

Máster en Investigación básica y aplicada en Recursos Cinegéticos

Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC)- Universidad de Castilla la Mancha (UCLM)

*“Caracterización morfológica de cuerpos lúteos y desarrollo folicular en ciervas Ibéricas (*Cervus elaphus hispanicus*) de vida libre: Utilidad y limitaciones para la monitorización del estatus reproductivo en estudios de dinámica poblacional”*

Autora: Elena Narváez Moreno, NIF: 40988657-N

VºBº Tutores:

Dra. Concepción Azorit Casas

Dr. José Julián Garde López Brea



Ciudad Real, 26 de noviembre de 2014

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| <i>Resumen</i> | 2 |
| <i>Introducción</i> | 3 |
| <i>Justificación y Objetivos</i> | 9 |
| <i>Área de estudio</i> | 10 |
| <i>Material y Métodos</i> | 12 |
| 1. <i>Recolección del material y características de los animales muestreados: determinación de la edad</i> | 12 |
| 2. <i>Estudio macroscópico de los ovarios: Variaciones de peso y tamaño</i> | 13 |
| 3. <i>Cálculo del volumen ovárico</i> | 13 |
| 4. <i>Estudio de los folículos ováricos</i> | 13 |
| 5. <i>Estudio de los cuerpos lúteos</i> | 14 |
| a) <i>Morfología, tamaño e índices volumétricos</i> | 14 |
| b) <i>Cuerpos lúteos de gestación, accesorios y de regresión</i> | 14 |
| c) <i>Cuerpos albicans</i> | 15 |
| 6. <i>Análisis estadístico</i> | 16 |
| 7. <i>Estudio microscópico preliminar</i> | 17 |
| <i>Resultados y Discusión</i> | 18 |
| 1. <i>Morfometría macroscópica del ovario</i> | 18 |
| a) <i>Crías</i> | 18 |
| b) <i>Primalas</i> | 18 |
| c) <i>Hembras adultas</i> | 19 |
| 2. <i>Características discriminantes de los cuerpos lúteos de gestación</i> | 23 |
| 3. <i>Hallazgos microscópicos: descripción de hallazgos histológicos en los folículos y para la diferenciación de cuerpos lúteos de gestación</i> | 24 |
| a) <i>Folículo ovárico</i> | 24 |
| b) <i>Cuerpo lúteo</i> | 25 |
| <i>Conclusiones</i> | 26 |
| <i>Bibliografía</i> | 27 |

Resumen

Durante el ciclo reproductivo o estral de la hembra se suceden acontecimientos fisiológicos en el ovario a intervalos de tiempo cíclicos a causa de las variaciones de los niveles hormonales. El presente estudio persigue el reconocimiento de las estructuras en el ovario que aparecen como consecuencia de los citados cambios, con el fin de monitorizar los sucesos reproductivos que se desarrollan en ciervas ibéricas (*Cervus elaphus hispanicus*) en hábitats mediterráneos del sur de España.

Se examinaron 246 ovarios procedentes de 125 hembras abatidas en dos fincas de Sierra Morena oriental entre las temporadas de 2008 a 2014. Tras su sección sagital en láminas paralelas de 1 mm. de grosor se observaron macro y microscópicamente las diferentes estructuras presentes: folículos en diferentes estadios de desarrollo, cuerpos lúteos de gestación, regresión y accesorios, y *cuerpos albicans* no descritos anteriormente en esta subespecie de ciervo en estas localizaciones. Se estudió el número y tamaño de estas estructuras en relación con el tamaño de los ovarios, la edad, el mes de muerte y el estado de gestación. El estado gestacional se determinó por observación directa del feto en el útero. La existencia de partos en la temporada anterior se confirmó a través de la presencia de lactación y crías observadas durante los recechos en jornadas de caza. El peso y el volumen de los ovarios se estabilizó en la clase de edad 3 (a los 2,5 años) siendo también esta edad en la que más folículos preovulatorios aparecieron. No obstante, se detectó un 42% de gestaciones en primaras (ciervas de 1,5 años).

Se realizaron análisis de varianza para todas las muestras y un análisis discriminante aplicado a 119 cuerpos lúteos de hembras gestantes para diferenciar a través de índices de tamaño, el cuerpo lúteo de gestación del resto de cuerpos lúteos (accesorios y de regresión). Se obtuvo un modelo discriminante con un porcentaje de casos correctamente clasificados de más del 95%. De esta manera, a través de mediciones del cuerpo lúteo es posible el reconocimiento de gestación en sus primeros estadios, antes de que el feto sea visible. Se identifica el *cuerpo albicans* como un indicador potencial para la detección de partos. Algunos hallazgos histológicos como la presencia de más vascularización en cuerpos lúteos de gestación también permite su diferenciación.

Palabras clave: Ciervo ibérico, ovario, cuerpo lúteo, morfometría, estado reproductivo.

Introducción

El ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*), subespecie perteneciente a la especie *elaphus*, se encuentra bien diferenciada del resto de las doce subespecies de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) (Hilzheimer, 1909).

Un estudio reciente realizado por Fernández-García y sus colaboradores en la Universidad de Extremadura confirma la existencia de dos linajes genéticos de ciervo ibérico en España, gracias a la reconstrucción de la filogenia del ciervo ibérico a través de las mutaciones en la secuencia de ADN mitocondrial, y su comparación con la de otros ciervos europeos (Fernandez-García et al, 2014). Uno de estos linajes se encontraría exclusivamente en el sur-oeste peninsular y el otro hacia el nordeste de la península, en consonancia con los postulados de Ángel Cabrera, que en 1911, ya describía dos subespecies de ciervo en la península ibérica en base a sus diferencias fenotípicas. La explicación de la existencia de estos linajes podría ser la separación de la subespecie principal en diferentes refugios durante la última glaciación (Fernández-García et al, 2014).

Esta especie presenta gran dimorfismo sexual marcado por la diferencia en el tamaño entre machos y hembras y por el desarrollo de cuernas de naturaleza ósea en los machos a partir del primer año de edad. Su distribución incluye la mayor parte de los hábitats presentes en la Península Ibérica, encontrándose en bosque mediterráneo y dehesas de encinas y monte bajo en el centro y suroeste, y en los bosques de robles y hayas en la mitad norte.

La elevada densidad que presentan sus poblaciones puede llegar a comprometer la conservación de sus hábitats naturales. En este caso, se hace necesario un control poblacional que garantice un nivel acorde a la capacidad de carga disponible en el medio. El ciervo es una especie cinegética clave de la que deriva una actividad económica destacable en muchos lugares de la Península Ibérica. En los terrenos de aprovechamiento cinegético es la pieza principal de la montería y gran parte de la gestión de los mismos gira en torno ella.

El conocimiento de los parámetros reproductivos es de gran importancia para comprender la dinámica de sus poblaciones y para su correcta gestión como recurso biológico renovable.

Según la presentación de sus ciclos reproductivos, la hembra de ciervo ibérico es poliéstrica estacional de días cortos, es decir, presenta una serie de ciclos estrales en la época del año en que los días se hacen más cortos.

A continuación se detallan diversos parámetros reproductivos, descritos en trabajos que se han desarrollado principalmente sobre hembras de ciervo ibérico mantenidas en cautividad.

Mediante la aplicación de implantes de melatonina a ciervas ibéricas nulíparas en cautividad, Santiago-Moreno et al. (2010) explica que la duración media de la primera estación reproductiva es de 4,3 meses, sucediéndose durante la misma, 6,67 ciclos estrales.

García et al. (2002b) y García (2000) en sus trabajos sobre características reproductivas de la hembra de ciervo ibérico en condiciones de semilibertad apuntan que “siempre y cuando las hembras no queden gestantes, se suceden entre 5 y 10 ciclos a lo largo de la estación reproductiva, siendo la media de $8,06 \pm 0,35$ ciclos por cierva y estación reproductiva, en el periodo de septiembre a abril... siendo la duración media de su estación reproductiva de $5,73 \pm 1,07$ meses. En un 25% de las hembras se ha observado la existencia de un ciclo estral previo al inicio de la estación reproductiva continuada que se presenta entre 11 y 48 días antes de la serie de ciclos estrales sucesivos”. Este mismo autor describe la duración de la gestación en unos 231 días (221-242) mediante seguimiento de los niveles plasmáticos de progesterona (García et al 2001). En 2003 el mismo autor y sus colaboradores caracterizan el ciclo estral de las ciervas ibéricas en $19,57 \pm 0,29$ días (rango= 14-24 días), aumentando la duración de los mismos con el transcurso de la época reproductiva (García et al. 2003).

La cierva, al igual que otras especies, para lograr éxito en el periodo de cría desarrolla la estrategia de adaptar su fenología reproductiva al momento del año más adecuado, con el objeto de que los partos y el inicio de la lactancia se produzcan a término de la estación primaveral, en que las condiciones ambientales y la disponibilidad de alimento son las más adecuadas. Según esta estrategia el celo o berrea sucederá a inicios de otoño o alrededor de la segunda quincena de septiembre y la primera de octubre. La importancia de esta estrategia en poblaciones salvajes es apuntada en un estudio reciente sobre dos poblaciones de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) en Nueva Zelanda, una con 393 ciervas en estado natural y otra con 91 ciervas cuyos estros se sincronizan artificialmente. En este trabajo se demuestra que la duración del periodo gestacional es muy variable y está influida por varios factores medioambientales, confiriendo esta situación ventajas a los recién nacidos. Los mecanismos fisiológicos por los que se desarrolla aún se desconocen con exactitud. Se postula que la variación de factores como calidad y consumo voluntario de alimento en las últimas etapas de la gestación influyen directamente en la diferencia de crecimiento entre fetos concebidos en fases tempranas y tardías (Scott et al., 2008).

Sin embargo, en condiciones de vida libre, no siempre se da este tipo de sincronización del periodo de celo, sino que se produce un alargamiento prolongado de la berrea y consiguiente época de partos. Esto tiene consecuencias negativas en los individuos y la población. Así, para ciervas ibéricas García et al (2001) afirman que los retrasos en la

fecha natural de los nacimientos reducen la producción de leche y sus nutrientes, produciendo un menor crecimiento de los gabatos. Sobre la misma cuestión Carranza afirma que existe una considerable variación entre poblaciones en el momento en el que sucede el celo y consecuentemente, los partos. Esta variación tiene que ver con que la berrea se alarga o se retrasa produciendo crías retrasadas cuando se dan malas condiciones (Carranza, 2011).

Numerosos autores coinciden en que las hembras en buenas condiciones alcanzan la pubertad entre los 14 y los 16 meses (Kelly y Moore, 1977 y Fisher y Fennessy, 1985) en ciervo rojo, y (Peña et al, 1998) en ciervo ibérico. La madurez sexual está descrita a los 2 años o a partir del segundo otoño de vida debido a que se ha comprobado que depende más del peso que de la edad del animal (Kelly y Moore. 1977).

Un trabajo que emplea estos aspectos para describir el rendimiento reproductivo por edades en ciervo rojo en la Isla de Rhum en Escocia, relaciona frecuencia en los partos, sexo de la descendencia, peso al nacimiento y fecha de nacimiento con edad de las madres, estado reproductivo en la estación previa de las mismas, área de muestreo y año de nacimiento. Los resultados indican que sobre un total de 275 hembras no se observa fertilidad en hembras de 2 años de edad; las hembras de 3 años presentan una fertilidad menor que las de 4 años y éstas, menor que las hembras de 5 a 10 años, observándose una tendencia a la reducción no significativa en la tasa de fertilidad en hembras mayores de 12 años (Guinness et al, 1978). El declive en la capacidad reproductiva está descrita en otros trabajos (Asher et al., 1996a; Montoya, 1999) que indican que se produce de los 12 a los 13 años de edad. Diversos autores coinciden que, con una cría por parto, la tasa reproductiva en ciervo rojo es baja (Clutton-Brock et al. 1982; Adam, 1985).

Todos estos trabajos persiguen el conocimiento de los aspectos reproductivos de los animales de vida libre, sobre todo aplicado al conocimiento de la dinámica de sus poblaciones. Con el fin de obtener información sobre aspectos reproductivos, otros autores han utilizado y utilizan el examen de tracto reproductor y ovarios de las hembras (Cheatum, 1949; Golley, 1957, Trauger y Haugen, 1962; Thomas y Cowan, 1975; Kelly y Challies, 1978; Harder y Moorhead, 1980; Thomas, 1983; Langvatn, 1992; Anouk, 2010). A continuación se hace una revisión bibliográfica sobre trabajos en los que las características de los ovarios y el desarrollo e involución de sus estructuras aportan datos fiables sobre la fisiología reproductiva de los ciervos.

Cheatum después de varias publicaciones con Morton en 1942 y 1946, publicó un trabajo en el que empleaba el cuerpo lúteo para determinar la gestación y las variaciones en la fertilidad del ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus borealis*) en Nueva York

(Cheatum, 1949). En él, describe e interpreta los cambios que sufren las distintas estructuras en el ovario según el estadio de reproducción en el que se encuentra una hembra. Cheatum diferencia el cuerpo lúteo de gestación de los pequeños cuerpos luteinizados no asociados con fertilización mediante las diferencias en su tamaño. Los cuerpos lúteos que aparecen en un ovario están asociados con la tasa de ovulación de la presente estación reproductiva y el *cuerpo albicans* es indicativo de la tasa de ovulación de la estación anterior. Describe el *cuerpo albicans* como una cicatriz que aparece al regresar del cuerpo lúteo de gestación tras el parto, al ser éste comprimido por el desarrollo de los nuevos folículos, y que su tamaño está relacionado con la fecha del parto oscilando entre 0.1 y 5 mm. Los *cuerpos albicans* procedentes de los cuerpos lúteos de gestación persisten en el ovario al menos ocho meses después del parto. Describe también que las cicatrices de folículos luteinizados no asociados con un proceso de gestación no muestran evidencia de pigmentación. Este trabajo fue el primero en plantear que el análisis de ovarios puede resultar útil en la monitorización de los eventos reproductivos en ciervas.

También en ciervo de cola blanca Trauger y Haugen (1962) examinan las estructuras en 425 pares de ovarios de ciervas de cola blanca (*Odocoileus virginianus borealis*) en Iowa. Sus resultados muestran que crías menores de 1 año presentan una media de 1,09 cuerpos lúteos en su primer invierno y una de 0,87 cuerpos albicans entre las edades de 1 y 2 años, no hallándose cuerpo albicans en ninguna hembra en su primer año de vida. Hembras adultas presentan una media de 2,27 cuerpos lúteos por cierva y de 2,21 cuerpos albicans.

Otro estudio en ciervo de cola blanca es el que realizan Harder y Moorhead (1980) que describen el desarrollo del cuerpo lúteo y los niveles de progesterona en el plasma asociados con el comienzo de la temporada de cría. En él se diferencian macro y microscópicamente de forma detallada dos tipos de cuerpos lúteos, el cuerpo lúteo activo de una ovulación reciente o de una reciente gestación, y el cuerpo lúteo en regresión de un ciclo previo de la misma estación. Según Harder et al (1980), el primer tipo de cuerpo lúteo que se observa en el ovario presenta un tamaño de 6 a 10 mm. de diámetro y el segundo tipo es de un tamaño reducido, entre 2 y 4 mm.

Asimismo, en ciervo de cola negra (*Odocoileus hemionus*) Golley, (1957) determina la incidencia en la ovulación mediante el recuento de los folículos ovulados por hembra durante el ciclo estral en el que queda gestante. También realiza un recuento de las cicatrices que se encuentran en degeneración y que proceden de cuerpos lúteos de gestación de un parto anterior (degeneración de tejido luteal que desemboca en cicatrices de tejido conectivo, también denominados cuerpos albicans).

También en una subespecie de ciervo de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) en Canadá, Thomas (1983) utiliza las edades de las hembras, número de fetos en útero, cuerpos lúteos y *cuerpos albicans* en los ovarios para obtener radios de fertilidad por edades. Anteriormente, Thomas y Cowan (1975) habían determinado que en esta subespecie de ciervo de cola negra es necesario que las hembras ovulen al menos dos veces antes de quedar gestantes tras estudiar los ovarios de 444 hembras, explicando así que tras la primera ovulación, el folículo ovulatorio o de Graaf genera un cuerpo lúteo y el desarrollo de una nueva generación de folículos.

Recientemente se desarrolla un estudio sobre dinámica de poblaciones en ungulados nórdicos que presentan altas densidades en la isla de Anticosti, en Québec, Canadá (Simard, 2010). Entre otros, se estudia el esfuerzo reproductivo y la monitorización de la lactación en 811 hembras adultas obtenidas mediante sesiones de caza. Simard utiliza los *cuerpos albicans* para determinar las hembras que han sufrido alguna reproducción anterior y los *cuerpos rubrum* para determinar las hembras que se han reproducido en la estación inmediatamente anterior. Describe como *cuerpo rubrum* aquella cicatriz de coloración blanquecina que persiste en los ovarios de 6 a 10 meses después del parto. Así, el número de *cuerpo rubrum* hallados se utilizan como indicadores fiables del número de fetos alumbrados en la estación inmediatamente anterior.

De forma específica en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) Langvatn (1992) realizó un análisis de ovarios en cuatro grupos de ciervas procedentes de una Estación de Investigación en Orkdal en Noruega y alrededores, y lo combinó con análisis reproductivos recopilados de bibliografía relevante. Así, desarrolló un trabajo que describe macroscópicamente las estructuras luteales y sus estadios de regresión. Langvatn describe hasta 8 estructuras distintas pero señala que la confusión entre las diferentes estructuras en un estudio macroscópico es fácil, siendo necesario un examen microscópico que lo apoye. Algunas de las estructuras descritas son el cuerpo lúteo de una gestación activa; el cuerpo lúteo procedente de una ovulación no productiva de la misma estación; el *cuerpo rubrum* procedente de la regresión de un cuerpo lúteo de gestación de hace menos de 12 meses (del parto inmediatamente anterior a la estación estudiada) y el *cuerpo albicans* procedente de la regresión de un cuerpo lúteo de gestación perteneciente a un parto de hace más de 12 meses.

También en ciervo rojo, Kelly y Challies (1978) estudian la actividad ovulatoria antes del comienzo de la estación de cría, en ovarios de hembras abatidas en cuatro periodos diferenciados en Westland, Nueva Zelanda. Distinguen el cuerpo lúteo de gestación de los cuerpos lúteos accesorios cuando aparecen ambos en el mismo animal, resultando el tamaño

del cuerpo lúteo accesorio cerca de la mitad que el de gestación. Postulan que el cuerpo lúteo accesorio desaparece de una estación reproductiva a la siguiente debido a que no aparece ningún tipo de cuerpo lúteo en 74 muestras de hembras no gestantes, fuera de la estación de cría.

A pesar de la existencia de una prolija literatura científica sobre el uso de estas estructuras ováricas en otras latitudes, no existe ningún estudio específico sobre inspección *postmortem* de ovarios de ciervas ibéricas en la Península Ibérica. Aunque existen trabajos en los que se describe el análisis macroscópico de los ovarios entre los métodos de monitorización de la actividad reproductiva (García, 2000; Santiago-Moreno, 2002), no he encontrado ninguno que desarrolle ni utilice esta metodología de forma específica con objetivos de monitorización de poblaciones silvestres, o combinando el análisis macro y microscópico de los ovarios.

Justificación y Objetivos

La literatura disponible está basada principalmente en estudios realizados sobre otras especies de cérvidos, en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) en otras latitudes; o bien sobre ciervas ibéricas (*Cervus elaphus hispanicus*) mantenidas en cautividad.

En este trabajo se pretende la identificación y reconocimiento de las diferentes estructuras presentes en los ovarios así como la valoración de su uso para determinar el estado reproductivo en ciervas ibéricas de vida libre en Sierra Morena Oriental en el sur de España. Para ello, se describen las características macroscópicas y algunas microscópicas de los diferentes tipos de cuerpos lúteos y folículos ováricos en distintas fases de desarrollo. La identificación de cuerpos lúteos de gestación permite la detección de hembras gestantes incluso en periodos en los que aún no son visibles los fetos. Circunstancia que es frecuente al realizarse la mayor parte de los muestreos científicos a principios de la temporada oficial de caza. El estudio de los *cuerpos albicans* podría además aportar información sobre la existencia de partos anteriores.

La caracterización de parámetros reproductivos y la determinación de la condición de gestación en las hembras, así como la edad a la primera gestación y la senescencia reproductiva o la fenología reproductiva son de gran importancia para conocer la tasa de crecimiento de una población y su dinámica poblacional. Todos estos parámetros sobre la historia de vida de la especie son fundamentales para una gestión adecuada de la especie en cada circunstancia. El estudio de los *cuerpos albicans* podría aportar información sobre la existencia de partos anteriores.

Por todo ello los objetivos que se persiguen en este trabajo son:

1. Análisis morfométrico de los ovarios de ciervas de vida libre.
2. Desarrollo de metodología útil para discriminar de forma objetiva los cuerpos lúteos de gestación a través de su forma y tamaño.
3. Descripción e interpretación de cicatrices ováricas subsecuentes a partos y denominadas por otros autores como *cuerpos albicans*.

Área de estudio

El área de estudio se centró en dos fincas en la vertiente sur de Sierra Morena Oriental en el Parque Natural de la Sierra de Andújar, Jaén: Lugar Nuevo con coordenadas en UTM huso 30 (413089, 4224800) y Selladores-Contadero con coordenadas UTM huso 30 (427539, 4250133) (ver Figura 1).



Figura 1. Mapa de situación del área de estudio. Fincas de donde proceden los ovarios analizados en color gris.

A nivel macroclimático, la zona de estudio se caracteriza por un clima mediterráneo, con inviernos suaves y veranos muy cálidos y secos, con una precipitación anual moderada (~600 mm), aunque de modo irregular entre años y con un mínimo en julio a causa de tormentas veraniegas. Habitualmente no se producen nevadas invernales ni precipitaciones en forma de granizo, salvo en pequeñas superficies de forma puntual.

La mayoría de los suelos de ambas fincas presentan reacción química entre neutra y moderadamente ácida y una buena calidad de materia orgánica propia de un mull forestal, debido a una rápida mineralización de la misma.

Corresponde a un bosque denso de encinas que en ocasiones puede albergar otros árboles (enebros, quejigos, alcornoques, etc.) y posee un sotobosque arbustivo no muy denso desarrollados sobre sustratos silíceos en ocasiones, y sobre calcáreos pero cuyos suelos pueden estar descarboxinados en otras. Son comunes las coscojas (*Quercus coccifera*) y otros arbustos perennifolios que forman las garrigas, en las cuales, el madroño (*Arbutus unedo*) es un elemento escaso. En ambos, principalmente en las solanas, se puede considerar la formación acebuchar-lentiscar con el acebuche (*Olea europaea*) como especie principal. Con una alta densidad de fauna cinegética, el acebuche es muy ramoneado, disminuyendo su

presencia hasta casi desaparecer, lo que deja al lentisco (*Pistacia lentiscos*) como especie predominante.

La vegetación actual se clasifica según la estructura de las formaciones vegetales predominantes y del valor de la cobertura arbórea en monte mediterráneo, pinar de repoblación, monte adhesado, lentiscar-acebuchar, matorral, herbazal, vegetación de ribera y plantaciones.

Material y métodos

1. Recolección del material y características de los animales muestreados: determinación de la edad

Los ovarios de 125 ciervas ibéricas fueron recogidos tras ser abatidas en monterías y caza selectiva en el área de estudio durante el periodo 2008-2014. Fue posible tener certeza de que un cuerpo lúteo era de gestación debido a que durante la recogida de muestras se anotó información adicional sobre presencia de feto. Cuando los investigadores realizaron los muestreos durante jornadas de cazas selectivas fue posible anotar si las hembras abatidas iban acompañadas de crías lactantes o no. Esta información fue de especial importancia en la interpretación de las cicatrices ováricas (especialmente los *cuerpos albicans*).

Finalmente se obtuvieron 246 ovarios, que ovarios fueron fijados en solución de formalina neutra tamponada al 10% o en medio Bouin de forma inmediata tras ser recogidos, para reducir la posibilidad de autólisis. Del total, 107 pares de ovarios se conservaron enteros para análisis macroscópicos, y tras su fijación en formol se pasaron a etanol al 70% para facilitar su manipulación. El resto, 32 ovarios, tras su fijación en medio de Bouin fueron incluidos en parafina y cortados con microtomo convencional a 4 micras para posteriormente ser teñidos con hematoxilina-eosina, y observados a microscopio óptico. Se obtuvieron así preparaciones microscópicas para el análisis histológico.

Para la determinación de la edad se utilizó el patrón de erupción dentaria (Azorit et al., 2002a) y para animales de más de 4 años de edad se realizaron cortes del primer molar para el recuento de marcas de crecimiento periódico en el cemento interradicular. Se utilizó una metodología petrográfica para molares sin descalcificar. La interpretación de las citadas marcas se basó en la estacionalidad (Azorit et al., 2002b) y procedimiento estandarizado descritos para el área de estudio (Azorit et al 2004). La edad de los animales varió entre los 6 meses y los 20,5 años. En la Tabla 1 se muestra las ciervas de las que proceden los ovarios analizados, agrupadas según su edad.

Tabla 1: Clases de edad y nº hembras por grupo.

| Clases de edad | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-----------------------|-------|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| Edad (años) | 0,5-1 | 1-2 | 2-4 | 4-6 | 6-9 | 9-14 | >14 |
| Nº de ciervas | 9 | 12 | 15 | 40 | 26 | 16 | 7 |

2. Estudio macroscópico de los ovarios: Variaciones de peso y tamaño

Todos los ovarios fueron pesados y medidos de forma individualizada. El peso en gramos se obtuvo mediante balanza digital analítica Denver con capacidad de 120 gr. y sensibilidad de 0,1 mg.

Se tomaron las medidas en milímetros de los tres ejes (longitud, anchura y grosor) máximos para cada ovario mediante calibre digital Mitutoyo con resolución de 0,01 mm. y un error de $\pm 0,02$ mm.

Las medidas de los ovarios incluidos en parafina no se utilizaron en el cálculo de medias debido a que pudieron haber sido alteradas durante su procedimiento de inclusión. Morfología y otros parámetros de estos ovarios sí fueron válidos en este examen.

3. Cálculo del volumen ovárico

Cada ovario fue seccionado sagitalmente con bisturí por el borde opuesto al hilio en secciones paralelas de 1 mm. de grosor en todo su volumen para observar las estructuras presentes visibles en cada una de las superficies (Figura 11A).

El volumen de los ovarios fue calculado a partir de las medidas de los 3 semiejes aplicando la fórmula $V = \frac{4}{3} \pi a b c$, siendo a, b y c la mitad de las longitudes de los tres diámetros, aplicando la metodología que emplean Thomas & Cowan, (1975).

Cada ovario fue seccionado sagitalmente con bisturí por el borde opuesto al hilio en secciones paralelas de 1 mm. de grosor en todo su volumen para observar las estructuras presentes visibles en cada una de las superficies (Figura 11A).

4. Estudio de folículos ováricos

Se realizó un recuento de folículos observados en las distintas secciones. Para su estudio fueron clasificados de una manera semicuantitativa según su tamaño en folículos pequeños si su eje longitudinal es menor de 2 mm., medianos si es mayor de 2 y menor de 5 mm., y folículos grandes si el eje longitudinal es mayor de 5 mm. De la revisión bibliográfica realizada no se obtiene información sobre el tamaño asociado a folículos maduros o de Graaf en ciervos. Pero en la descripción del mismo en la oveja (*Ovis aries*) se indica que: “folículos de más de 5 mm de diámetro exhibirán un patrón de onda, mientras que folículos de menos de 4 mm crecerán al azar” (Uribe-Velásquez et al. 2009) sin estar asociados a ovulaciones.

5. Estudio de los cuerpos lúteos

a) Morfología, tamaño e índices volumétricos

Los cuerpos lúteos se clasificaron según su morfología regular o irregular considerándose cuerpos lúteos de morfología regular aquellos de superficie uniforme que no presentaban grandes variaciones en su forma y cuerpos lúteos de morfología irregular aquellos no uniformes que presentaban alteraciones en la misma (bordes irregulares hasta festoneados u ondulados).

Se tomaron medidas de longitud y anchura máximas en la superficie de aquella sección del ovario en que el cuerpo lúteo presentó su mayor apariencia. Para obtener la medida del grosor se agruparon aquellas secciones sagitales del ovario con presencia de cuerpo lúteo descartando aquellas sin presencia.

El volumen de los cuerpos lúteos fue calculado de la misma manera que el de los ovarios, a partir de las medidas de los 3 semiejes aplicando la fórmula $V = \frac{4}{3} \pi a b c$ para cálculo de volumen de elipsoides (Thomas y Cowan, 1975).

Se calcularon dos índices para relacionar el tamaño de los cuerpos lúteos con los de los ovarios en los que se encuentran, uno relaciona ambos ejes longitudinales

$$\text{INDL} = \frac{\text{Eje long. CL}}{\text{Eje long. OV}} \quad \text{y el otro sus volúmenes: } \text{INDV} = \frac{\text{Volumen CL}}{\text{Volumen Ov}}$$

b) Cuerpos lúteos de gestación, accesorios y de regresión

Se pretende clasificar los cuerpos lúteos presentes en los ovarios en cuerpos lúteos *activos* o de gestación y cuerpos lúteos *inactivos*, mediante el empleo de los datos sobre su tamaño. Se consideran dos tipos de cuerpos lúteos *inactivos*, aquellos accesorios, generados a partir de un folículo maduro que libera un ovocito que no es fecundado, y, aquellos en degeneración procedentes de un cuerpo lúteo de gestación cuando deja de segregar progesterona.

Fue posible tener certeza de que un cuerpo lúteo era de gestación debido a que durante la recogida de muestras se anotó información adicional sobre presencia de feto. En hembras que presentaron más de un cuerpo lúteo en sus ovarios y en la toma de datos, se hubiera confirmado gestación, por observación directa de feto en el útero, el cuerpo lúteo de mayor tamaño se consideró como cuerpo lúteo de gestación.

Información sobre niveles de progesterona disponibles a partir de análisis en plasma sanguíneo (datos no incluidos en este trabajo) fueron utilizados de forma adicional para

confirmar gestación (niveles de progesterona mayores de 0,5 ng/ml) y cuerpo lúteo de gestación.

c) Cuerpos albicans

El cuerpo lúteo de regresión procedente de un cuerpo lúteo de gestación, después de un periodo de tiempo persiste en el ovario en forma de cicatriz coloreada y es denominado *cuerpo albicans*, que como se dijo en capítulos anteriores suele ser visible al menos durante 8 meses después del parto en otras especies (Cheatum, 1949). Cuando se realizaron los muestreos durante jornadas de cazas selectivas fue posible anotar si las hembras abatidas iban acompañadas de crías lactantes o no. Esta información fue de especial importancia en la interpretación de estas cicatrices ováricas.

Fue frecuente en los ovarios analizados de estas ciervas que iban con cría la observación de unas manchas que iban desde naranja brillante a marrón-anaranjado, cuyo tamaño es bastante inferior al de los cuerpos lúteos y que se podrían asociar a los *cuerpos albicans*. (Figura 11G, 11H y 11I).

Se anotó el número de estas estructuras en cada animal y se midió su eje longitudinal máximo.

6. *Análisis Estadístico*

Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.II.

a) Análisis de varianza: Puesto que la distribución de los datos fue normal, no existió ni sesgo ni curtosis y el test de Levene confirmó que no había diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones estándar con un nivel del 95% de confianza, fue utilizado un Análisis de varianza para analizar las diferencias entre grupos. Se aplicaron modelos ANOVA simple y multifactorial. Concretamente se aplicó ANOVA simple en 101 hembras, en las que se conocía con exactitud su estado de gestación, para determinar las diferencias en su incidencia según la clase de edad.

También se aplicó este modelo para determinar diferencias en peso, volumen y eje longitudinal entre los dos ovarios de un mismo animal en 50 pares de ovarios y entre los que no presentaban cuerpo lúteo y los que presentaban algún tipo de cuerpo lúteo en 105 ovarios. En 96 ovarios que presentaban algún tipo de cuerpo lúteo, se analizaron diferencias en peso y volumen entre ovarios que presentaban cuerpo lúteo de gestación y los que presentaban otro tipo de cuerpo lúteo.

Fueron utilizados modelos ANOVA multifactorial para evaluar diferencias en peso, volumen y eje longitudinal en 68 ovarios sin cuerpo lúteo según la clase de edad de los animales y mes de su muerte. Se aplicó este mismo modelo para determinar diferencias en el número de cuerpos lúteos accesorios o de regresión presentes en 79 ovarios sin cuerpo lúteo de gestación según el estado gestacional de las hembras y según el mes de su muerte, y para conocer si el volumen de 47 cuerpos lúteos de este tipo variaba para estos mismos niveles.

Las variaciones en el número de folículos grandes, medianos y pequeños según el estado gestacional de las hembras y la clase de edad fueron estudiadas en 93 ovarios que presentaban cuerpo lúteo de gestación.

b) Análisis discriminantes: Se aplicó este tipo de análisis para identificar las diferencias en el tamaño entre cuerpos lúteos de gestación o activos y cuerpos lúteos de regresión o inactivos.

Este procedimiento está diseñado para desarrollar un conjunto de funciones discriminantes, que pueden ayudar a predecir el tipo de cuerpo lúteo, con base en los valores de variables cuantitativas. 119 casos fueron utilizados para desarrollar un modelo que discrimine entre dos niveles de cuerpos lúteos: 1.- cuerpos lúteos de gestación, y 2.- cuerpos

lúteos de regresión y accesorios. Se utilizaron como variables predictorias los ejes longitudinales, los volúmenes y los índices tanto volumétricos como de longitud.

No se pudo obtener un modelo discriminante que pudiera diferenciar cuerpos lúteos accesorios de los de regresión.

Con posterioridad fueron utilizados 30 cuerpos lúteos pertenecientes a hembras cuyo estado de gestación era “*desconocido*” (test a ciegas) para probar el grado de certeza del modelo discriminante.

c) Regresión simple: Se emplearon modelos de regresión para evaluar las relaciones entre los valores obtenidos sobre las medidas de ambos ovarios en un mismo animal (peso, eje longitudinal y volumen). Mediante estos modelos se evaluó también la relación entre el tamaño del cuerpo lúteo asociado a gestación y el del ovario en el que se encuentra.

7. Estudio microscópico preliminar

La interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo se apoya en el examen microscópico de preparaciones histológicas de ovarios de animales de distintas clases de edad y en distintos estadios de desarrollo.

Se emplea microscopio óptico Leica modelo DM1000 para observación de las preparaciones pertenecientes a 7 hembras, cuyo estado reproductivo es conocido mediante observación de feto en útero, a 10, 20 y 40 aumentos.

Las fotografías son obtenidas mediante cámara Leica EC3 para lupa y microscopio óptico.

Resultados y Discusión

1. Morfometría macroscópica del ovario

a) Crías

Los ovarios prepúberes presentaron una superficie lisa en la que fue frecuente la aparición de unas invaginaciones, más numerosas en aquellos que contenían mayor número de folículos primarios.

Al corte sagital del ovario se observaron folículos en desarrollo de distintos tamaños. Fueron observados folículos grandes, de más de 5 mm. de longitud, que en ocasiones sobresalían sobre la superficie del ovario. Se observaron folículos de más de 5 mm. en 5 hembras de las 9 de esta categoría. Si en ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*), tal y como se describe en oveja (*Ovis aries*), los folículos de más de 5 mm. se consideran ovulatorios (Uribe-Velásquez et al. 2009), esto indicaría que hembras de alrededor de 12 meses de edad comienzan su actividad ovulatoria frente a 14-16 meses que apuntan algunos autores (Kelly y Moore, 1977; Fisher y Fennessy, 1985).

No se observó ninguna cicatriz ovárica.

b) Primaras

Las estructuras descritas macroscópicamente en la superficie seccionada del ovario en primaras fueron folículos en distintos estadios de desarrollo (Figura 11D), cuerpos lúteos de gestación activos (en 5 ciervas de las 12 primaras analizadas) y cuerpos lúteos en regresión o inactivos (Figura 11E y 11F).

En 2 hembras gestantes se encontró un cuerpo lúteo activo de gestación y otro cuerpo lúteo, en el mismo ovario. En este caso, al considerarse que en estas hembras no había habido partos en la estación anterior, los cuerpos lúteos observados se asociaron a accesorios, procedentes de una ovulación no productiva.

A través de técnicas laparoscópicas en hembras de gamo (*Dama dama*) Asher, 1985 determinó que aproximadamente una semana antes del primer estro todas las hembras habían ovocitado, y que en cada una había presente un cuerpo lúteo, llegando a la conclusión de que el aumento de progesterona asociado a estas hembras provenía de cuerpos lúteos de corta duración conocidas como ovocitaciones silenciosas (Asher, 1985). Así los cuerpos lúteos accesorios observados en las ciervas ibéricas de este trabajo podrían también asociarse a este tipo de ovulaciones. Macroscópicamente se observaron diferencias entre ambos tipos de cuerpos lúteos, con menor tamaño y morfología irregular para los cuerpos lúteos no gestacionales.

No se observó ninguna estructura de coloración marrón- anaranjada anteriormente descrita como cicatriz de un parto previo o *cueros albicans*.

c) Hembras adultas

Al corte sagital se observaron folículos en distintos estadios de desarrollo, cuerpos lúteos de diferentes tamaños y formas, y estructuras de coloración marrón-anaranjadas asociadas a cicatrices de partos previos (*cueros albicans*). Todas estas estructuras y su estadio de desarrollo según el mes de muerte se muestran de forma gráfica en la Figura 10.

Al igual que los folículos grandes, los cuerpos lúteos de gestación pueden sobresalir de la superficie del ovario. El número de folículos grandes máximo fue de 4 en un único ovario, y de 5 en un par de ovarios en el caso de dos hembras gestantes, lo que apunta que el desarrollo de folículos no estaría limitado por la gestación, tal y como apuntaban Kelly y Challies (1978) al describir la aparición de cuerpos lúteos accesorios durante la gestación (Kelly y Challies, 1978). El eje longitudinal mínimo para un cuerpo lúteo de gestación en este grupo es de 7,15 mm. y la máxima de 16,61 mm

De las 104 hembras pertenecientes a este grupo, en el 63,46% de los casos se determinó gestación por observación directa de feto en el útero.

Con respecto a las cicatrices pigmentadas que Cheatum identificaba en ciervas de cola blanca con una medida de entre 0,1 y 5 mm como *cueros albicans* (Cheatum, 1949), en este trabajo se describe la misma estructura para cierva ibérica con una medida máxima de 5,05 mm. En el 40,4% de las hembras adultas se observaron estas estructuras marrón-anaranjadas asociadas a partos previos.

Se confirmó gestación gemelar en una de las hembras de este grupo por observación directa de 2 fetos (macho y hembra) en el útero.

En la Tabla 2 se muestran los números de muestra y algunos datos sobre morfometría ovárica en los tres grupos principales de hembras.

Se detectó una correlación estadísticamente significativa ($p=0,0000$) (con un nivel de confianza del 95%) entre el peso, el volumen y eje longitudinal de ambos ovarios en un mismo animal. Para el peso el coeficiente de correlación fue 0,7146, para el volumen de 0,6810 y para el eje longitudinal de 0,6265. Pero, se observó una relación relativamente débil (coeficiente de correlación=0,3864) aunque también significativa ($p=0,0004$) entre el tamaño del cuerpo lúteo de gestación y el del ovario en el que se encuentra, lo que indicó que, hembras gestantes poseen un tamaño algo mayor en ovarios que presentan cuerpos lúteos de este tipo.

Tabla 2: Número muestras, medias de pesos de ovarios y de ejes longitudinales de ovarios y longitud máxima cuerpos lúteos y *cuerpos albicans*.

| GRUPOS DE EDAD | N (ovarios) | n (hembras) | GESTANTE | NO GESTANTE | MEDIA EJE LONG OVARIO (mm) | MEDIA PESOS OVARIOS (gr) | LONG. MÁXIMA CL (mm) | LONG. MÁXIMA C.A (mm) |
|----------------|-------------|-------------|----------|-------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|-----------------------|
| CRÍAS | 18 | 9 | 0 | 9 | 14,2 | 0,79 | NO | NO |
| PRIMALAS | 24 | 12 | 5 | 7 | 17,2 | 1,4 | 11,58 | NO |
| ADULTAS | 204 | 104 | 82 | 22 | 18,68 | 2,34 | 16,61 | 5,05 |

Las diferencias en el peso entre ambos ovarios de una misma hembra fueron significativas ($p=0,0046$) dependiendo de si existía o no cuerpo lúteo de gestación.

En las hembras gestantes se mostraron diferencias significativas en el peso ($p=0,0044$) y el volumen ($p=0,0015$) entre el ovario que portaba el cuerpo lúteo de gestación y el que no lo portaba, sin embargo, si el cuerpo lúteo no era de gestación las diferencias en peso y volumen de los ovarios no fueron significativas.

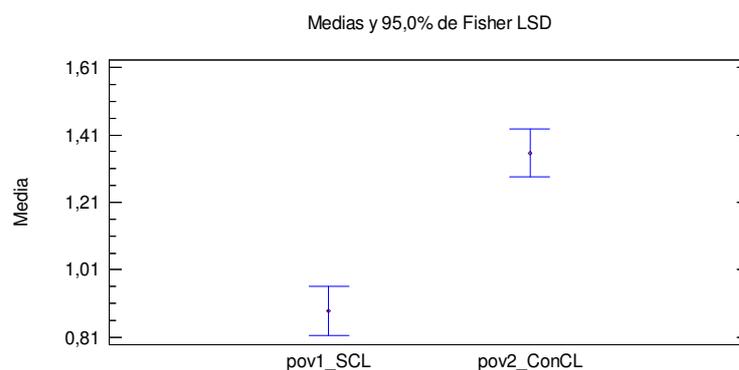


Figura 2. Diferencias pesos ovario 1 y 2 mismo animal.

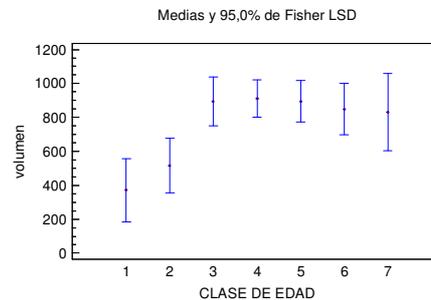
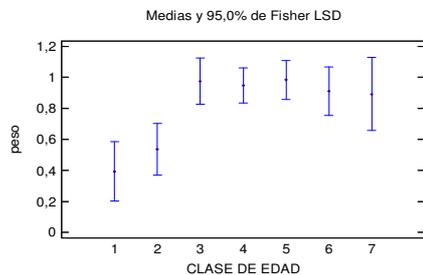
Por ello, para conocer cómo varía el tamaño de los ovarios con la edad, en el análisis se incluyeron únicamente ovarios que no presentasen cuerpo lúteo. Tanto peso ($p=0,0020$) como volumen ($p=0,0049$) variaron significativamente según la clase de edad produciéndose la estabilización del tamaño a la clase de edad 3 (a los dos años y medio) (ver Tablas 3-4 y Figuras 3-4).

Tablas 3 y 4. Diferencias entre medias de peso y volumen por clases de edad.

| Clase de edad | Casos | Media peso | Grupos Homogéneos |
|---------------|-------|------------|-------------------|
| 1 | 6 | 0,393333 | X |
| 2 | 8 | 0,53625 | XX |
| 7 | 4 | 0,8925 | XX |
| 6 | 9 | 0,912222 | X |

| | | | |
|---|----|---------|----|
| 3 | 10 | 893,326 | X |
| 5 | 14 | 894,259 | X |
| 4 | 17 | 910,061 | X |
| 1 | 6 | 372,018 | X |
| 2 | 8 | 516,865 | XX |
| 7 | 4 | 829,885 | XX |
| 6 | 9 | 847,667 | X |

| | | | |
|---|----|----------|---|
| 4 | 17 | 0,948824 | X |
| 3 | 10 | 0,975 | X |
| 5 | 14 | 0,983571 | X |



Figuras 3 y 4. Diferencias en peso y volumen entre ovarios por clases de edad.

Guinness et al.1978, afirmaban que las hembras de 3 años presentan una fertilidad menor que las de 4, y éstas, menor que las de 5 a 10 años; observándose una tendencia a la reducción no significativa en la tasa de fertilidad en hembras mayores de 12 años.

Nuestros resultados muestran diferencias en la presencia de gestación según las diferentes clases de edad ($p=0,0006$). No ocurre gestación en hembras menores de un año, siendo mayores las tasas de preñez en las ciervas a partir de la clase de edad 3 y reduciéndose en las más viejas, sucediendo un declive en la clase de edad 7, es decir, en hembras mayores de 14 años. Sin embargo el éxito reproductivo de las hembras de las clases de edad 3-6 es similar (ver Tabla 5 y Figura 5).

Tabla 5: Diferencias en la presencia de gestación por clases de edad.

| Nivel | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|-------|-------|----------|-------------------|
| 1 | 5 | 0,0 | X |
| 2 | 12 | 0,416667 | XX |
| 7 | 4 | 0,5 | XXX |
| 3 | 11 | 0,727273 | XX |
| 4 | 32 | 0,78125 | X |
| 5 | 24 | 0,791667 | X |
| 6 | 13 | 0,923077 | X |

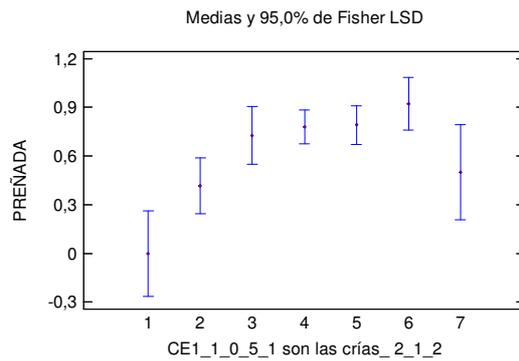


Figura 5: Diferencias gestacionales por clase de edad.

Guinness et al. describen la senescencia reproductiva a partir de los 12 a los 13 años de edad, al igual que otros (Asher et al. 1996 y Montoya 1999) pero en este trabajo se han detectado ciervas preñadas que superaban esta edad.

Sobre la tasa de gestación de las primaras, de las 12 estudiadas, 5 estaban gestantes, lo que supone un 42% que coincide con los valores de alrededor del 50% para la fertilidad media en esta edad, postulados por (Kelly y Moore, 1977). Fisher y Fennessy coinciden con éstos en que los porcentajes de ciervas que son cubiertas a los 16 meses de edad dependen fundamentalmente del peso vivo; pero en contraposición a los anteriores, ellos encuentran tasas de preñez más altas, de hasta el 70% (Fisher y Fennessy, 1985).

En ovarios sin cuerpo lúteo de gestación el número de folículos medianos también varió de forma significativa ($p=0,0113$) según la clase de edad de las hembras, sucediendo la mayor diferencia en la clase 3.

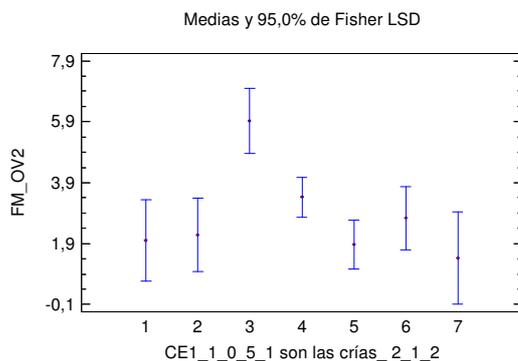


Figura 6: Diferencia en nº folículos medianos por clases de edad.

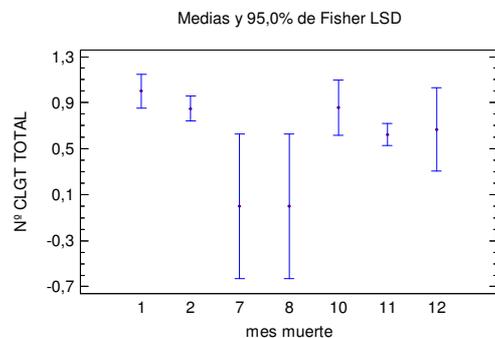


Figura 7: Diferencias en el número de cuerpos lúteos de gestación por mes de muerte.

Referente al número de cuerpos lúteos de gestación se observaron diferencias significativas en su número ($p=0,0143$) según el mes de muerte (ver Figura 7). Y en cuerpos lúteos no gestacionales se hallaron diferencias significativas en su número según el mes de muerte de las hembras ($p=0,0185$), y según si éstas estaban gestantes o no ($p=0,0045$); y en su volumen ($p=0,0069$) siendo éste mayor en las hembras no gestantes y que, por tanto, no presentaron cuerpo lúteo de gestación. En los meses de julio a octubre se observa una importante disminución en la presencia de este tipo de cuerpos lúteos, probablemente debido a la desaparición de los cuerpos lúteos de partos inmediatamente anteriores y/o a la ausencia de ciclo estral.

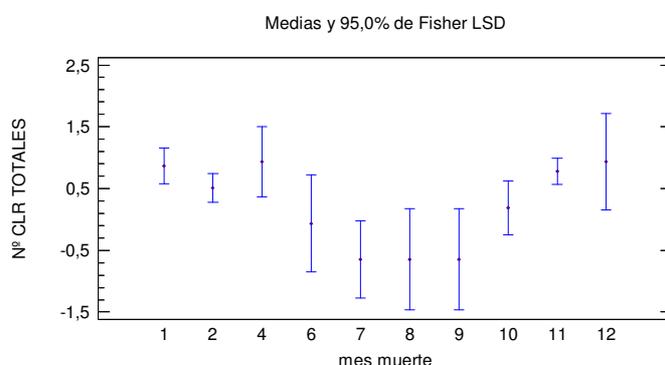


Figura 8: Número de cuerpos lúteos no gestacionales por mes de muerte.

2. Características discriminantes de los cuerpos lúteos de gestación

Se obtuvo un modelo discriminante con un porcentaje de casos correctamente clasificados del 96,64%. De esta manera, a través de mediciones del cuerpo lúteo es posible el reconocimiento de la gestación en sus primeros estadios, antes de que el feto sea visible. De entre los 4 factores de clasificación utilizados: longitud, volumen, índice de longitud (INDL) e índice de volumen (INDV), los coeficientes estandarizados más altos los obtuvieron la longitud y el índice de volumen (INDV). La Figura 9 muestra el diagrama de dispersión y la diferenciación entre ambos tipos de cuerpos lúteos.

El diagrama de dispersión expresó una clara diferencia entre ambos tipos de cuerpos lúteos.

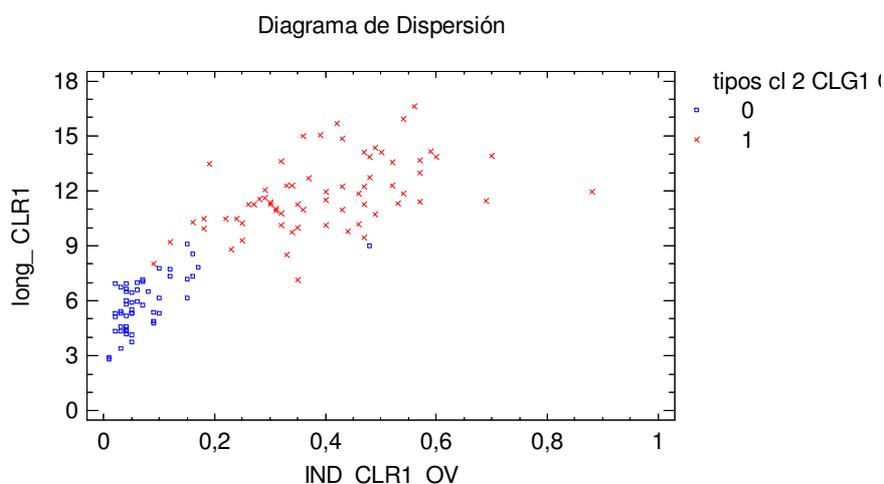


Figura 9. Diagrama de dispersión cuerpos lúteos tipo 0 y 1 de análisis discriminante. 0: cuerpos lúteos de regresión o accesorios. 1: cuerpos lúteos de gestación.

Tabla 6: Tabla de Clasificación

| Actual | Tamaño | Predicho | Tipo cuerpo lúteo: CLAccyReg:0; CLG:1 |
|---------------------------------------|----------|-----------------|--|
| Tipo cuerpo lúteo: CLAccyReg:0; CLG:1 | de Grupo | 0 | 1 |
| 0 | 52 | 51 (98,08%) | 1 (1,92%) |
| 1 | 67 | 4 (5,97%) | 63 (94,03%) |

No fue posible definir un modelo discriminante para discernir los cuerpos lúteos accesorios de los de regresión.

Posteriormente se incluyeron el índice de volumen y eje longitudinal de los 30 cuerpos lúteos problema y el modelo los analizó y clasificó dentro de alguno de los grupos quedando finalmente un porcentaje del 96,64% de los cuerpos lúteos totales correctamente clasificados. 16 cuerpos lúteos problema pertenecen al grupo de clasificación 1; y 14 al grupo de clasificación 2 (Tabla 6).

3. Hallazgos microscópicos: descripción de hallazgos histológicos en los folículos y para la diferenciación de cuerpos lúteos de gestación

a) Folículo ovárico

Según observación a microscopio óptico de muestras pertenecientes a 7 hembras cuyo estado reproductivo es conocido, se observaron en el estroma de la corteza del ovario junto a la túnica albugínea folículos con un ovocito en su interior. El tamaño del folículo indica el

grado de desarrollo del oocito. Éste se ve envuelto por una capa de células granuladas fusiformes conformando los folículos primordiales, algunas células granuladas fusiformes se transforman en cuboides conformando la denominada capa de la granulosa, y transformando asimismo los folículos primordiales en folículos primarios unilaminares. A partir de esta fase las células de la granulosa se dividen conformando varias capas de células alrededor del ovocito (figura 12I y 12J) y, externamente a éstas se organiza otra capa de células aplanadas que se denomina teca, que inicialmente tiene poco espesor pero progresivamente se va dividiendo en una teca interna con células más redondeadas, y una teca externa con células más aplanadas dando lugar al folículo secundario o primario multilaminar. A partir de éste, ya en la pubertad se produce la maduración de los folículos. Mediante la unión de las secreciones de mucopolisacáridos segregados por las células de la granulosa se va desarrollando el antro; el oocito queda en su interior; la zona pelúcida conforma una membrana que se encuentra alrededor del oocito; éste va aumentando de tamaño y queda unido a la capa de la granulosa por un istmo de células (folículo de Graaf) (figura 12K). La hormona FSH desencadena la proliferación de las células de la granulosa y aumenta el número de receptores de sí misma; las prolongaciones citoplasmáticas de las células de la granulosa penetran en la zona pelúcida (Greep, 1968).

b) Cuerpo lúteo

Si ocurre el embarazo se conforma el cuerpo lúteo (figura 12O). Las células de la granulosa y de la teca interna se retraen, se llenan de lípidos, sufren autólisis (luteólisis) y son fagocitadas por macrófagos; la zona se ve invadida por fibroblastos que producen fibras de colágeno y forman una estructura fibrosa. Ésta se hace cada vez más profunda hasta alcanzar la médula ovárica (figura 12M) y tras varios meses disminuye su tamaño hasta completar su función, en que experimenta un rápido proceso involutivo entrando sus células en degeneración grasa. Al mismo tiempo, el tejido conectivo se hialiniza y aparece como una masa de células grandes claras con núcleos picnóticos (Greep, 1968).

Aunque se trata de un estudio preliminar, se ha comprobado que el grado de vascularización sanguínea de los cuerpos lúteos de gestación es mayor al de los cuerpos lúteos de regresión o accesorios. Esta característica histológica podría servir también para la diferenciación de estas estructuras.

Conclusiones

1.- El peso y el volumen de los ovarios se estabilizó en las ciervas de Sierra Morena Oriental en la clase de edad 3 (a los 2,5 años) siendo también esta edad en la que más folículos preovulatorios aparecieron.

2.- Sin embargo, en primíparas (ciervas de 1,5 años) se detectaron tasas de preñez de hasta el 42%. Registrándose tasas de gestación similares en hembras de más de 14 años, lo que supone una senescencia reproductiva más tardía que lo encontrado por otros autores en otras zonas.

3.- Se detectó una sola gestación gemelar en una hembra adulta lo que supone una casuística de menos del 1%.

4.- Se obtuvo un modelo discriminante para diferenciar el cuerpo lúteo de gestación del resto de cuerpos lúteos (accesorios y de regresión) con un porcentaje de casos correctamente clasificados de más del 95%. Los factores de clasificación mejores fueron longitud e índice volumétrico.

5.- Algunos hallazgos histológicos como la presencia de más vascularización en cuerpos lúteos de gestación también permitió su diferenciación. Y el *corpus albicans* se mostró como un indicador potencial para la detección de partos previos.

6.- A través de mediciones del cuerpo lúteo y la histología ovárica es posible el reconocimiento de gestación en sus primeros estadios, aún antes de que el feto sea visible. Esto supone una herramienta de interés aplicado en la monitorización de las poblaciones de cérvidos de vida libre.

Bibliografía

- Adam, C.L., Moir, C.E., Atkinson, T., 1985. Plasma concentrations of progesterone in female red deer (*Cervus elaphus*) during the breeding season, pregnancy and anoestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*. 74, 631-636.
- Asher, C.L. (1985). Oestrus cycle and breeding season of farmed fallow deer, *Dama dama*. *J. Reprod. Fert.* 75: 521-529.
- Asher, G.W., Fisher, M.W., Fennessy, P.F. (1996a). Environmental constraints on reproductive performance of farmed deer. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 35-44.
- Azorit C, Analla, M, Carrasco R, Calvo JA, Muñoz-Cobo J 2002a. Teeth eruption pattern in red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) from southern Spain. *Annals of Biology* 24, 193–200.
- Azorit, C., Muñoz-Cobo, J., Analla, M. 2002b. Seasonal deposition of cementum in first lower molars from *Cervus elaphus hispanicus*. *Mammalian Biology* 67:1–3.
- Azorit, C., Muñoz-Cobo, J., Hervás, J., Analla, M. 2004. Aging through growth marks in teeth of Spanish red deer. *Wildlife Society Bulletin* 32(3): 702-710.
- Cabrera, A. 1911. Los ciervos de España. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, 11: 556-559.
- Carranza, J. 2011. Ciervo- *Cervus elaphus*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Salvador, A., Cassinello, J. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Cheatum, E.L., 1949. The use of corpora lutea for determining ovulation incidence and variations in the fertility of white-tailed deer. *Cornell Vet* 39, 282-291.
- Clutton-Brock, T., Guinness, F. E., Albon, S. D. 1982. *Red deer: Behavior and Ecology of Two Sexes*. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Fernández-García, J.L., Carranza, J., Martínez J.G., Randi, E. 2014. Mitochondrial D-loop phylogeny signals two native Iberian red deer (*Cervus elaphus*) Lineages genetically different to Western and Eastern European red deer and infers human-mediated translocations. *Biodiversity and Conservation* 23(537)-554.
- Fisher, M., Fennessy, P. 1985. Reproductive physiology of female red deer and wapiti. *Proc. of a Deer Course for Veterinarians, Deer Branch*: 88-100.
- García, A.J., 2000. Características reproductivas de la hembra adulta de ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) en condiciones de semilibertad. Tesis Doctoral. ETSIA de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete, España.

- García, A.J., Landete-Castillejos, T., Garde, J.J., Gallego, L. 2001. Aspectos reproductivos y productivos en el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). PR. Pequeños Ruminantes, 2: 22-26.
- García, A.J., Landete-Castillejos, T., Garde, J.J., Gallego, L., 2002b. Reproductive seasonality in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Theriogenology, 58, 1.553-1.562.
- García, A.J., Landete-Castillejos T., Garde J.J., Gallego L., 2003. Characteristics of the oestrous cycle of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) assessed by progesterone profiles. J Exp Zool 298A: 143-149.
- Golley, F. B. (1957). An appraisal of ovarian analysis in determining reproductive performance of black-tailed deer. -/. *Wildl. Manage.* 21 (1): 62-65.
- Greep, R.O. (1968). Histología. Ed: El Ateneo: 646-661.
- Guiness, F., Albon, S., Clutton-Brock, T. (1978). Factors affecting reproduction in red Deer (*Cervus elaphus*) hinds of Rhum. J. Reprod. Fert., 54: 325-334.
- Guzmán, J.N., Moro, J., Fernández, P., Pérez de Ayala, R., Carrasco, R., García, F.J., Narváez, E. (2012). Recuperación de las poblaciones de conejo silvestre y de territorios linceros en los Montes Lugar Nuevo y Selladores-Contadero. Andújar (Jaén).
- Harder, J., Moorhead, D., 1980. Development of corpora lutea and plasma progesterone levels associated with the onset of the breeding season in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Biol. Reprod. 22, 185-191.
- Hilzeimer, M. (1909). Neigen inselbewohnende Säugetiere zu einer Abnahme der Körpergrösse? Arch. Rass. Gessell. Biol. Leipzig, 3: 305-321.
- Kelly, R., Moore, G. 1977. Reproductive performance in farmed red deer. New Zealand. Agric. Sci., 11: 179-181.
- Kelly, R., Challies, C. 1978. Incidence of ovulation before the onset of the rut and during pregnancy in red deer hinds. New Zealand Journal of Zoology, 5: 817-819.
- Langvatn, R. (1992). Analysis of ovaries in studies of reproduction in red deer (*Cervus elaphus*, L.): application and limitations. Rangifer, 12: 67-91.
- Montoya, J.M., 1999. El ciervo y el monte. *Manejo y conservación*. Coediciones Fundación Conde del Valle de Salazar/Mundi-prensa. Madrid.
- Pérez, W. (2012). Anatomía del Aparato Reproductor del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). Maestría en Ciencias Biológicas. Subárea Zoología Facultad de Ciencias de la Universidad de la República de Uruguay.
- Peña E., García, A., Gallego, L., Garde, J.J., 1998. Estudio de la pubertad en la hembra de ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*). Proc I Symposium Internacional de Fauna Salvaje, organizado por WAVES. Zamora, España, Dic 4-8. pp. 27-30.

- Quesada, E.B., Martínez, G.A., Bedoya, M.A., Gonella-Díaza, A.M., (2013). Morfometría macroscópica del ovario y cuerpo lúteo de yeguas criollas de Colombia. *Red. Med. Vet.* 26:57-65.
- Santiago-Moreno, J. 2002. Métodos de monitorización de la actividad reproductiva en los rumiantes silvestres. Conferencia del Curso Internacional de Reproducción Animal INIA-ICI.
- Santiago-Moreno, J., López Sebastián, A. 2010. Ungulados silvestres de España: Biología y tecnologías reproductivas para su conservación y aprovechamiento cinegético. Monografías INIA. Serie Medioambiental, 2.
- Scott, I.C., Asher, G.W., Archer, J.A., Littlejohn, R.P. 2008. The effect of conception date on gestation length of red deer (*Cervus elaphus*). *Animal Reproduction Science*, 109, 206-217.
- Simard, M.A, (2010). Dynamique de Population d'un Ongulé Nordique à Haute Densité. Les déterminants environnementaux de la démographie et des composantes biodémographiques. Tesis doctoral del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Laval. Québec. Canadá.
- Thomas, D. C. (1983). Age-specific fertility of female Columbian black-tailed deer. *Journal of Wildlife Management* 47:501-506.
- Thomas, D., Cowan, I. (1975). The pattern of reproduction in female columbian black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus*. *J. Reprod. Fert.*, 44: 261-272.
- Trauger, D.L., Haugen, A.O., (1965). Corpora lutea variations of white tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *The Journal of Wildlife Management* , 29:487-492.
- Uribe-Velasquez, L.F., Correa-Orozco, A., Osorio, J.H. (2009). Characteristics of ovarian follicle development during estrous cycle in sheep. *Biosalud*. 2009, vol.8: 117-131.

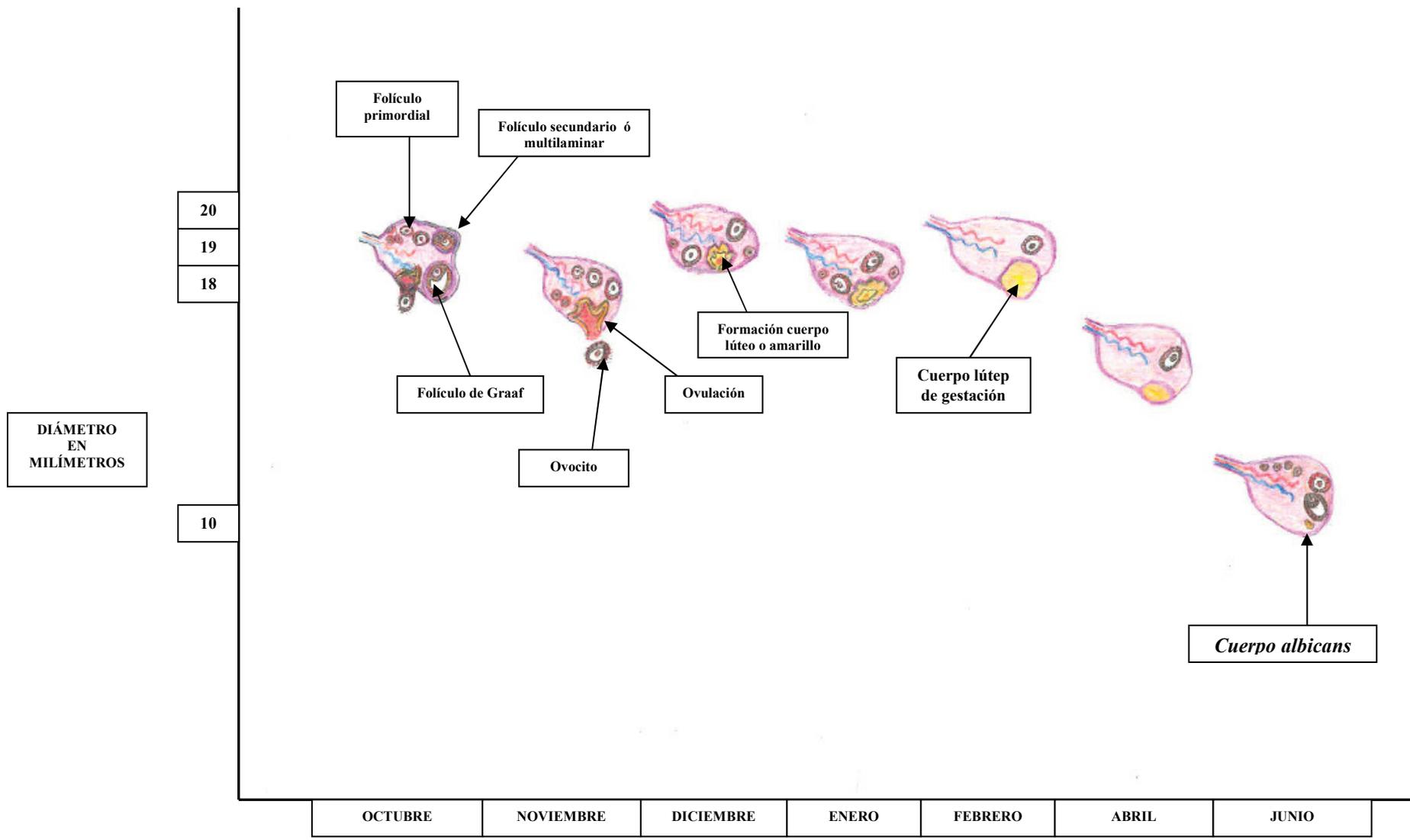


Figura 10. Desarrollo ovárico en cierva ibérica según mes muestreado.

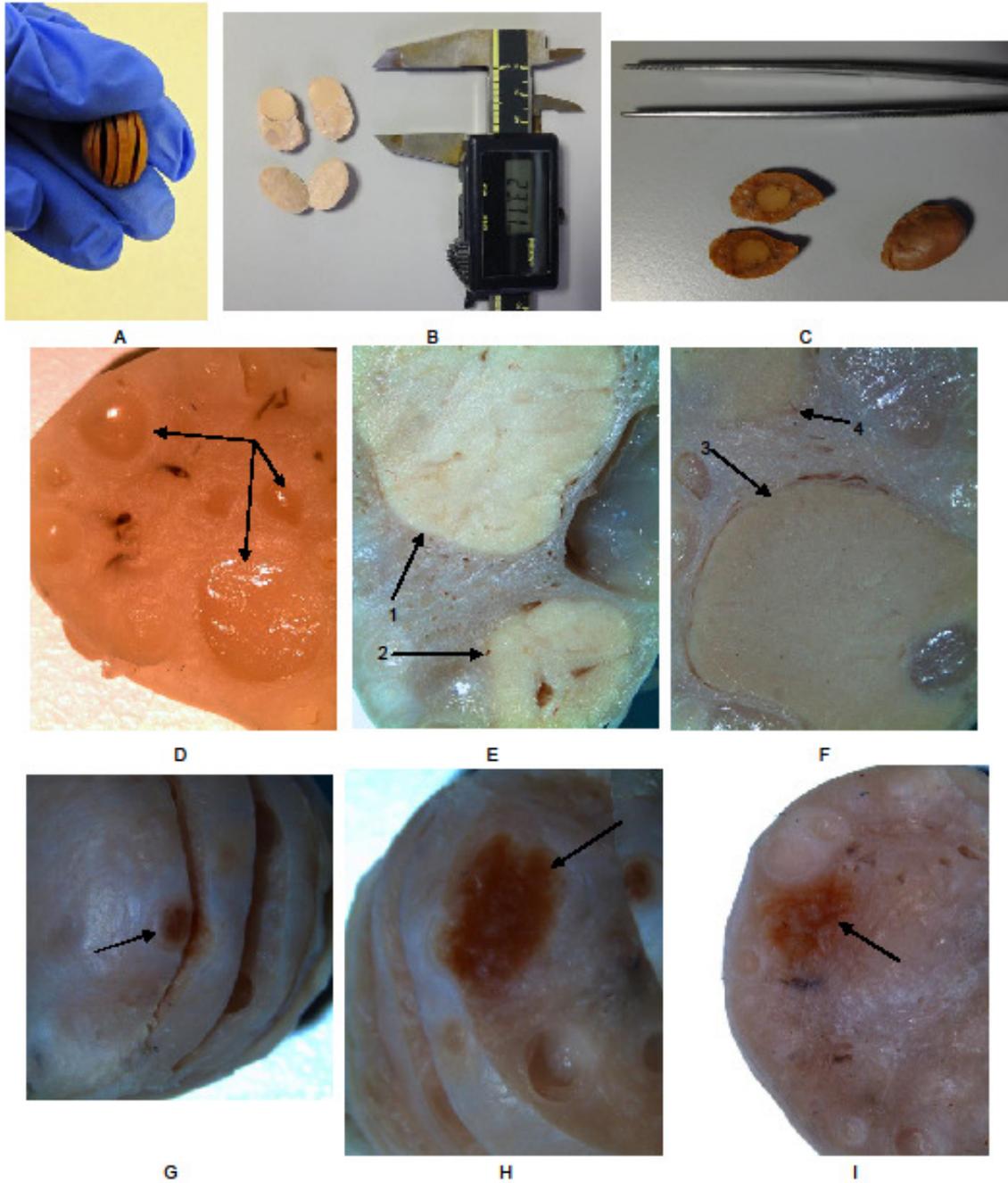


Figura 11.- Morfología macroscópica de los ovarios. A- Corte sagital de los ovarios. B y C- Visión macroscópica. D- Folículos ováricos. E y F- Cuerpos lúteos en un mismo ovario (1 y 3.- Cuerpos lúteos de gestación. 2 y 4.- Cuerpos lúteos accesorios o de regresión). G- Apariencia externa cuerpo albicans (superficie ovárica). H e I- Morfología macroscópica cuerpo albicans (corte sagital).

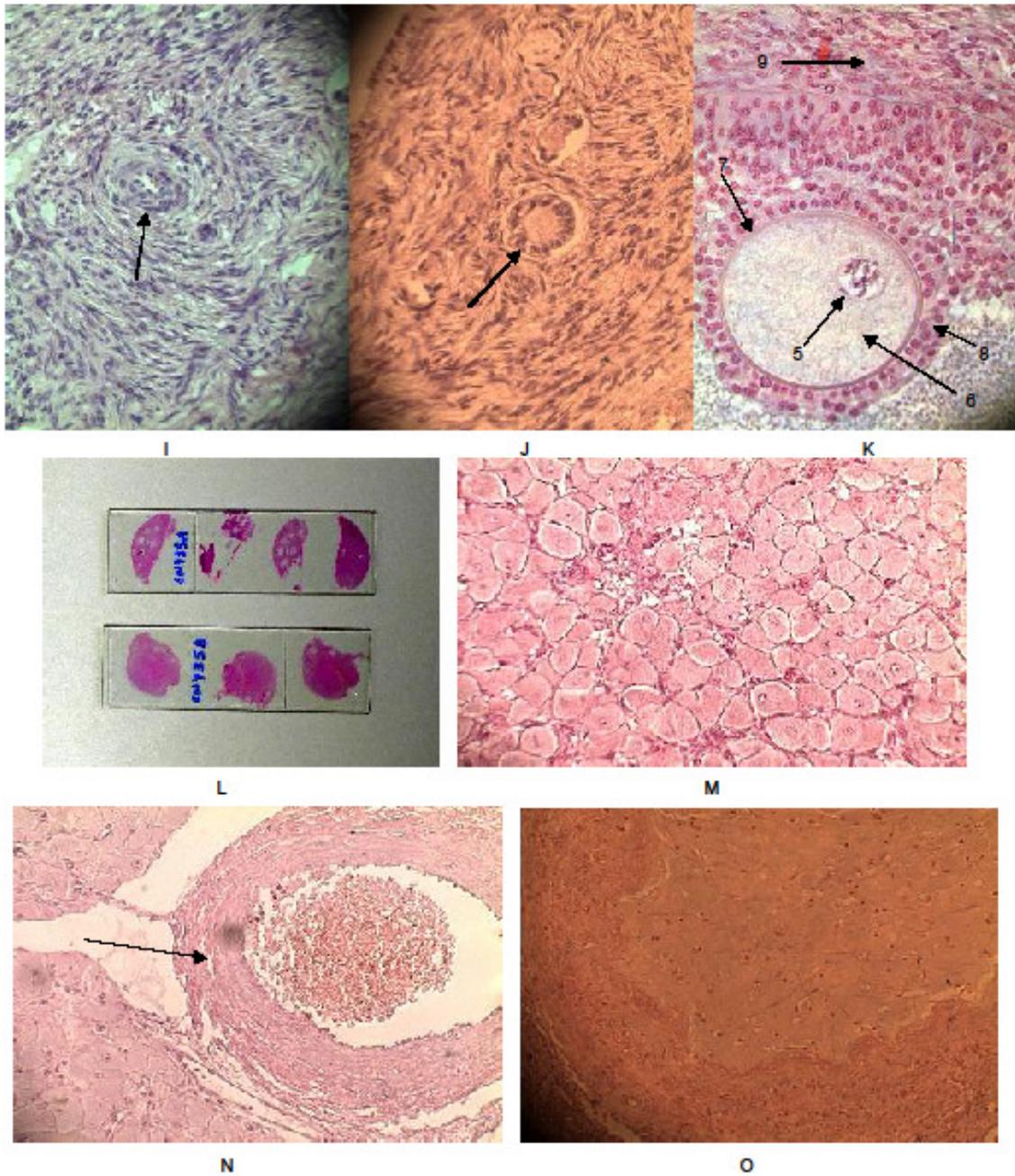


Figura 12.- Morfología microscópica. I- Formación folículo primario. J- Folículo primario. K- Folículo de Graaf (5- oocito, 6- antro, 7- zona pelúcida, 8- capa granulosa, 9- teca). L- Preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina. M- Cuerpo lúteo. N- Vaso sanguíneo entre cuerpos lúteos. O- Formación cuerpo lúteo.