, las hembras podrían seleccionar los machos con astas de mayor tamaño y complejidad como una forma indirecta de seleccionar mejores condiciones reproductivas. A partir de esto, resulta interesante especular con que exista una vinculación similar a la descrita en ciervo rojo entre las diferencias observadas en las astas (Estudio I) y las mejores características seminales (Estudio III). Sin embargo, debe considerarse que las astas de ciervo rojo son un caso extremo del tamaño de características sexuales secundarias, mientras que las astas de venado de campo son estructuras proporcionalmente más pequeñas.

La mayor parte de la información sobre el “efecto hembra” en rumiantes describe efectos agudos de la exposición a hembras, como aumentos en las concentraciones de hormonas reproductivas (Illius et al., 1976; González et al., 1988a; b). Sin embargo, diferencias observadas en este trabajo involucran estructuras de lento desarrollo (espermatogénesis, estructura de las astas), lo que indicaría que el alojamiento permanente con hembras constituyó un estímulo crónico y sostenido en el tiempo sobre la reproducción de los machos de venado de campo. Por lo tanto, este estímulo resultó en que los machos que estuvieron en contacto directo con hembras, alcanzaran la estación reproductiva con mejores características reproductivas.

Es interesante destacar que, la disposición de los encierros en que se encontraban los animales no impidió que los machos alojados solos recibieran estímulos auditivos, visuales y olfativos de las hembras. El estímulo de observar a un macho montando una hembra es suficiente para que un carnero presente una respuesta endócrina (Yarney & Sanford, 1983). Sin embargo, otros trabajos afirman que una separación de 30 cm de las hembras sería suficiente para que los machos no presenten una respuesta endócrina (González et al., 1988b). En el presente trabajo, no es posible descartar que la reproducción de los machos alojados solos no fue estimulada por la presencia de hembras. Sin embargo, ya que igual los machos alojados con hembras presentaron mejores características reproductivas, y considerando el bajo número de animales utilizado, es posible afirmar que el contacto directo con hembras es un estímulo de suficiente intensidad como para no ser compensado por las otras vías de comunicación.

10. Conclusiones generales

- El contacto directo con hembras estimuló que machos de venado de campo desarrollaran astas más pesadas, de mayor tamaño, más oscuras, y posiblemente retrasó su fecha de caída.
- La presencia de hembras estimuló una mayor producción de testosterona, mayor proporción de parénquima testicular, mejoró la calidad seminal, y produjo un pelaje más amarillento.
- Se comprobó que mediante una técnica de doble extracción de hormonas en materia fecal es posible extraer una cantidad mayor a la obtenida mediante una única extracción. Sin embargo ésta última permitió predecir con alta probabilidad la concentración final de la doble extracción.

11. Bibliografía

Aboagla EME, Terada T (2004) Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1160-1172.

Adams CA, Bowyer RT, Rowell JE, Hauer WE, Jenks JA (2001) Scent marking by male caribou: an experimental test of rubbing behavior. *Rangifer* 21: 21-27.

Aguirre V, Orihuela A, Vázquez R (2011) Effects of vaginal mucus from ewes in estrus on the sexual drive and semen characteristics of hair rams (*Ovis aries*). *Journal of Veterinary Behavior* 6: 239-242.

Asher GW, Berg DK, Evans G (2000) Storage of semen and artificial insemination in deer. *Animal Reproduction Science* 62: 195-211.

Atkeson TD, Marchinton RL (1982) Foreheads in white-tailed deer. School of Forest Resource, University of Georgia, Athens.

Baker PJ, Pakarinen P, Huhtaniemi IT, Abel MH, Harlton HM, Kumar TR, O'shaughnessy PJ (2003) Failure of normal Leydig cell development in Follicle-Stimulating Hormone (FSH) receptor-deficient mice, but not FSH β -deficient mice: role for constitutive FSH receptor activity. *Endocrinology* 144: 138-145.

Balmford A, Rosser AM, Albon SD (1992) Correlates of female choice in resource-defending antelope. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 31: 107-114.

Bartoš L, Bahbouh R (2006) Antler size and fluctuating asymmetry in red deer (*Cervus elaphus*) stags and probability of becoming a harem holder in rut. *Biological Journal of Linnean Society* 87: 59-68.

Blissitt MJ, Bland KP, Cottrell DF (1990) Discrimination between the odours of fresh oestrous and non-oestrous ewe urine by rams. *Applied Animal Behaviour Science* 25: 51-59.

Blissitt MJ, Bland KP, Cottrell DF (1994) Detection of oestrous-related odour in ewe urine by rams. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 189-191.

Blottner S, Hingst O, Meyer HHD (1996). Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 108: 299-305.

Boitani C, Politi MG, Menna T (1993) Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biology of Reproduction* 48: 761-767.

Bowyer RT, Stewart KM, Kie JG, Gasaway WC (2001) Fluctuating asymmetry in antlers of Alaskan moose: Size matters. *Journal of Mammalogy* 82: 814-824.

Bronson FH (1989) *Mammalian reproductive biology*. The University of Chicago Press. Chicago, EEUU. pp 325.

Brousset DM, Galindo F, Valdez RA, Romano M, Schuneman A (2005) Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Veterinaria México* 36: 327-337.

Bubenik AB (1966) *Das geweih*. Paul Parei Verlag, Hamburg, Germany. pp 164.

Bubenik GA (1990) The antler as a model in biomedical research. En: Bubenik Horns, pronghorns, and antlers. Evolution, morphology, physiology and social significance. Bubenik GA, Bubenik AB (Eds). Springer-Verlag, USA. pp 474-487.

Bubenik GA (1991) Regulatory mechanisms of the antler cycle and the selection of deer breeding stock by endocrine tests. En: *Wildlife Production-Conservation and Sustainable Development*. Renecker LA, Hudson RJ (Eds). AFES Misc. Publ. 91-6. Univ. of Alaska. Fairbanks. AK. EEUU. pp 521-529.

Bubenik AB (1992) Proposals for standardized nomenclature for bony appendices in Pecora. En: Antler development in Cervidae. Brown RD (Ed). Caesar Kleberg WI, Kingsville. pp 187-194.

Bubenik GA (2002) All you need to know about growing antlers: why, where, when and how they grow. Proc 3rd World Deer Farming Congr, Austin, TX, EEUU. pp 163-176.

Bubenik GA (2006) Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle- a review. Veterinarski Arhiv 76: 275-285.

Bubenik GA, Bubenik AB, Brown GM, Wilson DA (1975) The role of sex hormones in the growth of antler bone tissue. Journal of Experimental Zoology. 194: 349-358.

Bubenik GA, Bubenik AB (1985) Seasonal variations in hair pigmentation of white-tailed deer and their relationship to sexual activity and plasma testosterone. Journal of Experimental Zoology 235: 387-395.

Bubenik GA, Bubenik AB (1986) Phylogeny and ontogeny of antlers and neuro-endocrine regulation of the antler cycle- a review. Saeugetierkd Mitt 33: 97-123.

Bubenik GA, Schams D, Coenen G (1987) The effect of artificial photoperiodicity and antiandrogen treatment on the antler growth and plasma levels of LH, FSH, testosterone, prolactin and alkaline phosphatase in the male white-tailed deer. Comparative Biochemistry and Physiology 87: 551-559.

Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR (2003) Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. Endocrinology 144: 3722-3731.

Cabrera A (1943) Sobre la sistemática del venado de campo y su variación individual y geográfica. Revista Museo La Plata (Argentina) 3: 5-41.

Canabal M, Ungerfeld R (2011) Presencia de hembras y estructura interna de las astas de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). III Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal. Montevideo, Uruguay.

Caro T (2005) The adaptative significance of coloration in mammals. *BioScience* 55: 125-136.

Carrillo E, Tejada LM, Meza-Herrera CA, Arellano-Rodríguez G, García JE, De Santiago-Miramontes MA, Mellado M, Véliz FG (2011) Response of sexual inactive French Alpine bucks to the stimulus of goats in oestrus. *Livestock Science* 141: 202-206.

Casida LE, Woody CO, Pope AL (1966) Inequality in function of the right and left ovaries and uterine horns of the ewe. *Journal of Animal Science* 25: 1169-1171.

Chandolia RK, Bartlewski PM, Omeke BC, Beard AP, Nawlings NC, Pierson RA (1996) Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. *Theriogenology* 48: 99-117.

Christensen BW, Troedsson MHT, Young LJ, Oliva M, Penfold LM (2009) Effect of sociosexual environment on serum testosterone in captive male African rhinoceros. *Theriogenology* 71: 1105-1111.

CIE (1976) CIE, Commission Internationale de l'Éclairage, Colorimetry. Publication No 15, Bureau central CIE, Viena, Austria.

CITES (2012) Appendices I, II and III. Valid from 22 December 2011. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>

Clutton-Brock T, Guinness FE, Albon SD (1982) Red deer: Behavior and ecology of two sexes. University of Chicago. Chicago. EEUU. pp 378.

Cooke PS, Hess RA, Porcelli J, Meisami E (1991) Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology* 129: 244-248.

Cooke PS, Meisami E (1991) Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology* 129: 237-243.

Cosse M (2010) Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis*: Pautas para su conservación. Tesis de Doctorado. PEDECIBA, Montevideo, Uruguay.

Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 20: 358–417.

de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N (1998) Spermatogenesis. *Human reproduction* 13: 1-8.

Dehnhard M, Naidenko S, Frank A, Braun B, Göritz F, Jewgenow K (2008) Non-invasive monitoring of hormones: A tool to improve reproduction in captive breeding of the Eurasian Lynx. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 74-82.

Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR, Martin GB (2009) The “male effect” in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behavioural Brain Research* 200: 304-314.

Dellafiore CM, Demarúa M, Maceira N, Bucher E (2003) Distribution and abundance of the pampas deer in San Luis province, Argentina. *Journal of Neotropical Mammalogy* 10: 41-47.

Demarúa MR, McShea WJ, Koy K, Maceira NO (2003) Pampas deer conservation with respect to habitat loss and protected area considerations in San Luis, Argentina. *Biological Conservation* 115: 121-130.

Ditchkoff SS, Lochmiller RL, Masters RE, Starry WR, Leslie Jr DM (2001) Does fluctuating asymmetry of antlers in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) follow patterns predicted for sexually selected traits? *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 891-898.

dos Santos-Zanetti E, Furlan-Polegato B, Barbanti-Duarte M (2010) Comparison of two methods of synchronization of estrus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Animal Reproduction Science* 117: 266-274.

Ebling FJ (1972) The response of the cutaneous glands to steroids. *General and Comparative Endocrinology Supplement 3*: 228-237.

El Shennawy A, Gates RJ, Russell LD (1998) Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: cell viability after hormonal replacement in adults after intermediate periods of hypophysectomy. *Journal of Andrology 19*: 320-334.

Eldon J (1993) Effect of exogenous melatonin and exposure to a ram on the time of onset and duration of the breeding season in icelandic sheep. *Journal of Reproduction and Fertility 99*: 1-6.

Erdheim M (1942) The incidence of right and left horn pregnancies in dairy and beef cattle. *Journal of the American Veterinary Medicine Association 100*: 343-344.

Evans G, Maxwell WMC (1990) Steven Salamon Inseminación artificial de ovejas y cabras. Acribia, Zaragoza. España. pp 191.

Fennessy PF, Asher GW, Beatson NS, Dixon TE, Hunter JW, Bringans MJ (1994) Embryo transfer in deer. *Theriogenology 41*: 133-138.

Fernández-Santos M, Estes M, Soler A, Montoro V, Garde J (2006) Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals 41*: 114–118.

Fourie PJ, Schwalbach LM, Naser FWC, Greyling JPC (2005) Relationship between body measurements and serum testosterone levels of Dorper rams. *Small Ruminant Research 56*: 45-80.

Fraguas-Versiani N, García-Pereira RJ, Barbanti-Duarte JM (2009) Annual variations in fecal androgen metabolites and antler cycle of captive red brocket bucks (*Mazama amaericana*) in southeast Brazil. *European Journal of Wildlife Research 55*: 535-538.

Fukuda M, Fukuda K, Andersen CY, Byskov AG (2000) Right side ovulation favours pregnancy more than left side ovulation. *Human Reproduction* 15: 1921-1926.

Fumagalli F, Villagrán M, Damián JP, Ungerfeld R (2012) Physiological and biochemical parameters in response to electroejaculation in adult and yearling anesthetized pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 308-312.

García-Pereira RJ, Barbanti-Duarte JM, Negrão JA (2005) Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Theriogenology* 63: 2113-2125.

García-Pereira RJ, Barbanti-Duarte JM, Negrão JA (2006) Effects of environmental conditions, human activity, reproduction, antler cycle and grouping on fecal glucocorticoids of free-ranging pampas deer stags (*Ozotoceros bezoarticus*). *Hormones and Behavior* 49: 114–122.

García AJ, Ortiz N, Peña E, López A, Landete-Castillejos T, Albiñana B, Garde JJ, Gallego L (1998) Protocolo anestésico para la inseminación artificial intrauterina mediante laparoscopia de ciervas ibéricas. *Galemys* 10: 75-88.

Gaspar-López E, Landete-Castillejos T, Estevez JA, Ceacero F, Gallego L, García AJ (2010) Biometrics, testosterone, cortisol and antler growth cycle in Iberian red deer stags (*Cervus elaphus hispanicus*). *Reproduction in Domestic Animals* 45: 243-249.

Ghosal R, Sukumar R, Seshagiri PB (2010) Prediction of estrus cyclicity in Asian elephants (*Elephas maximus*) through estimation of fecal progesterone metabolite: development of an enzyme-linked immuno-sorbent assay. *Theriogenology* 73: 1051-1060.

Giménez-Dixon M (1987) La conservación del venado de campo. Ministerio de Asuntos Agrarios. Dirección de Recursos Naturales y Ecología. Departamento Flora y Parques Provinciales. pp 24.

González S (1997) Análisis de la variabilidad morfológica y genética del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) y sus consecuencias para la conservación. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. PEDECIBA, Uruguay.

González-Pensado S (2011) Estacionalidad reproductiva en machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) adultos y juveniles. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. PEDECIBA, Uruguay.

González S, Alvarez-Valín F, Maldonado JE (2002) Morphometric differentiation of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with descriptions of new subspecies from Uruguay. *Journal of Mammalogy* 83: 1127-1140.

González S, Cosse M, Goss-Braga F, Vila AR, Merino ML, Dellafiore C, Cartes JL, Maffei L, Giménez-Dixon M (2010) Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) En: *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Barbanti-Duarte JM, González S (Eds) FUNEPIUCN, San Pablo, Brasil. pp 119-131.

González R, Levy R, Orguer P, Poindron P, Signoret JP (1991a) Female effect in sheep II: Role of volatile substances from sexually receptive females, implications of the sense of smell. *Reproduction Nutrition Development* 31: 103-109.

González S, Maldonado G, Leonard JA, Vila C, Barbanti-Duarte JM, Merina M, Brum-Zorrilla N, Wayne RK (1998) Conservation genetics of the endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) *Molecular Ecology* 7: 47-56.

González R, Orgeur P, Poindron P, Signoret JP (1989) Seasonal Variation in LH and testosterone responses of rams following the introduction of oestrous ewes. *Animal Reproduction Science* 21: 249-259.

González R, Orgeur P, Poindron P, Signoret JP (1991b) Female effect in sheep I. The effects of sexual receptivity of females and the sexual experience of rams. *Reproduction Nutrition Development* 31: 97-102.

González R, Orgeur P, Signoret JP (1988b) Luteinizing hormone, testosterone and cortisol responses in rams upon presentation of estrous females in the nonbreeding season. *Theriogenology* 30: 1075-1086.

González-Bulnes A, Pallares P, Vazquez MI (2010) Ultrasonographic Imaging in small ruminant reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 9-20.

González R, Poindron P, Signoret JP (1988a) Temporal variation in LH and testosterone responses of rams after the introduction of oestrous females during the breeding season. *Journal of Reproduction and Fertility* 83: 201-208.

Goldman BD (2001) Mammalian Photoperiodic Sistem: Formal Properties and Neuroendocrine Mechanisms of Photoperiodic Time Measurement. *Journal of Biological Rhythms* 16: 283-301.

Goodman RL (1994) Neuroendocrine control of the ovine cycle. En: Knobil and Neill's physiology of reproduction. Vol 2. 2a ed. Knobil E, Neill JD (Eds). Raven Pres. New York, EEUU. pp 1919-1969.

Goss-Braga (1999) Redescoberta do veado-campeiro, *Ozotoceros bezoarticus*, no estado do Paraná-Brasil. En: II Taller de Cérvidos del Uruguay. Mayo, Montevideo, Uruguay.

Graham L, Schwarzenberger F, Möstl E, Galama W, Savage A (2001) A versatile enzyme immunoassay for the determination of progesterone in feces and serum. *Zoo Biology* 20: 227-236.

Haigh JC, Cates WF, Glover GJ, Rawlingst NC (1984) Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapití (*Cervus elaphus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 413-418.

Hamasaki S, Yamauchi K, Ohki T, Murakami M, Tkahara Y, Takeuchi Y, Mori Y (2001) Comparison of various reproductive status in Sika deer (*Cervus nippon*) using fecal steroid analysis. *Journal of Veterinary Medicine Science* 63: 195-198.

Handelsman DJ, Spaliviero JA, Simpson JM, Allan CM, Singh J (1999) Spermatogenesis without gonadotropins: Maintenance has a lower testosterone threshold than initiation. *Endocrinology* 140: 3938-3946.

Haneji T, Maekawa M, Nishimune Y (1984) Vitamin A and Follicle-Stimulating Hormone synergistically induce differentiation of type A spermatogonia in adult mouse cryptorchid testes in vitro. *Endocrinology* 114: 801-805.

Harvey PH, Harcourt AH (1984) Sperm competition, testes size and breeding systems in primates. En: *Sperm Competition and the Evolution of Animal mating System*. Smith RL (Ed). Academic Press. pp 589–599.

Haywood M, Spaliviero J, Jimenez M, King JJC, Handelsman DJ, Allan CM (2003) Sertoli and germ cells development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. *Endocrinology* 144: 509-517.

Hochereau-de Reviers MT, Courtens JL, Courot M, de Reviers M (1990) Spermatogenesis in Mammals and Birds. En: *Marshall's Physiology of Reproduction*. Vol 2: Reproduction in the male. 4ta ed. Lamming GE (Ed). Churchill Livingstone, Edinburgh, RU. pp 106-182.

Hochereau de Reviers MT, Lincoln GA (1978) Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 209-213.

Illius AW, Haynes NB, Lamming GE (1976) Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behaviour in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility* 48: 25-32.

Ijaz A, Hunter AG, Graham EF (1989) Identification of the capacitating agent for bovine sperm in egg yolk-TEST semen extender. *Journal of Dairy Science* 72: 2700–2706.

Jackson JE, 1987. *Ozotoceros bezoarticus*. *Mammalian Species* 295: 1-5.

Jackson JE, Giullieti J (1988) The food of pampas deer *Ozotoceros bezoarticus celer* in relation to its conservation in relict natural grassland in Argentina. *Biological Conservation* 45: 1-10.

Jackson JE, Landa P, Langguth A (1980) Pampas deer in Uruguay. *Oryx* 15: 267-272.

Jackson JE, Langguth A (1987) Ecology and status of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Argentinean pampas and Uruguay. En: *Biology and management of the Cervidae*. Wemmer C (Ed). Smithsonian Institution Press, Washington DC. pp 402-409.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 219-228.

Junguis H (1975/76) Status and distribution of threatened deer species in South America. Report to SSC/IUCN deer group. En: *World Wildlife Foundation Yearbook*. Gland, Switzerland 76: 203-217.

Katongole CB, Naftolin F, Short RV (1971) Relationship between blood levels of Luteinizing Hormone and Testosterone in bulls, and the effects of sexual stimulation. *Journal of Endocrinology* 50: 457-466.

Katz LS, Price EO, Wallach SJR, Zenchak JJ (1988) Sexual performance of rams reared with or without females after weaning. *Journal of Animal Science* 66: 1166-1173.

Kauffold J, Kessler M, Richter A, Beynon N, Wehrend A (2011) B-mode ultrasound and grey-scale analysis of the epididymis in boars, and the relationship to semen parameters. *Reproduction in Domestic Animals* 46: 108-113.

Kaya A, Aksoy M, Tekeli T (2002) Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research* 44: 153-158.

Kock KM, Clark RK, Franti CE, Jessup DA, Wehausen JD (1987) Effects of capture on biological parameters in free-ranging bighorn sheep (*Ovis canadensis*): Evaluation of normal,

stressed and mortality outcomes and documentation of postcapture survival. *Journal of Wildlife Diseases* 23: 652-662.

Komers PE, Birgersson B, Ekvall K (1999) Timing of estrus in fallow deer is adjusted to the age of the available mates. *The American Naturalist* 153: 431-436.

Korndörfer CM, Meirelles CF, Bueno IC (1998) Evaluation of extraction methods for progesterone determination in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) feces by radioimmunoassay. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 35: 115-119.

Kridli RT, Al-Yacoub AN (2006) Sexual performance of Awassi ram lambs reared in different sex composition groups. *Applied Animal Behaviour Science* 96: 261-267.

Kridli RT, Said SI (1999) Libido testing and effect of exposing sexually naïve Awassi rams to oestrous ewes on sexual performance. *Small Ruminant Research* 32: 149-152.

Kusuda S, Nagami H, Kusunoki H, Nishikaku T, Nakagawa D, Takida T, Kurita D, Uemichi K, Fukai M, Kubota H, Ueda K, Ooe T, Okuda K, Doi O (2006) Annual changes in testicular size and serum and fecal testosterone concentrations in male Bharals, *Pseudois nayaur*. *Journal of Veterinary Medicine Science* 68: 1093-1095.

Li C, Jiang Z, Jiang G, Fang J (2001) Seasonal changes of reproductive behavior and fecal steroid concentrations in Pere David's deer. *Hormones and Behavior* 40: 518-525.

Lincoln GA (1971) The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *Journal of Zoology London* 163: 105-123.

Lincoln GA (1984) Antlers and their regeneration- a study using humpbacks, hinds and havers. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 828: 243-259.

Lincoln GA (1990) Correlation with changes in horns and pelage, but not reproduction, of seasonal cycles in the secretion of prolactin in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* 90: 285-296.

Lincoln GA (1992) Biology of Seasonal Breeding in Deer. En: The biology of deer. Brown RD (Ed). Springer Verlag. New York, USA. pp 565-574.

Lincoln GA, Andersson H, Loudon A (2003) Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals—a unifying hypothesis. *Journal of Endocrinology* 179: 1-13.

Lincoln GA, Guinness F, Short RV (1972) The way in which Testosterone controls the social and sexual behavior of the red deer stag (*Cervus elaphus*). *Hormones and Behavior* 3: 375-396.

Lincoln GA, Short RV (1980) Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research* 36: 1-52.

Liptrap RM, Raeside JI (1978) A relationship between plasma levels of testosterone and corticoosteroids during sexual aggressive behaviour in the boar. *Journal of Endocrinology* 76: 75-85.

Loehr J, Carey J, Ylönen H, Suhonen J (2008) Coat darkness is associated with social dominance and mating behaviour in a mountain sheep hybrid lineage. *Animal Behaviour* 76: 1545-1553.

Loudon ASI, Curlewis JD (1988) Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). *Journal of Reproduction and Fertility* 83: 729-738.

Lovari S, Pellizzi B, Boesi R, Fusani L (2009) Mating dominance amongst male Himalayan tahr: Blonds do better. *Behavioural Processes* 81: 20-25.

Lueders I, Hildebrandt TB, Pootoolal J, Rich P, Gray CS, Niemuller CA (2009) Ovarian ultrasonography correlated with fecal progestins and estradiol during the estrous cycle and early pregnancy in giraffes (*Giraffa camelopardalis rothschildi*). *Biology of Reproduction* 81: 989-995.

Macrides F, Bartke A, Fernandez F, D'angelo W (1974) Effects of exposure to vaginal odours and receptive females on plasma testosterone in the male hamster. *Neuroendocrinology* 15: 355-364.

Malfatti A, Barbato O, Todini L, Terzano GM, Debenedetti A, Borghese A (2006) Blood testosterone levels in Italian Mediterranean buffalo bulls managed in two different breeding conditions. *Theriogenology* 65: 1137–1144.

Malo AF, Roldan ERS, Garde J, Soler AJ, Gomendio M (2005) Antlers honesty advertise sperm production and quality. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 149-157.

Malo AF, Roldan ERS, Garde JJ, Soler AJ, Vicente J, Gortazar C, Gomendio M (2009) What does testosterone do to red deer males? *Proceedings of the Royal Society B* 276: 971-980.

Malpaux B (2006) Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. En: Knobil and Neill's physiology of reproduction. Vol 1. 3a ed. Neill JD (Ed). Elsevier Academic Press. Missouri, EEUU. 2231-2281.

Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P (2001) Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms* 16: 336-347.

Matsuura Y, Sasamoto Y, Sato K, Takahashi Y, Suzuki M, Ohtaishi N (2004) *Ecological Research* 19: 397-404.

Mazzolli M, Benedet RC (2009) Registro recente, redução de distribuição e atuais ameaças ao veado-campeiro *Ozotoceros bezoarticus* (Mammalia, Cervidae) no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* 22: 137-142.

McLachlan RI, Wreford NG, de Kretser DM, Robertson DM (1995) The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone-immunized adult rat. *Endocrinology* 136: 4035-4043.

Meachem S, von Schönfeldt V, Schlatt S (2001) Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reproduction* 121: 825-834.

Meachem SJ, Wreford NG, Stanton PG, Robertson DM, McLachlan RI (1998) Follicle-Stimulating Hormone is required for the initial phase of spermatogenic restoration in adult rats following gonadotropin suppression. *Journal of Andrology* 19: 725-735.

Meistrich ML, Kangasniemi M (1997) Hormone treatment after irradiation stimulates recovery of rats spermatogenesis from surviving spermatogonia. *Journal of Andrology* 18: 80-87.

Mickelsen WD, Paisley LG, Dahmen JJ (1981) The effect of scrotal circumference, sperm motility and morphology in the ram on conception rates and lambing percentage in the ewe. *Theriogenology* 16: 53-59.

Monfort SL, Brown JL, Bush M, Wood TC, Wemmer C, Vargas A, Williamson LR, Montali RJ, Wildt DE (1993) Circannual inter-relationships among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). *Journal of Reproduction and Fertility* 98: 471-480.

Monfort SL, Mashburn KL, Brewer BA, Creel SR (1998) Evaluating adrenal activity in African wild dogs (*Licaon pictus*) by fecal corticosteroids analysis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 29: 129-133.

Morales-Piñeyrúa Y (2010) Comportamiento de cópula en el venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758). Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Uruguay.

Mystkowski MD, Schwatz MW (2000) Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era. *Nutrition* 16 (10) 937-946.

Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW (2001) Arthur's veterinary reproduction and obstetrics. 8^a ed. Saunders E (Ed). St Louis, Mo, EEUU. pp 868.

O'Callaghan D, Donovan A, Sunderland SJ, Boland MP, Roche JF (1994) Effect of the presence of the male and female flockmates on reproductive activity of ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 497-503.

O'Leary P, Jackson AE, Averill S, de Kretser DM (1986) The effects of ethane dimethane sulphonate (EDS) on bilaterally cryptorchid rat testes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 45: 183-190.

O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI (2006) Endocrine regulation of spermatogenesis. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Vol 1. 3^a ed. Neill JD (Ed). Elsevier Academic Press. Missouri, EEUU. pp 1017-1069.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 22: 289–318

Palme R (2005) Measuring Fecal Steroids: Guidelines for practical application. *Annals New York Academy of Science* 1046: 75-80.

Parera A, Moreno D (2000) El venado de campo en Corrientes, diagnostico de su estado de conservación y propuestas de manejo: situación crítica. *Fundación Vida Silvestre (Argentina)*. pp 40.

Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Andersen Berg K (2002) Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57: 823-836.

Pautasso AA, Peña MI, Mastropaolo JM, Moggia L (2002) Distribución y conservación del venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) en el norte de Santa Fe, Argentina. *Journal of Neotropical Mammalogy* 9: 64-69.

Pelletier F, Bauman J, Festa-Bianchet M (2003) Fecal testosterone in bighorn sheep (*Ovis canadensis*): behavioural and endocrine correlates. *Canadian Journal of Zoology* 81: 1678-1684.

Pérez W (2012) Anatomía del Aparato Reprodutor del Venado de Campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Tesis de Maestría, PEDECIBA, Montevideo, Uruguay.

Pérez Carusi LC, Beade MS, Miñarro F, Vila AR, Giménez-Dixon M, Bilenca DN (2009) Relaciones espaciales y numéricas entre venados de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus celer*) y chanchos cimarrones (*Sus scrofa*) en el Refugio de Vida Silvestre Bahía Samborombón, Argentina. *Ecología Austral* 19: 63-71.

Perkins A, Fitzgerald JA, Price EO (1992) Luteinizing hormone and testosterone response of sexually active and inactive rams. *Journal of Animal Science* 70: 2086-2093.

Pickard AR, Abáigar T, Green DI, Holt WV, Cano M (2001) Hormonal characterization of the reproductive cycle and pregnancy in the female Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Reproduction* 122: 571-580.

Price J, Allen S (2004) Exploring the mechanism of regeneration of deer antlers. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*. 359: 809-822.

Price OE, Estep DQ, Wallach SJR, Dally MR (1991) Sexual performance of rams as determined by maturation and sexual experience. *Journal of Animal Science* 69: 1047-1052.

Rajanarayanan S, Archunan G (2011) Identification of urinary sex pheromones in female buffaloes and their influence on bull reproductive behaviour. *Research in Veterinary Science* 91: 301-305.

Read M, Caulkett N, McCallister M (2000) Evaluation of zuclopenthixol acetate to decrease handling stress in wapiti. *Journal of Wildlife Diseases* 36: 450-459.

Reyes E, Bubenik GA, Schams D, Lobos A, Enriquez R (1997). Seasonal changes of testicular parameters in southern pudu *Pudu pudu* in relationship to circannual variation of its reproductive hormones. *Acta Theriologica* 42: 25-35.

Rodrigues FH, Monteiro-Filho EL (1999) Feeding behavior of the pampas deer: a grazer or a browser? *Deer Specialist Group News* 15: 12-13.

Rosa HJD, Juniper DT, Bryant MJ (2000) Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behaviour and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 120: 169-176.

Russell LD, Alger LE, Nequin LG (1987) Hormonal control of puberal spermatogenesis. *Endocrinology* 120: 1615-1632.

Saito K, O'Donnell L, McLachlan RI, Robertson DM (2000) Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *Endocrinology* 141: 2779-2785.

Settergreen NI, Galloway DB (1965) Studies on genital malformations in female cattle using slaughter house material. *Nordisk Veterinaer Medicin* 17: 9-16.

Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, Kerr JB, Saunders PTK, McKinnell C (1992) Testosterone and spermatogenesis: Identification of stage-specific, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubes. *Journal of Andrology* 13: 172-184.

ShuLing L, JianZhang M, Jun B (2008) The relation of fecal hormone concentration and reproductive behavior of captive red deer. *Chinese Journal of Zoology* 43: 59-66.

Simorangkir DR, Wreford NG, de Kretser DM (1997) Impaired germ cell development in the testes of immature rats with neonatal hypothyroidism. *Journal of Andrology* 18: 186-193.

Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ (1995) Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 136: 5311-5321.

Sun YT, Irby DC, Robertson DM, De Kretser DM (1990) The effects of exogenously administered testosterone on spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 125: 1000-1010.

Superina M, Carreño N, Jahn GA (2009) Characterization of seasonal reproduction patterns in female pichis *Zaedyus pichiy* (Xenarthra: Dasypodidae) estimated by fecal sex steroid metabolites and ovarian histology. *Animal Reproduction Science* 116: 358-369.

Superina M, Jahn GA (2009) Seasonal reproduction in male pichis *Zaedyus pichiy* (Xenarthra: Dasypodidae) estimated by fecal androgen metabolites and testicular histology. *Animal Reproduction Science* 112: 2983-292.

Swierstra EE, Foote RH (1965) Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. *American Journal of Anatomy* 116: 401-411.

Taillon J, Côté SD (2008) Are faecal hormone levels linked to winter progression, diet quality and social rank in young ungulates? An experiment with white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) fawns. *Behavioral ecology and Sociobiology* 62: 1591-1600.

Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ (1993) Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Molecular Endocrinology* 7: 643-650.

Tarifa T (1993) Situación de la especie en Bolivia. Population and hábitat viability assessment for the pampas deer *Ozotoceros bezoarticus*. Briefing book, Rocha, Uruguay.

Thornton MJ, Hibberts NA, Street T, Brinklow BR, Loudon ASI, Randall VA (2001) Androgen receptors are only present in mesenchyme-derived dermal papilla cells of red deer (*Cervus elaphus*) neck follicles when raised androgens induce a mane in the breeding season. *Journal of Endocrinology* 168: 401-408.

Toledano-Díaz A, Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, Pulido-Pastor A, López-Sebastián (2007) Horn growth related to testosterone secretion in two wild Mediterranean ruminant species: the spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) and european muflon (*Ovis orientalis musimon*). *Animal Reproduction Science* 102: 300-307.

Tomás WM (1988) Epocas de concepcao e nacimentos do veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no pantanal matogrossense. XV Congresso Brasileiro de Zoologia. Paraná, Brasil. pp 95.

UICN (2012) The IUCN red list of threatened species. *Ozotoceros bezoarticus ssp. uruguayensis*. <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/40778/all>

Ungerfeld R (2006) Socio-sexual signalling and gonadal function: opportunities for reproductive management in domestic ruminants. En: Reproduction in domestic ruminants VI. Juengel JI, Murray JF, Smith MF (Eds). Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp 207-221.

Ungerfeld R (2007) Social Factors affecting ovarian function. En: Novel concepts in ovarian endocrinology. González-Bulnes A (Ed). Transworld Research Network, Kerala, India. pp 169-221.

Ungerfeld R, Bielli A, González-Pensado S, Villagrán M, González-Sierra TU (2008a) Antler size and weight in a herd of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) Mammalian Biology 73: 478–481.

Ungerfeld R, Fila D (2011a) Testicular fluid content evaluated by ultrasound image computer-assisted analysis increases with small-dose multiple GnRH injections in rams. Reproduction in Domestic Animals 46: 720-723.

Ungerfeld R, Fila D (2011b) Testicular fluid content and scrotal surface temperature increase with rams' sexual activity. Reproduction in Domestic Animals. Aceptado para publicar.

Ungerfeld R, González-Sierra T, Bielli A (2008c) Seasonal antler cicle in a herd of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in Uruguay. Mammalian Biology 73: 388-391.

Ungerfeld R, González-Sierra UT, Piaggio J (2008b) Reproduction in a semi-captive herd of pampas deer *Ozotoceros bezoarticus*. Wildlife Biology 14: 350-357.

Ungerfeld R, González-Pensado S, Villagrán M, Bielli A, Rossini C, Morales J, Pérez W, Damián JP (2011) Biología reproductiva del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). UCUR-CSIC. pp 107.

Ungerfeld R, Silva L (2004) Ewe effect: endocrine and testicular changes in experienced adult and inexperienced young Corridale rams used for the ram effect. *Animal Reproduction Science* 80: 251-259.

Vázquez R, Orihuela A (2001) Effect of vaginal mucus and urine from ewes in estrus on plasma testosterone levels and weight gain of feedlots rams. *Small Ruminant Research* 42: 173-177.

Veloso-Nunez AL, Gasparini RL, Barbanti-Duarte JM, Pinder L, Buschinelli MC (1997) Captura, contención e manuseio. En: *Biología e Conservação de Cervídeos Sul – americanos*. Barbanti-Duarte JM (Ed). Jaboticabal, Ed FUNEP, Brasil. pp 142-170.

Verme LJ, Ozaga JJ, Nellist JT (1987) Induced early estrus in penned white-tailed deer does. *Journal of Wildlife Management* 51: 54-56.

Vihko KK, Lapolt PS, Nishimori K, Hsueh AJW (1991) Stimulatory effects of recombinant Follicle-Stimulating Hormone on Leydig cell function and spermatogenesis in immature hypophysectomized rats. *Endocrinology* 129: 1926-1932.

Vila A, Beade M (1997) Situación poblacional del venado de las pampas en la Bahía de Samborombón. *Boletín Técnico* 37, Fundación Vida Silvestre (Argentina). pp 30.

Waldhalm SJ, Jacobson HA, Dhungel SK, Bearden HJ (1989) Embryo transfer in the white-tailed deer: A reproductive model for endangered deer species of the world. *Theriogenology* 31: 437-450.

Walkden- Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ (1994) The “female effect” in Australian cashmere goats: effect of season and quality of diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrous does. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 521-531.

Walker WH (2003) Nongenomic actions of androgen in Sertolli cells. *Current Topics in Developmental Biology* 56: 25-53.

Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millspaugh JJ, Larson S, Monfort SL (2000) A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 120: 260-275.

Watson PF, Martin ICA (1973) The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5 or -196°C. *Australian Journal of Biological Science* 26: 927-935.

Weber M, González S (2003) Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. *Ecoscience* 10: 443-454.

Whittle CL, Bowyer RT, Clausen TP, Duffy LK (2000) Putative pheromones in urine of rutting male moose (*Alces alces*): evolution of honest advertisement? *Journal of Chemical Ecology* 26: 2747-2762.

Wu HP, Hao YJ, Li X, Zhao QZ, Chen DQ, Kuang XA, Kou ZB, Feng KK, Gong WM, Wang D (2010) B-Mode ultrasonographic evaluation of the testis in relation to serum testosterone concentration in male yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*) during the breeding season. *Theriogenology* 73: 383-391.

Yamauchi K, Hamasaki S, Takeuchi Y, Mori Y (1997) *Journal of Reproduction and Development* 43: 221-226.

Yamauchi K, Hamasaki S, Takeuchi Y, Mori Y (1999) Application of enzyme immunoassay to fecal steroid analysis in Sika deer (*Cervus nippon*). *Journal of Reproduction and Development* 45: 429-434.

Yarney TA, Sanford LM (1983) The reproductive-endocrine response of adult rams to sexual encounters with estrual ewes is season dependent. *Hormones and Behavior* 17: 169-182.

12. Anexo

Publicación I

734

Female effect on antlers of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*)

R. Ungerfeld, J.P. Damián, M. Villagrán, and S.X. González-Pensado

Abstract: Size and bone mineralization of deer antlers are related to testosterone concentrations, and antler cast is observed after withdrawal of testosterone concentration. Our objectives were to determine if (i) contact with hinds stimulates antler development and increases hard antler period length in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* (L., 1758)) and (ii) antlers from males that were or were not in contact with hinds differ in colour. While 5 males were in breeding paddocks consisting of 1 adult stag and 5–10 hinds, the other 6 males were allocated as a single-male group. We collected, weighed, and measured the volume, circumferences, and lengths of antlers, and determined their colour. First antler cast tended to be later in males in contact with females than those in the single-male group. Antler mass and volume were greater in antlers from males in contact with females. Circumference at the base of first and second tines was also greater in antlers collected from males in contact with females. Surfaces of antlers from these males were darker than those of antlers from males that remained isolated from females in all points. Hind contact stimulated male pampas deer, increasing antler mass, size, and darkness, as well as possibly hard antler period length.

Résumé : La taille et la minéralisation osseuse des bois de cerfs est en relation avec les concentrations de testostérone et la chute des bois s'observe après la réduction des concentrations de testostérone. Nos objectifs sont de déterminer (i) si le contact avec les biches stimule le développement des bois et allonge la période des bois durs chez le cerf des pampas (*Ozotoceros bezoarticus* (L., 1758)) et (ii) si la couleur des bois des mâles en contact avec les biches diffère de celle des mâles sans contact. Alors que 5 mâles se trouvaient dans des enclos de reproduction contenant chacun 1 cerf adulte et 5–10 biches, les autres 6 mâles formaient un seul groupe exclusif de mâles. Nous avons récolté, pesé, mesuré le volume, les circonférences et les longueurs des bois et déterminé leur couleur. La première chute des bois a tendance à se faire plus tardivement chez les mâles en contact avec des femelles que chez ceux qui font partie du groupe exclusif de mâles. Les bois des mâles en contact avec les femelles ont une masse et un volume plus importants. La circonférence au niveau du premier et du second andouiller est aussi plus grande dans les ramures des mâles en contact avec les femelles. Les surfaces des bois de ces mâles sont plus foncées que celles des mâles qui ont été constamment isolés des femelles. Le contact avec les biches stimule les cerfs des pampas, augmente la masse, la taille et la coloration foncée des bois et prolonge peut-être la durée des bois durs.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Reproductive processes are consequence of external environmental signals and endogenous mechanisms of neuroendocrine regulation. Socio-sexual signals interact with the neuroendocrine system and with other external signals stimulating or inhibiting reproduction. Thus, the presence or absence of other individuals or the social management has strong influences on the reproductive status of animals. In domestic ruminants (sheep, goats, and cattle), there are several reports on the stimulating influence of males on female reproduction (for reviews see Ungerfeld 2007a, 2007b). It has also been reported that when rams are joined with

ewes, there is an increase in their luteinizing hormone pulse frequency and testosterone concentration (González et al. 1988). Ungerfeld and Silva (2004) observed this increase being maintained for several days. Moreover, Illius et al. (1976) reported a positive effect of long-term presence of ewes on rams. These authors reported that rams near ewes had larger testes, greater testosterone concentrations, and displayed more sexual and aggressive behaviours.

In deer, information regarding socio-sexual stimulus is scarce. In red deer, it has been reported that the exposure of females to stags determines an earlier attainment of puberty (Fisher et al. 1995), and an earlier conception during the breeding season (Moore and Cowie 1986; McComb 1987). Evidence related to positive effects of males presence on female reproductive activity have also been reported in white-tail deer (*Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780); Verme et al. 1987), fallow deer (*Dama dama* (L., 1758)); Komers et al. 1999), Eld's deer (*Cervus eldi* McClelland, 1842; Hosack et al. 1997, 1999), musk deer (*Moschus chrysogaster* (Hodgson, 1839); Green 1987), caribou or reindeer (*Rangifer tarandus* (L., 1758); Adams et al. 2001; Shipka et al. 2002), and moose (*Alces alces* (L., 1758); Whittle et al. 2000). On the other hand, female red deer compete for access to males (Clutton-Brock et al. 1982) and

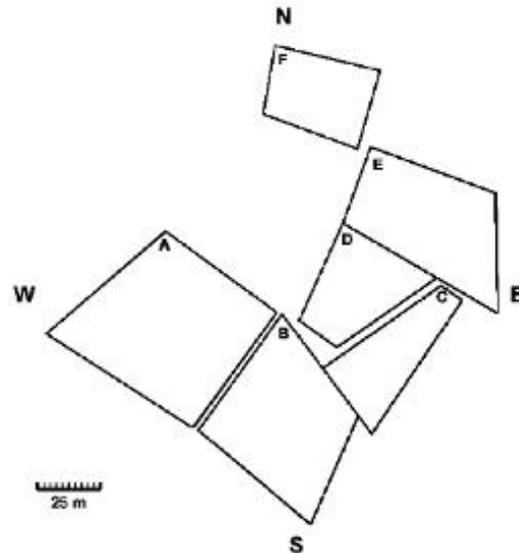
Received 8 March 2009. Accepted 27 May 2009. Published on the NRC Research Press Web site at cja.nrc.ca on 5 August 2009.

R. Ungerfeld,¹ M. Villagrán, and S.X. González-Pensado. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550, Montevideo 11600, Uruguay.

J.P. Damián. Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550, Montevideo 11600, Uruguay.

¹Corresponding author (e-mail: piub@internet.com.uy).

Fig. 1. Diagram of the paddock size and distribution of male pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). In paddocks A–E, 1 male was allocated with 5–10 females. In paddock F, 6 males were allocated without direct contact with females.



more dominant females get pregnant earlier and calve more frequently than subordinate females (Clutton-Brock et al. 1986). This female–female competition may also be an important stimulus for male reproductive activity.

The pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* (L., 1758)) is distributed in open grasslands (pampas) across eastern South America, from 5°S to 41°S (Jackson and Langguth 1987). However, habitat fragmentation, agriculture development, competition with farmed animals (Demaría et al. 2004), unregulated hunting (Jackson and Giullietti 1988), and transmission of infectious diseases (Junguis 1975–1976) have confined animals to small isolated populations. The species is considered critically endangered by the International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN 2008), with only small populations reported in Argentina, Brazil, and Uruguay. Based on cytogenetic, molecular (González et al. 1998), and morphometric (González et al. 2002) data, two subspecies endemic from Uruguay (*Ozotoceros bezoarticus arerunguensis* (Salto; 31°65'S, 56°43'W) and *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis* (Rocha; 33°45'S, 54°02'W)) have recently been identified. Semi-captive breeding of animals from a population of *O. b. arerunguensis* was started in 1981 at the Estación de Cría de Fauna Autóctona (ECFA; 34°3'S, 55°1'W; altitude ~200 m), Pan de Azúcar, Maldonado, Uruguay. This population is the largest captive population of pampas deer in the world.

Male deer present annual antler cycles that are closely related to androgen concentration. Size and bone mineralization are related to testosterone concentrations observed before the rut period. On the other hand, antler cast is observed 2–4 weeks after withdrawal of testosterone concen-

tration. Therefore, antler cycle and antler characteristics such as mass have been considered a unique indicator of changes in testosterone secretion throughout the year (see reviews in Bubenik 1990, 1991), and can be used as an indirect measure of gonadal changes in species that cannot be easily manipulated such as pampas deer. The antler cycle in pampas deer has been recently described in detail (Ungerfeld et al. 2008a). In adult males managed together with females, antler cast was consistently observed during the first days of August at the ECFA (natural photoperiod ranges from 14 h light : 10 h dark in the summer to 10 h light : 14 h dark in the winter). Preliminary unpublished observations suggest that antlers from males in contact with females are darker than those from males isolated from females. In other deer species, there is evidence that female pheromones prolong testosterone secretion, influencing antler cycle length (Bubenik and Bubenik 1986). Our first objective was to determine if contact with hinds stimulates antler development and increases hard antler period length. Our hypothesis states that permanent contact with females is associated with an increase in antler size (mass and volume) and delays antler cast date. A second objective was to determine if antlers from males that were or were not in contact with hinds differ in colour. Our hypothesis states that antlers from males in permanent contact with females are darker than those from males isolated from females. Therefore, our predictions were that antlers casted from males in permanent contact with females are heavier, bigger, and darker, and cast later than those from males that were isolated from females.

Materials and methods

Animal management and antler collection

Breeding of pampas deer began at the ECFA in 1981. Animals were organized in 5 breeding groups composed of 1 adult stag and 5–10 hinds, which were together throughout the year in 0.5–1 ha paddocks. Each one of those paddocks was in direct contact at least one other paddock (locations: Figs. 1A–1E). A group of 6 adult males was allocated continuously for 2 years in a single paddock with no direct contact with other paddocks (Fig. 1F). Breeding males were randomly allocated to each group and remained with that group from approximate 1 year prior to the beginning of data collection until the completion of the project. All animals grazed native vegetation and were supplemented daily with approximately 600 g of dairy cow ration/deer from Monday to Saturday. Antler status was recorded daily: when we observed the absence of an antler on a stag, the paddock was searched, and the cast antler collected and identified.

Antler size and number of pearls

Antlers were weighed, volume was measured, and the following parameters based on Ungerfeld et al. (2008b) for antlers of pampas deer were measured: coronet circumference, circumference at the base of first tine, length from antler coronet to first tine bifurcation, length from antler coronet to first tine tip, and number of pearls. Tines were considered first, second, and third tines in an antero-caudal order. Number of pearls (2–10 mm exostosis on the antlers surface) was counted in both antlers.

Table 1. Circumferences and lengths in antlers of pampus deer (*Ozotoceros bezoarticus*) from males in permanent contact with females or isolated from them.

	Parameter	Contact with females	Isolated from females	P
Circumference (cm)	Coronet	6.9±0.2	6.8±0.1	NS
	Base of first tine	6.2±0.2	5.7±0.2	0.046
	Base of the second tine	5.6±0.2	4.9±0.1	0.002
	Base of the third tine	4.9±0.2	4.4±0.2	0.074
Length (cm)	From antler coronet to first tine bifurcation	4.9±0.2	5.4±0.2	0.071
	From antler coronet to second tine bifurcation	15.2±0.5	14.6±0.7	NS
	First tine	16.6±0.4	14.6±1.1	0.077
	Second tine	15.0±0.4	14.8±0.9	NS
	Third tine	13.2±0.3	12.3±1.2	NS

Note: Values are means ± SE and NS is not significant.

Table 2. L^* , a^* , and b^* colour parameters measured inside the coronet and in five other points measured according to CIE (1976) in antlers from male pampus deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in permanent contact with females or isolated from them.

Colour parameter	Area measured	Contact with females	Isolated from females	P
L^*	Inside the coronet	62.3±1.4	61.4±1.7	NS
	Mid-point from the coronet to the first tine bifurcation	36.0±0.9	46.6±1.9	<0.0001
	Second bifurcation	43.4±0.6	46.1±1.0	0.006
	First tine	37.0±1.0	51.5±1.3	<0.0001
	Second tine	37.9±1.2	51.5±0.9	<0.0001
	Third tine	38.8±0.5	51.3±1.6	<0.0001
a^*	Inside the coronet	3.6±0.5	4.3±0.6	NS
	Mid-point from the coronet to the first tine bifurcation	3.3±0.4	4.0±0.4	NS
	Second bifurcation	3.7±0.4	2.5±0.4	0.006
	First tine	3.3±0.3	3.8±0.4	NS
	Second tine	3.6±0.3	3.5±0.2	NS
	Third tine	4.0±0.3	3.9±0.6	NS
b^*	Inside the coronet	32.5±0.7	33.1±1.1	NS
	Mid-point from the coronet to the first tine bifurcation	23.4±0.5	27.7±0.6	<0.0001
	Second bifurcation	26.3±0.5	26.3±0.8	NS
	First tine	23.6±0.5	29.7±0.5	<0.0001
	Second tine	24.0±0.7	29.2±0.6	<0.0001
	Third tine	24.6±0.2	29.2±0.7	<0.0001

Note: Values are means ± SE and NS is not significant. L^* , values of lightness (from 10 blackness to 100 whiteness); a^* , values of redness (from green (negative value) to red (positive value)); b^* , values of yellowness (from blue (negative value) to yellow (positive value)).

Antler colour

Colour was determined with a colorimeter (Minolta CR10, Minolta Camera Co, Osaka 541, Japan), and results reported in accordance with the recommendations of the Commission Internationale de l'Éclairage (CIE 1976): values of lightness (L^*) (from 10 blackness to 100 whiteness), redness (a^*) (from green (negative value) to red (positive value)), and yellowness (b^*) (from blue (negative value) to yellow (positive value)). Colour was determined in triplicate at 11 points per antler. These points included the inside part of the coronet, and the internal and external sides for the following points: mid-point from the coronet to first tine bifurcation, second bifurcation, and mid-length from each tine.

Statistical analysis

Data from males in direct contact with females ($n = 5$) were compared with males that remained in a male-only group ($n = 6$). Dates of antler cast, measures of antler size, and colours were compared by ANOVA. Number of pearls on both antlers was compared by Kruskal–Wallis test.

Results

Antler cast

First antler cast tended to be later for males in contact with females than those in the same-sex group: August 2.0 ± 4.4 vs. July 21.8 ± 3.9 ($P = 0.089$). The second antler cast was observed in all animals ≤ 1 day after the first antler cast.

Antler size and number of pearls

Antler mass and volume were greater in female exposed males compared with nonexposed males (148.7 ± 7.4 g vs. 121.3 ± 8.0 g ($P = 0.018$) and 85.8 ± 5.3 cm³ vs. 68.8 ± 6.3 cm³ ($P = 0.037$), respectively). Circumference at the base of first and second tines were larger in antlers collected from males in contact with females than from males isolated from females (Table 1). Circumference of the third tine, length from antler coronet to first tine bifurcation, and length of the first tine tended to be greater in males in contact with females (Table 1). The number of pearls was

Fig. 2 Right antlers from eight male pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). The upper four were from males in permanent contact with females. The lower four were from males isolated from females.



greater in antlers from males in contact with females: 299.8 ± 48.1 vs. 106.7 ± 29.3 ($P = 0.018$).

Antler colour

Overall, antlers from males in contact with females were darker than antlers from isolated males (Table 2, Fig. 2). Colour inside the coronet was similar in antlers collected from males that remained with or without contact with females. Antlers from males in contact with females were darker (lower L^*) than those from males in the male-only group. Except in the second bifurcation that was greater in antlers from males in contact with females, there were no other differences in a^* values. Except for the second bifurcation in which there were no differences, b^* was lower in antlers from males in contact with females. Although we were unable to measure it, differences in colour were evident in hard antlers since velvet shedding.

Overall, there were no differences in colours between right and left antlers in males that remained isolated from females. However, in males in contact with females, right antlers had greater a^* (3.8 ± 0.2 vs. 3.5 ± 0.1 , $P = 0.04$) and b^* (24.7 ± 0.3 vs. 24.0 ± 0.3 , $P = 0.04$) values. However, L^* values from right and left antlers were similar (39.0 ± 0.6 vs. 38.1 ± 0.6).

There were no differences in L^* and b^* values measured in the internal and the external sides in the antlers from

males in contact with females. However, outside a^* value was greater than inside a^* value (3.8 ± 0.1 vs. 3.4 ± 0.1 , $P = 0.05$). In males isolated from females, external L^* (48.6 ± 0.6) was lower than internal L^* (50.2 ± 0.6 , $P = 0.03$), and external a^* (4.0 ± 0.2) was greater than internal a^* (3.2 ± 0.1 , $P < 0.001$).

Discussion

This study describes a direct effect of hind presence on reproductive activity of stags as implied by antler characteristics. The differences observed on most antler characteristics (mass and size) and the tendency on antler cast date implied that gonadal activity of stags was positively influenced by permanent contact with females. Our data agree with previous information, as antler characteristics were similar to those described by Ungerfeld et al. (2008b). Antler casts of males isolated from females in our study were approximately 11 days earlier. As pearls grow during the period of relative high testosterone concentrations (Bubenik 1966), the greater number observed on antlers from males in contact with females may also be a consequence of direct testosterone stimulation. As the antler cycle is closely related to androgen concentration (Bubenik 1990), hind presence may have induced greater testosterone concentrations at least throughout the rut period.

Considering the small distance between paddocks, we suggest direct contact is more important than other stimulating signals (e.g., visual, vocal, or chemical signals). At least chemical signals, which have been reported to influence antler cycle (Bubenik and Bubenik 1986), are not enough to overcome the lack of direct contact even with the small distance between paddocks with males and those with females. This agrees with González et al. (1991), who found chemical signals alone do not cause an endocrine response in rams, as when ewes and rams have direct contact. It remains to be determined if the stimulus is only provoked by females present in the same paddock or if the presence of other hinds in the adjacent paddocks with fenceline contact and possible competition with males that remain with those hinds can also stimulate males.

Antlers from males in contact with females were darker, and appeared visually evident from the time of velvet shedding onward. Although to our knowledge there is no previous information regarding antler surface colour, it was also influenced by female presence. As the inside basis of the coronet was not coloured, the influence of testosterone concentrations (Bubenik 1990) may be only at the surface. Although antlers have been reported to be originally developed as "organs produced to attract females" (Bubenik 2002), the significance of colour as a visual signal is unknown.

There were some differences in colours between the internal and external sides of the antlers, and between right and left antlers in males in contact with females. The lower darkness observed in the internal surface of antlers from males in contact with females may be a consequence of greater surface wear produced by marking activity. The colour difference between right and left antlers also suggests differential marking use of both antlers. The possibility of laterality on antler activity agrees with a previous observation, where slight differences on right and antler mass were reported (Ungerfeld et al. 2008b). However, to the best of our knowledge, there are no previous reports in lateral colour differences in deer antlers.

Overall, our initial hypotheses and predictions were confirmed. We conclude that hinds contact stimulated male pampas deer, increasing antler mass, size, and darkness, as well as possibly hard antler period length.

Acknowledgements

Authors acknowledge Uruguay Tabaré González-Sierra and Johnny Brioso, from ECFA; Dra. Mary Araujo and Jorge Rocca, from the Intendencia Municipal de Maldonado. Financial support was provided by CSIC (Universidad de la República, Uruguay) and Intendencia Municipal de Maldonado (Uruguay).

References

- Adams, C.A., Bowyer, R.T., Rowell, J.E., Hauer, W.E., and Jenks, J.A. 2001. Scent marking by male caribou: an experimental test of rubbing behavior. *Rangifer*, **21**(1): 21–27.
- Bubenik, A. 1966. *Das geweih*. Paul Parey Verlag, Hamburg, Germany.
- Bubenik, G.A. 1990. The antler as a model in biomedical research. In *Horns, pronghorns, and antlers: evolution, morphology, physiology and social significance*. Edited by G.A. Bubenik and A.B. Bubenik. Springer-Verlag, New York, pp. 474–487.
- Bubenik, G. 1991. Regulatory mechanisms of the antler cycle and the selection of deer breeding stock by endocrine tests. In *Wildlife production: conservation and sustainable development*. Edited by L.A. Reneker and R.J. Hudson. AFES Misc. Publ. No. 91-6, University of Alaska Fairbanks, Fairbanks, pp. 521–529.
- Bubenik, G.A. 2002. All you need to know about growing antlers: why, where, when and how they grow. In *Proceedings of the Third World Deer Farming Congress*, Austin, Tex., 20–23 February 2002. Edited by J.B. Wood. North American Deer Farmers Association (NADeFA), Lake City, Minn., pp. 163–176.
- Bubenik, G.A., and Bubenik, A.B. 1986. Phylogeny and ontogeny of antlers and neuro-endocrine regulation of the antler cycle — a review. *Saugetierkd. Mitt.* **33**: 97–123.
- CIE. 1976. CIE, Commission Internationale de l'Éclairage, Colorimetry. Publ. No. 15, Bureau Central CIE, Vienna, Austria.
- Clutton-Brock, T.H., Albon, S.D., and Guinness, F.E. 1982. Red deer, behavior and ecology of two sexes. Chicago University Press, Chicago.
- Clutton-Brock, T.H., Albon, S.D., and Guinness, F.E. 1986. Great expectations: dominance, breeding success and offspring ratios in red deer. *Anim. Behav.* **34**(2): 460–471. doi:10.1016/S0003-3472(86)80115-4.
- Demaria, M.R., McShea, W.J., Koy, K., and Maccina, N.O. 2004. Pampas deer conservation with respect to habitat loss and protected area considerations in San Luis, Argentina. *Biol. Conserv.* **115**(1): 121–130. doi:10.1016/S0006-3207(03)00101-0.
- Fisher, M.W., Meikle, L.M., and Johnstone, P.D. 1995. The influence of the stag on pubertal development in the red deer hind. *Anim. Sci.* **60**: 503–508.
- González, R., Orgeur, P., and Signoret, J.P. 1988. Luteinizing hormone, testosterone and cortisol responses in rams upon presentation of estrous females in the nonbreeding season. *Theriogenology*, **30**(6): 1075–1086. doi:10.1016/0093-691X(88)90282-8. PMID:17087896.
- González, R., Levy, F., Orgeur, P., Poindron, P., and Signoret, J.P. 1991. Female effect in sheep. II. Role of volatile substances from the sexually receptive female; implication of the sense of smell. *Reprod. Nutr. Dev.* **31**(1): 103–109. doi:10.1051/rnd:19910110. PMID:2043257.
- González, S., Maldonado, J.E., Leonard, J.A., Vilá, C., Duarte, J.M., Merino, M., Brum-Zorrilla, N., and Wayne, R.K. 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Mol. Ecol.* **7**(1): 47–56. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00303.x. PMID:9465416.
- González, S., Alvarez-Valín, F., Maldonado, J.E., and Riddle, B.R. 2002. Morphometric differentiation of endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with descriptions of new subspecies from Uruguay. *J. Mammal.* **83**(4): 1127–1140. doi:10.1644/1545-1542(2002)083<1127:MDOEPD>2.0.CO;2.
- Green, M.J.B. 1987. Scent marking in the Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*). *J. Zool. Ser. B*, **1**(4): 721–737.
- Hosack, D.A., Miller, K.V., Marchinton, R.L., and Monfort, S.L. 1997. Ovarian activity in captive Eld's deer (*Cervus eldi thomasi*). *J. Mammal.* **78**(2): 669–674. doi:10.2307/1382918.
- Hosack, D.A., Miller, K.V., Warr, L.H., Mashburn, K.L., Morrow, C.J., Williamson, L.R., Marchinton, R.L., and Monfort, S.L. 1999. Stag exposure advances the LH surge and behavioral estrus in Eld's deer hinds after CIDR device synchronization of estrus. *Theriogenology*, **51**(7): 1333–1342. doi:10.1016/S0093-691X(99)00077-1. PMID:10729097.
- Illius, A.W., Haynes, N.B., and Lamming, G.E. 1976. Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and be-

- behaviour in the ram. *J. Reprod. Fertil.* **48**(1): 25–32. PMID: 987244.
- IUCN. 2008. The IUCN red list of threatened species. Available from <http://www.iucnredlist.org> [accessed 28 October 2008].
- Jackson, J., and Giullietti, J. 1988. The food habits of pampas deer *Ozotoceros bezoarticus celer* in relation to its conservation in a relict natural grassland in Argentina. *Biol. Conserv.* **45**(1): 1–10. doi:10.1016/0006-3207(88)90048-1.
- Jackson, J.E., and Langguth, A. 1987. Ecology and status of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Argentinian pampas and Uruguay. In *Biology and management of the Cervidae*. Edited by C. Wemmer. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. pp. 402–409.
- Junguis, H. 1975–1976. Status and distribution of threatened deer species in South America. Report to SSC/IUCN Specialist Deer Group. In *World Wildlife Fund Yearbook*, Gland, Switzerland. pp. 203–217.
- Komers, P.E., Birgesson, B., and Ekvall, K. 1999. Timing of estrus in fallow deer is adjusted to the age of available mates. *Am. Nat.* **153**(4): 431–436. doi:10.1086/303185.
- McComb, K. 1987. Roaring by red deer stags advances the date of oestrus in hinds. *Nature (London)*, **330**(6149): 648–649. doi:10.1038/330648a0. PMID:3683584.
- Moore, G.H., and Cowie, G.M. 1986. Advancement of breeding in non-lactating adult red deer hinds. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* **46**: 175–178.
- Shipka, M.P., Rowell, J.E., and Ford, S.P. 2002. Reindeer bull introduction affects the onset of the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* **72**(1–2): 27–35. doi:10.1016/S0378-4320(02)00072-6. PMID:12106963.
- Ungerfeld, R. 2007a. Socio-sexual signalling and gonadal function: opportunities for reproductive management in domestic ruminants. In *Reproduction in domestic ruminants VI*. Edited by J.I. Juengel, J.F. Murray, and M.F. Smith. Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 207–221.
- Ungerfeld, R. 2007b. Social factors and ovarian function. In *Novel concepts in ovarian endocrinology*. Edited by A. González-Bulnes. Transworld Research Network, Kerala, India. pp. 169–221.
- Ungerfeld, R., and Silva, L. 2004. Ewe effect: endocrine and testicular changes in experienced adult and inexperienced young Corriedale rams used for the ram effect. *Anim. Reprod. Sci.* **80**(3–4): 251–259. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.07.002. PMID:15036501.
- Ungerfeld, R., González-Sierra, U.T., and Bielli, A. 2008a. Seasonal antler cycle in a herd of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in Uruguay. *Mamm. Biol.* **73**(5): 388–391. doi:10.1016/j.mambio.2007.08.006.
- Ungerfeld, R., Bielli, A., González-Pensado, S.X., Villagnán, M., and González-Sierra, U.T. 2008b. Antler size and weight in a herd of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Mamm. Biol.* **73**(6): 478–481. doi:10.1016/j.mambio.2007.12.004.
- Verme, L.J., Ozoga, J.J., and Nellist, J.T. 1987. Induced early estrus in penned white-tailed deer does. *J. Wildl. Manage.* **51**(1): 54–56. doi:10.2307/3801629.
- Whittle, C.L., Bowyer, R.T., Clausen, T.P., and Duffy, L.K. 2000. Putative pheromones in urine of rutting male mouse (*Alex alex*): evolution of honest advertisement? *J. Chem. Ecol.* **26**(12): 2747–2762. doi:10.1023/A:1026485725805.



39

FEMALE EFFECT ON PAMPAS DEER (*Ozotoceros bezoarticus*): SEMEN DIFFERENCES BETWEEN MALES IN PERMANENT CONTACT OR ISOLATED FROM FEMALES

Villagrán M1, Beracochea F1, Sestelo A2, González-Pensado S1, Ungerfeld R1

1Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

2Fundación Bioandina Argentina – Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina

matiasv06@gmail.com

In deer, information regarding socio-sexual stimulation is scarce and mainly related to male effect. In male deer, seminal characteristics are dependent on testosterone concentrations. Antler cycle and antler characteristics are indirect indicators of testosterone secretion. Pampas deer is a southamerican species considered near threatened (IUCN), from which the largest semi-captive population in the world is located at the Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (ECFA, Uruguay). It is suggested that differences in pampas deer antler characteristics from males in contact or absence of females could be related with greater testosterone secretion stimulated by females (Ungerfeld et al., 2009; *Can. J. Zool.* 87:734-739). The aim of this work was to determine if in pampas deer semen characteristics are improved by permanent contact with females. This work was done at the ECFA, where animals were organized in five breeding groups, composed by 1 adult male (5-6 years old) and 5-10 hinds, allocated in a 0,5-1 ha paddock, and another group composed by six adult males (similar age and characteristics) located in a different paddock separated from paddocks containing females (minimum distance=3m). During November (spring) 2009, semen was collected by electroejaculation under anesthesia from males in contact with hinds (n=5) or isolated from females (n=6). The following seminal parameters were evaluated: volume, quality (0-5 scale), sperm concentration (spermatozoas x 10⁶/ml), total spermatozoas in the ejaculate (spermatozoas x 10⁶), percentages of sperm motility, progressive motility, spermatozoa with morphological abnormalities, spermatozoa with normal acromosomes, and spermatozoa with normal membrane function (15 minutes after incubation, evaluated by HOST). Variables were analyzed by students' t test. Data from total spermatozoas in the ejaculate was previously normalized by log transformation. Greater volume (545.0 ± 64.9 vs 346.0 ± 84.4 µl; P=0.04), quality (4.0 ± 0.3 vs 3.1 ± 0.3; P= 0.03) and progressive motility spermatozoas (58.0 ± 9.0% vs 31.4 ± 6.8%; P=0.02) were collected from males in direct contact with females. Percentage of motile spermatozoas tended to be greater in semen from males in contact with hinds than isolated males (72.0 ± 6.6% vs 57.7 ± 8.8%; P=0.10). There were no differences in total spermatozoas in the ejaculate (113.0 ± 45.7 spermatozoas x 10⁶; P=0.40), spermatozoas with morphological abnormalities (78.2 ± 2.9%; P=0.36), with normal acrosoma (69.6 ± 3.2%; P=0.19), and with normal membrane function (72.9 ± 2.7; P=0.48). Direct contact with hinds stimulated some parameters of pampas deer males semen, probably through an increase in testosterone secretion. As far as we know, this is the first report about a female stimulation of seminal characteristics in ruminants.