



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE
LA ELECTROEYACULACIÓN BAJO ANESTESIA GENERAL
EN EL VENADO DE CAMPO
(*Ozotoceros bezoarticus*)**

Efectos de la Edad y de la Repetición del Tratamiento

DR. FERNANDO FUMAGALLI FERNÁNDEZ

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
AÑO 2012**



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DURANTE
LA ELECTROEYACULACIÓN BAJO ANESTESIA GENERAL
EN EL VENADO DE CAMPO
(*Ozotoceros bezoarticus*)**

Efectos de la Edad y de la Repetición del Tratamiento

DR. FERNANDO FUMAGALLI FERNÁNDEZ

**Rodolfo Ungerfeld; MSc, PhD
Director de Tesis**

AÑO 2012

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**Celia Tasende; DMV, MSc, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República-Uruguay**

**Ma. Cecilia Scorza; MSc, PhD
Instituto de Investigaciones Biológicas
Clemente Estable (IIBCE)
Montevideo, Uruguay**

**Jorge Gil; DMV, MSc, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República-Uruguay**

AÑO 2012

ACTA DE DEFENSA DE LA TESIS

INFORME DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A mis padres, que sin su confianza y apoyo no podría haber conseguido ninguno de mis logros.

A mi madre, por no haber permitido que me rindiera nunca.

A mi padre, por despertar en mí el amor por esta profesión.

A Xime por su amor, apoyo y compañía en este camino de vida.

Por último y no menos importante, a los que siempre me dieron y me dan cariño sin esperar nada a cambio y que constantemente reafirman mi vocación; Pinki, Cocky, Cindy, Tina, Frida, Kamy, Azrael, Morena, Piltrafa.

“Debe entenderse que todos somos educadores. Cada acto de nuestra vida cotidiana tiene implicancias, a veces significativas. Procuremos entonces enseñar con el ejemplo”

Dr. René Gerónimo Favaloro, 1923-2000

“La ignorancia genera confianza más frecuentemente que el conocimiento. Son los que saben poco, y no los que saben más, quienes afirman tan positivamente que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia”

Charles Darwin, 1809-1882

"Llegará un día en que los hombres como yo, verán el asesinato de un animal como ahora ven el de un hombre"

Leonardo da Vinci, 1452-1519

"Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo"

Albert Einstein, 1879-1955

AGRADECIMIENTOS

A Rodolfo Ungerfeld por guiarme en este camino desconocido, además de tener mucha paciencia.

A todos los que colaboraron en las extracciones: Carmen Rossini, Marcela Canabal, Tatiana Morales, Leticia de la Fuente, Natalie Citon, Marcelo Gatti, Pedro Martino, Adrián Sestelo, Jorge Gil, César Savignone, Miguel Coloma, Helen Viotti, Giannina Ocasberro, Belén Ceballos, Florencia Beracochea, Pedro Claudino.

En especial a: Solana González-Pensado, Matías Villagrán, Lorena Lacuesta, Juan Pablo Damián, Luis Deluchi, por ayudarme en la discusión de los resultados y redacción del artículo y de la tesis. A todos muchas gracias...

A todos mis amigos que constantemente me impulsaron y dieron fuerzas para seguir.

A Marita Araújo, Directora General de Higiene y Medio Ambiente de la IMM, por apoyarnos desde el comienzo.

A todo el personal de la Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (ECFA) involucrado en el trabajo: Dr. Edgardo Barrios, Sr. Ricardo Sorelo y Sr. Jhonny Brioso. Muy especialmente al Sr. Tabaré González, director de la ECFA por apoyar y creer en este proyecto desde el principio.

A todos muchas gracias.....

ÍNDICE

| | Páginas |
|--|---------|
| Dedicatoria y frases | i |
| Agradecimientos | ii |
| Índice | iii |
| Índice de figuras | v |
| Índice de abreviaturas | vii |
| Resumen | viii |
| Summary | x |
| 1.Introducción | 1 |
| 1.1. Marco general..... | 1 |
| 1.2. Distribución de la especie..... | 2 |
| 1.3. Descripción de la especie..... | 5 |
| 1.4. Tecnologías en la reproducción..... | 7 |
| 1.5. Obtención de semen..... | 8 |
| 1.6. Electroeyaculación..... | 9 |
| 1.7. Efectos de la electroeyaculación..... | 11 |
| 1.8. Captura y anestesia..... | 12 |
| 1.9. Enzimas estudiadas..... | 24 |
| 1.10. Factores a considerar en el estudio..... | 25 |
| 2. Hipótesis | 28 |
| 3. Objetivos | 29 |
| 4. Materiales y métodos generales | 30 |
| 4.1. Animales y su manejo..... | 31 |
| 4.2. Captura y anestesia de los animales..... | 33 |
| 4.3. Electroeyaculación..... | 35 |
| 4.4. Registros de parámetros fisiológicos..... | 35 |
| 4.5. Determinación de enzimas en sangre y cortisol..... | 36 |
| 4.6. Recuperación anestésica..... | 36 |
| 5. Primer estudio: caracterización de la respuesta a la electroeyaculación, en venados de campo machos, adultos y juveniles, bajo anestesia general | 39 |
| 5.1. Objetivo..... | 39 |
| 5.2. Materiales y métodos..... | 40 |
| 5.2.1. Captura, EE, y variables analizadas..... | 40 |
| 5.2.2. Análisis estadístico..... | 40 |
| 5.3. Resultados..... | 41 |
| 5.3.1. Captura y anestesia..... | 41 |
| 5.3.2. Erección, protrusión y eyaculación..... | 41 |
| 5.3.3. Parámetros fisiológicos..... | 42 |

| | |
|--|------------|
| 5.3.4. Enzimas en sangre y cortisol | 42 |
| 5.4. Discusión..... | 45 |
| 5.5. Conclusiones | 50 |
| 6. Segundo estudio: repetición de las extracciones de semen mediante electroeyaculación en venados de campo machos adultos y juveniles, bajo anestesia general..... | 51 |
| 6.1. Objetivos | 51 |
| 6.2. Materiales y métodos | 52 |
| 6.2.1. Captura, EE, y variables analizadas | 52 |
| 6.2.2. Análisis estadístico | 53 |
| 6.3. Resultados | 54 |
| 6.3.1. Captura y anestesia | 54 |
| 6.3.2. Erección, protrusión y eyaculación | 55 |
| 6.3.3. Parámetros fisiológicos | 55 |
| 6.3.4. enzimas en sangre y cortisol | 63 |
| 6.4. Discusión..... | 68 |
| 6.5. Conclusiones | 71 |
| 7. Tercer estudio: caracterización y análisis de las vocalizaciones..... | 72 |
| 7.1. Objetivos | 72 |
| 7.2. Materiales y métodos | 73 |
| 7.2.1. Registro de vocalizaciones..... | 73 |
| 7.2.2. Análisis estadístico de las vocalizaciones | 73 |
| 7.3. Resultados | 74 |
| 7.4. Discusión..... | 76 |
| 7.5. Conclusiones | 78 |
| 8. Conclusiones generales | 79 |
| 9. Bibliografía | 80 |
| 10. Anexos | 101 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribución actual del <i>Ozotoceros bezoarticus</i> en Sudamérica | 4 |
| Figura 2. Localización actual de las poblaciones de Venado de Campo en el Uruguay..... | 4 |
| Figura 3. Venado macho adulto de la ECFA. Venado hembra adulta de la ECFA..... | 6 |
| Figura 4. Crías de Venado de Campo mostrando su característico pelaje bayo oscuro con manchas blanquecinas | 6 |
| Figura 5. (A) Macho de venado de campo sin astas, durante el periodo de recambio. (B) Macho de venado de campo con astas..... | 7 |
| Figura 6. Métodos físicos de capturas individuales y colectivas de cérvidos..... | 14 |
| Figura 7. (A) Métodos de captura físicos mediante el uso de redes drop-net. (B) Método de captura net-gun, desde el suelo y el aire..... | 14 |
| Figura 8. (A) Diferentes tipos de dardos utilizados para la captura por teleanestesia. (B) Cerbatanas, rifles y pistolas de aire comprimido, utilizados para la captura con dardos. | 17 |
| Figura 9. Componentes de un dardo..... | 17 |
| Figura 10. Imagen que muestra uno de los encierros de los venados de campo..... | 32 |
| Figura 11. Imagen modificada de Google Earth. Distribución de los encierros en los que se alojaban los machos adultos (9) y juveniles (2) de venado de campo y de la sala veterinaria en la ECFA. | 32 |
| Figura 12. Cerbatana y dardos (Telinject, Agua Dulce, California, EEUU), utilizados para la captura de los venados de campo. | 34 |
| Figura 13. Venado adulto anestesiado, mostrando la postura adoptada de decúbito esternal | 34 |
| Figura 14. Registro de los pesos, donde se aprecia la camilla de transporte acolchonada y la venda puesta en el rostro del venado..... | 34 |
| Figura 15. Electroeyaculador usado en el estudio, con la sonda rectal y sus electrodos longitudinales de cobre | 38 |
| Figura 16. Venado adulto, durante la recuperación anestésica, se observa la postura en declive del terreno, con la cabeza dirigida hacia la zona más alta, lo que facilita su incorporación..... | 38 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Frecuencia cardíaca (a), frecuencia de pulso (b), frecuencia respiratoria (c), saturación parcial de oxígeno (d), antes (AEE), durante y después (DEE), de la EE en venados de campo..... | 43 |
| Figura 18. Parámetros fisiológicos, frecuencia cardíaca (a), frecuencia de pulso (b), frecuencia respiratoria (c), saturación parcial de oxígeno (d), antes (AEE), durante y después (DEE), de la EE en venados de campo..... | 57 |
| Figura 19. Frecuencia cardíaca, en la 2 ^a , 3 ^a , 4 ^a , y 5 ^a extracción en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados | 58 |
| Figura 20. Frecuencia pulso, en la 2 ^a , 3 ^a , 4 ^a , y 5 ^a extracción en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados..... | 59 |
| Figura 21. Frecuencia respiratoria, en la 2 ^a , 3 ^a , 4 ^a , y 5 ^a extracción en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados | 60 |
| Figura 22. SpO ₂ , en la 2 ^a , 3 ^a , 4 ^a , y 5 ^a extracción en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. | 61 |
| Figura 23. Temperatura rectal, en las cinco extracciones en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados..... | 62 |
| Figura 24. Creatinquinasa, en las cinco extracciones en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. | 65 |
| Figura 25. Fosfatasa alcalina sérica, en las cinco extracciones en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados..... | 66 |
| Figura 26. Cortisol, en las cinco extracciones en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados | 67 |
| Figura 27. Sonograma de las vocalizaciones de venado de campo adulto (A), y juvenil (B), registradas durante la EE | 75 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AEE: Antes de la electroeyaculación

AST: Aspartato aminotransferasa

CITES: Convention of Internacional Trade in Endangered Species of
Wild Fauna and Flora

CK: Creatinquinasa

DEE: Después de la electroeyaculación

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

EE: Electroeyaculación

FAS: Fosfatasa alcalina sérica

FC: Frecuencia cardíaca

FP: Frecuencia de pulso

FR: Frecuencia respiratoria

SNAP: Sistema Nacional de Aéreas Protegidas

SpO₂: Saturación parcial de oxígeno

TR: Temperatura rectal

UICN: Internacional Union for Conservation of Nature and Natural

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar la respuesta fisiológica, bioquímica y comportamental a la electroeyaculación (EE), bajo anestesia general (AG) en el venado de campo, determinando además, si dichas respuestas varían de acuerdo a la categoría de los animales y a la repetición del procedimiento. Para lograr ese objetivo se realizaron tres estudios en la Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (Maldonado, Uruguay). Se utilizaron dos grupos de 6 machos, uno de adultos (4-6 años al inicio) y otro de juveniles (1,5 años). En los tres estudios se capturaron los animales mediante el uso de dardos anestésicos, conteniendo los mismos una asociación de xilacina, ketamina y atropina. La anestesia se revirtió con clorhidrato de yohimbina administrada de forma intravenosa. El objetivo específico del primer estudio fue determinar si el voltaje aplicado durante la EE y la categoría de los animales afectan las respuestas fisiológicas y hematológicas. Para esto se analizaron antes (AEE), durante, y después de la EE (DEE) los valores de frecuencia cardíaca (FC), frecuencia de pulso (FP), frecuencia respiratoria (FR), saturación parcial de oxígeno (SpO_2) y la temperatura rectal (TR). También se extrajeron dos muestras de sangre, AEE y DEE, en las que se midieron las concentraciones de creatinquinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina sérica (FAS) y cortisol. En el primer estudio se encontró que los valores de FC y FP aumentaron durante la EE en ambas categorías, siendo mayores los valores en adultos. La concentración de CK, FAS, y AST aumentó DEE en ambas categorías, siendo el valor de CK mayor en adultos, y la FAS y la AST mayor en juveniles. La TR disminuyó DEE en ambas categorías. El objetivo específico del segundo estudio fue determinar si la respuesta a la AG y EE (extracción) en venados de campo es afectada por la repetición del procedimiento en forma estacional (otoño, invierno,

primavera, verano, y nuevamente otoño), utilizando los mismos parámetros de respuesta analizados en el primer estudio. En este segundo estudio se demostró que la repetición de las extracciones (AG y EE) no afectó la respuesta a la EE, observándose solamente efectos posiblemente adjudicables al momento o a la estación en que se realizó la extracción. El objetivo específico del tercer estudio fue determinar si durante la EE bajo AG en el venado de campo se producen vocalizaciones, caracterizar y analizar dichas vocalizaciones, y determinar si éstas se ven afectadas por la categoría y el voltaje utilizado. Para ello se analizó el número de vocalizaciones, duración de cada vocalización, tiempo total de vocalización, y las características de la frecuencia fundamental: frecuencia inicial (F_{ini}), frecuencia máxima ($F_{máx}$), frecuencia mínima ($F_{mín}$), y frecuencia final (F_{fin}). En este tercer estudio se constató la ocurrencia de vocalizaciones durante la EE en ambas categorías, pero los juveniles vocalizaron durante más tiempo, y esas vocalizaciones también duraron más en esta categoría. A su vez, la frecuencia inicial, frecuencia máxima, frecuencia final, y frecuencia mínima estudiadas fueron mayores en los animales juveniles. Como conclusiones generales, la EE bajo AG en el venado de campo provocó cambios en algunos parámetros fisiológicos. La repetición de las extracciones no afectó los parámetros de respuesta a la EE. El venado de campo emite vocalizaciones durante la EE bajo AG con xilacina, ketamina y atropina, pudiendo las mismas ser una respuesta dolorosa al voltaje utilizado. La electroeyaculación bajo anestesia general, con xilacina, ketamina y atropina, es un método adecuado para la obtención de semen en el venado de campo adulto y juvenil, pudiendo ser utilizada de forma reiterada en el mismo animal.

SUMMARY

The overall objective of this thesis was to characterize the physiological, biochemical and behavioral to electroejaculation (EE) under general anesthesia (GA) in the pampas deer, determining also whether these responses vary according to the category of animals and repetition of the procedure. To achieve this goal three studies were conducted at Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (Maldonado, Uruguay). Two groups of 6 males, one of adults (4-6 years at the beginning) and one of yearlings (1.5 years). In the 3 studies the animals were captured using anesthetic darts containing xylazine, ketamine and atropine. Anesthesia was reverted with yohimbine hydrochloride administered intravenously. The specific objective of the first study was to determine if the voltage applied during the EE and the category of pampas deer affect the physiological and hematological responses. For this, we recorded the heart rate (HR), pulse rate (PR), respiratory rate (RR), partial oxygen saturation (SpO₂) and rectal temperature (RT) before (AEE), during, and after the EE (DEE). Blood samples were obtained, AEE and DEE, and concentrations of creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (FAS) and cortisol were measured. The FC and FP increased during EE in both categories, reaching higher values in adults. The concentration of CK, FAS, and AST increased DEE in both categories; the value of CK was greater in adults, and FAS and AST were greater in yearlings. The TR DEE decreased in both categories DEE. The specific objective of the second study was to determine if the response to the GA and EE (extraction) in pampas deer is affected by the repetition of the procedure on a seasonal basis (fall, winter, spring, summer, autumn and fall again), measuring the same response parameters analyzed in the first study. Repeated extractions (GA and EE) in pampas deer males did not affect the

response to EE, observed only effects related to the time or season of the year. The third objective was to determine if the EE under GA produced vocalizations, to characterize and analyze them, and to determine possible differences between adult and yearling animals. The number and duration of vocalizations, the total time vocalizing, and the characteristics of the fundamental frequency: initial frequency (F_{start}), maximal frequency (F_{max}), minimal frequency (F_{min}) and final frequency (F_{end}) were analyzed. Vocalizations occurred in both categories, but yearlings vocalized during more time, with longer vocalizations. The initial frequency, maximum frequency, end frequency and minimum frequency were higher in juvenile animals. As a general conclusion, the EE under GA caused changes in some physiological parameters. The repetition of the extraction did not affect the response to EE. The field pampas deer vocalizations emitted during EE under GA with xylazine, ketamine and atropine, the same can be a painful response to the voltage used. The electroejaculation GA with xylazine, ketamine and atropine, is a suitable method for obtaining semen in adult and yearling pampas deer male field and can be used repeatedly in the same animal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO GENERAL

Los ciervos (Clase Mammalia, Orden Artiodactyla, Suborden Rumiantia, Familias Cervidae y Tragulidae), constituyen una familia de animales que presentan gran variedad en tamaños, con especies de talla pequeña, como el pudu (*Pudu puda*, 6 a 8 kg), o muy grande, como los alces (*Alces alces*, más de 800 kg) (Flach, 2003). Existen más de 40 especies de cérvidos distribuidas por casi todo el mundo, dentro de las que se encuentra el venado de campo conocido también como venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus, 1758), el que solamente habita en Sudamérica.

El venado de campo, es una especie autóctona que en el siglo XVIII se encontraba distribuida por todo el territorio nacional, siendo un recurso abundante para las comunidades locales (Jackson y Langguth, 1980). En el siglo XIX los naturalistas y viajeros reportaron una gran abundancia de la especie (Cabrera, 1943; Jackson y Langguth, 1980, 1987), existen registros de la exportación de más de 2.300.000 pieles de venado de campo desde el Río de la Plata durante el siglo XIX (Thornback y Jenkins, 1982). Sin embargo, debido a la acción humana tanto directa como indirecta, la población ha disminuido marcadamente tanto en cantidad como en dispersión. Esto puede ser explicado por la fragmentación del hábitat, el desarrollo de la agricultura, y la competencia por espacios con animales domésticos (Demaría et al. 2003), la caza ilegal (Jackson y Giullieti, 1988), y la transmisión de enfermedades infecciosas (Junguis, 1975/76). Estos y otros factores han contribuido a que la especie se encuentre amenazada de extinción. Desde el año 1975 el venado de campo está incluido en el Apéndice I de Convention of Internacional Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES, 13 de octubre, 2012), lo que significa que

está amenazado de extinción, y está considerado por UICN (Internacional Union for Conservation of Nature and Natural Resources) como casi amenazado (UICN, 2012).

1.2. DISTRIBUCIÓN ACTUAL DE LA ESPECIE

Se ha reportado la existencia de pequeñas poblaciones en Argentina [(Bahía Samborombón (Vila y Beade, 1997), Corrientes (Parera y Moreno, 2000), San Luis (Dellafiore et al. 2003), Santa Fé (Pautasso et al. 2002)], Brasil (Carvalho, 1973; Góss-Braga, 1999) y Uruguay (González, 1993; Cosse, 2001). Aunque hace algunos años se reportó la existencia de pequeñas poblaciones en Bolivia (Tarifa, 1993), no existe información actualizada sobre la situación de la especie. Según la UICN (2012), existen pequeñas poblaciones silvestres de la especie en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Fig. 1).

En Uruguay sólo se encuentran dos poblaciones en estado silvestre, las que corresponden a dos subespecies endémicas, diferentes a las poblaciones de Brasil (*O. b. bezoarticus* y *O. b. leucogaster*) (González et al. 1998), Paraguay, Bolivia (*O. b. leucogaster*) (Cabrera, 1943) y Argentina (*O. b. celer*) (Jackson y Langguth, 1987; González et al. 1998). Las poblaciones en nuestro país se encuentran restringidas a dos localidades, una en el Departamento de Rocha (*O. b. uruguayensis*) y otra en Salto (*O. b. areruguaensis*) (González et al. 1999; González et al. 2002), con aproximadamente 300 y 700 ejemplares respectivamente (Weber y González, 2003) (Fig. 2).

En nuestro país existe una tercera población de venado de campo localizada en la Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (ECFA), la que depende de la Intendencia Municipal de Maldonado (Fig. 2). La misma se encuentra alojada en semicautiverio, y posee un número aproximado de 80 animales, todos

originados a partir de un núcleo de crías trasplantadas desde la población de Salto en 1981 y 1982 (Ungerfeld et al. 2011a).

El venado de campo y la ECFA han sido declaradas Monumento Natural por el Parlamento Nacional (Ley N° 17.733 y Decreto N° 12/985, respectivamente). Las dos poblaciones silvestres se ubican en establecimientos privados dedicados a actividades agropecuarias. La población que habita en Arerunguá (Departamento de Salto) se encuentra actualmente dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP). Si bien la población de venados que habita en Sierra de los Ajos (Departamento de Rocha) no se encuentra dentro del SNAP, de todas formas está protegida de acuerdo a la legislación vigente. Sin embargo el control de las mismas recae principalmente en manos de los propietarios de los establecimientos en que habitan.

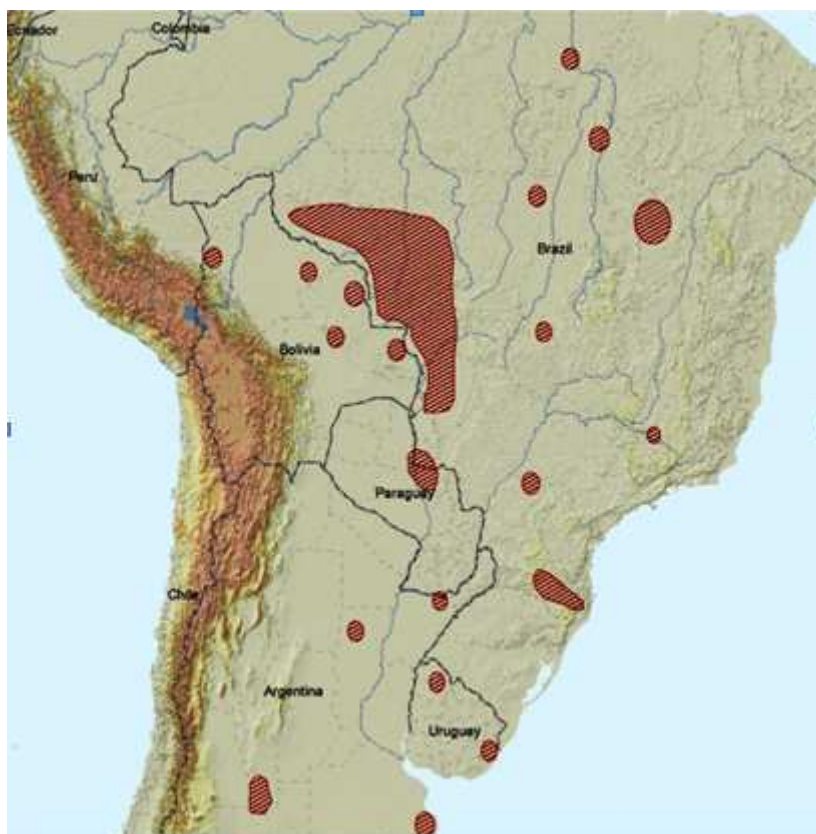


Figura 1. Distribución del *Ozotoceros bezoarticus* en Sudamérica (tomado de UICN, 2012).

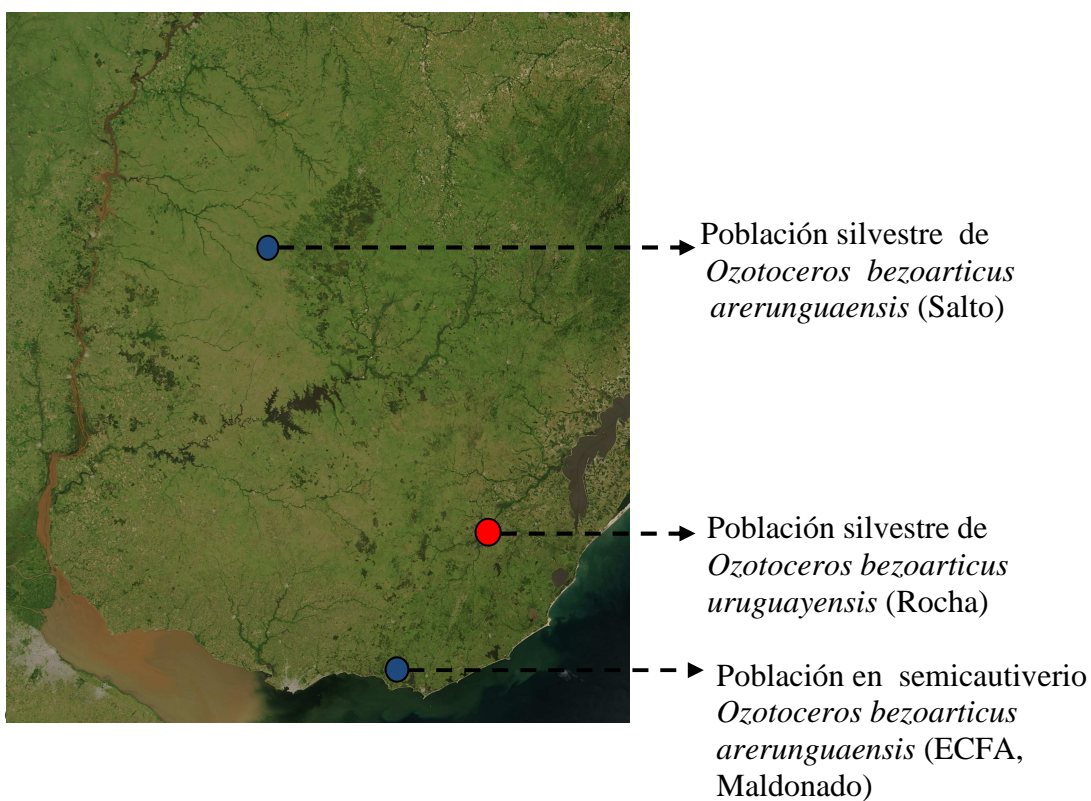


Figura 2. Localización de las poblaciones de venado de campo en el Uruguay.

1.3. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Tanto en Uruguay (Cosse, 2001), como en Argentina (Jackson y Giulietti, 1988; Merino, 1993) y Brasil (Berndt, 2005), el venado de campo habita praderas abiertas con pasturas nativas. Son ciervos que presentan un pelaje de color bayo, que es más oscuro en los machos que en las hembras (Cabrera, 1943). No poseen manchas, excepto las crías que las presentan solo a una edad muy temprana (Fig. 4). Presentan dimorfismo sexual siendo los machos más grandes en tamaño y peso que las hembras (Jackson y Langguth, 1987), además de presentar astas que renuevan anualmente (Fig. 5A). Los machos tienen un peso aproximado de 35-40 kg en vida silvestre, y un largo total 130 cm (desde la punta de la nariz hasta la base de la cola) (González, 2001). En comparación, los animales criados en semicautiverio en la ECFA son de un porte relativamente menor (Ungerfeld et al. 2011a). Los machos pesan 30-35 kg y tienen un largo de 90 a 100 cm (Fig. 3A); las hembras alcanzan un peso de 20-25 kg y un largo de 85 cm (Fig. 3B). Las astas de los machos presentan tres puntas (Fig.5B), miden hasta 30 cm de largo, y su peso se incrementa hasta los 6 años de edad (Ungerfeld et al. 2008a). Los machos pierden las astas a fines del invierno, para crecer rápidamente alcanzando un tamaño similar a fines de noviembre (Ungerfeld et al. 2008a).

En semicautiverio se observan un pico de partos durante la primavera, aunque se han observado durante todo el año, pariendo por lo general de una sola cría, aunque existe (Ungerfeld et al. 2011a). No existen datos certeros sobre la duración del ciclo estral de la hembra, ni tampoco de la gestación. De la misma forma, se desconocen parámetros fisiológicos normales, tales como frecuencia cardíaca (FC), frecuencia de pulso (FP), frecuencia respiratoria (FR), temperatura rectal (TR),

saturación parcial de oxígeno (SpO_2), así como datos normales hematológicos y bioquímicos sanguíneos.



Figura 3. (A) Venado macho adulto de la ECFA. (B) Venado hembra adulta de la ECFA



Figura 4. Crías de Venado de Campo mostrando su característico pelaje bayo oscuro con manchas blanquecinas.

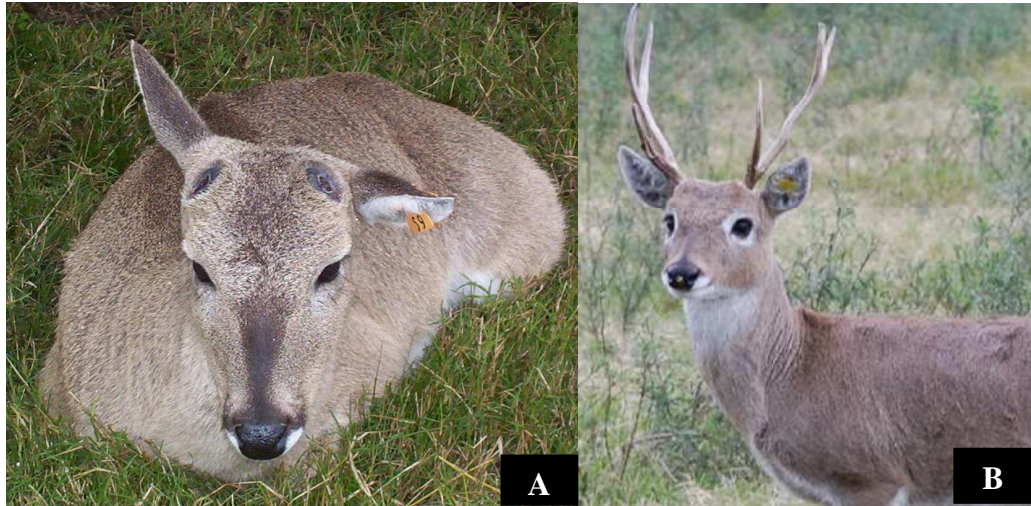


Figura 5. (A) Macho de venado de campo sin astas, durante el periodo de recambio. (B) Macho de venado de campo con astas.

1.4. TECNOLOGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN

Para llevar adelante planes de conservación es necesario, además de la cría en cautiverio, el uso de programas de reproducción mediante la aplicación de tecnologías reproductivas, las que ya se encuentran bien desarrolladas para los rumiantes domésticos (inseminación artificial, transferencia de embriones, fertilización *in vitro*, etc.) (Comizzoli et al. 2000). Una de las principales limitantes para el desarrollo de programas de reproducción asistida en rumiantes silvestres es la falta de conocimiento sobre las características reproductivas fisiológicas. Esto incluye el patrón de reproducción estacional, la duración del anestro posparto, la edad de la pubertad, y la duración de la gestación. Muchas de estas características pueden ser inferidas mediante estudios comportamentales y la determinación de concentraciones hormonales a través de la materia fecal (Santiago-Moreno et al. 2010), lo que evita entrar en contacto con los animales y someterlos a situaciones estresantes. Además, para el uso de tecnologías reproductivas es necesario un conocimiento profundo de la anatomía de los órganos reproductivos, así como de los gametos. Para esto es preciso el contacto con los animales, ya sea para la obtención

de muestras de semen en los machos como para la extracción de ovocitos en las hembras.

1.5. OBTENCIÓN DE SEMEN EN CERVIDOS

En los animales domésticos el semen se puede coleccionar de varias formas: vagina artificial, electroeyacuación (EE), masaje transrectal de las ampollas, masturbación a mano enguantada, o incluso es posible obtenerlo de animales *post mortem* a partir de la cola del epidídimo (Durrant, 2009). En los rumiantes domésticos se prefiere el uso de la vagina artificial, ya que es un método que no provoca estrés ni dolor para el animal, y se obtiene semen de mejor calidad que con los otros métodos, además de evitar el riesgo de la contaminación de la muestra con orina.

En especies de cérvidos silvestres, la obtención de semen con vagina artificial, ha sido utilizada con buenos resultados (Cortes et al. 1996; Gizejewski, 2004; Durrant, 2009). Para ello se debe contar con animales criados en cautiverio, destetados tempranamente, y acostumbrados a la presencia humana. Una vez que llegan a la vida adulta deben ser entrenados a saltar y eyacular en la vagina artificial. Esta maniobra suele requerir la participación de un operario entrenado, y al que el animal este acostumbrado para que sujete la vagina y el pene del macho, maniobra que se torna peligrosa en animales astados y de buen porte. Esta técnica ha sido utilizada en un macho de venado de campo criado en cautiverio (Soto et al. 1995), pero el mismo provocó graves lesiones a los técnicos al golpearlos con las astas (A. Soto, comunicación personal). Por lo antes mencionado, es un método que requiere mucha preparación, tanto del animal como de los operadores, además de implicar

riesgos físicos, por lo que en estas especies no es el método de elección para la obtención de semen.

Existen reportes de la utilización de la EE bajo anestesia (Umapathy et al. 2007; Martínez-Pastor et al. 2009), y vaciado *post mortem* de la cola del epidídimo (Amann et al. 1982; Zomborszky et al. 1999; Martínez-Pastor et al. 2006) en cérvidos. Todos los métodos pueden ser utilizados en la especie de interés, pero la opción lógica en una especie en peligro de extinción, como el venado de campo, parece ser la de EE bajo anestesia general (AG). Aunque no se ha publicado información completa sobre los resultados de su aplicación, la EE ha sido previamente utilizada en venado de campo (Duarte et al. 1993; Duarte y García, 1997).

1.6. ELECTROEYACULACIÓN

En los animales domésticos la EE se utilizó por primera vez en toros, chivos, verracos y carneros en 1936 (Dziuk et al. 1954; Watson, 1976). En cérvidos es el método más utilizado (Martínez-Pastor et al. 2006; 2009; Umapathy, 2007). Este método permite recoger el semen de individuos en los que no podría obtenerse por otros métodos. La mayoría de los autores concuerda en que el semen obtenido por EE no es de la misma calidad que el obtenido por los otros métodos, siendo muy variable la concentración de espermatozoides por muestra debido a la variación en el volumen de plasma seminal (Garde et al. 2006). Este método permite obtener semen de cérvidos en forma repetida en animales, tanto en cautiverio como en vida silvestre.

La EE consiste en la aplicación de estímulos eléctricos por medio de una sonda rectal. Estos impulsos eléctricos provocan la contracción de la musculatura de

los miembros pélvicos, así como la erección del pene. Los protocolos de descargas eléctricas y los equipos usados en cérvidos son los mismos que se utilizan en pequeños rumiantes (ovinos y caprinos; Evans y Maxwell, 1990). Las sondas miden aproximadamente 30 cm de largo, y tienen 20 a 30 mm de diámetro, pudiendo tener electrodos longitudinales o transversales (Garcia-Macias, 2006). Los equipos provocan descargas desde 1 hasta 15 V. En cérvidos se realizan series de 10 pulsos, comenzando con pulsos de 1 V durante unos 5 seg, cortando la descarga por 2 o 3 seg, para ir incrementando el voltaje de a 1 V hasta lograr la eyaculación. Por lo general los animales eyaculan con un voltaje de 4 a 5 V y 90 A (Garde et al. 2006).

El animal anestesiado es colocado en decúbito lateral, se realiza la higiene del prepucio y pene con una solución antiséptica, enjuagada con suero, y se seca correctamente toda la zona. Se retira la materia fecal de la ampolla rectal manualmente o mediante un enema, se lubrica con un gel de carboxi-metil-celulosa para no dañar la mucosa rectal con la sonda, para así lograr mejor contacto con la mucosa, y por tanto una mejor conducción. La sonda es introducida en el recto con los electrodos hacia el piso del mismo, quedando así ubicada por encima de las glándulas anexas. Se sabe que se encuentra en el lugar correcto por la respuesta motora de los miembros posteriores, los que responden simultáneamente a los estímulos eléctricos realizando contracciones espásticas. Antes de comenzar con los estímulos eléctricos se debe exteriorizar el pene del prepucio y fijarlo mediante una gasa estéril. La punta del glande debe introducirse en un recipiente estéril.

Para el uso de este método en los cérvidos, los animales deben ser correctamente anestesiados, y todos sus parámetros vitales deben ser monitorizados durante todo el procedimiento. Se deben administrar fluidos intravenosos, lo que

también permite tener una vía rápida de administración de drogas en caso de accidentes durante la anestesia (Santiago-Moreno et al. 2010).

1.7. EFECTOS DE LA EE

Existen trabajos que describen la respuesta de estrés a la EE en rumiantes (Palmer et al. 2005), la que probablemente sea debido al dolor que provocan las descargas eléctricas. Por ejemplo, se determinó que el aumento en la concentración sérica de cortisol provocada por la EE en carneros es similar a la producida con la esquila (Stafford et al. 1996). En chivos (Ortiz-de-Montellano et al. 2007) y carneros (Damián y Ungerfeld, 2011) se produce un pico de cortisol a los 20 min de la EE.

Cameron (1977), comparo diferentes protocolos de estímulos eléctricos durante la EE de carneros, provocando a medida que se incrementaba tanto en tiempo como en voltaje, un grave estrés, los cuales se reflejaban, tanto por la inquietud de los animales como por la ocurrencia de fuertes contracciones musculares, patadas con los miembros posteriores y el aumento en la frecuencia y profundidad respiratoria. Orihuela et al. (2009) comprobaron que se produce un aumento del cortisol, y de las FC y FR en carneros sometidos a EE, los que son parcialmente controlados si los animales son previamente anestesiados. Damián y Ungerfeld (2010) demostraron que la EE provoca aumento en la glucemia, la concentración sérica de proteínas totales, y de creatinquinasa (CK), además de producir aumento en las FC y FR incluso en carneros acostumbrados a la EE. Estos autores también describieron el patrón de vocalizaciones que se produce como respuesta al dolor durante la EE en carneros no anestesiados. Dichas vocalizaciones no fueron observadas, cuando los mismos carneros fueron sometidos a una anestesia epidural con lidocaína, posiblemente estas no ocurrieron por el bloqueo del efecto nociceptivo de la EE (Damián y Ungerfeld, 2010).

Si bien hasta el momento no se han determinado los efectos estresantes de la EE en venado de campo, en una primera prueba piloto realizada con dos machos que fueron electroeyaculados bajo AG se registraron vocalizaciones, por lo que el procedimiento podría provocar dolor a pesar de estar bajo los efectos de la anestesia.

1.8. CAPTURA Y ANESTESIA

Para utilizar la EE en rumiantes silvestres es necesario aplicar técnicas de captura e inmovilización que incluyan el uso de AG (Santiago-Moreno et al. 2010). Existe una gran variedad de métodos de captura de cérvidos, por lo que la elección de uno u otro dependerá de la especie, temperamento, tamaño, categoría animal (machos, hembras, adultos, juveniles), además de las condiciones del lugar donde se llevará a cabo la captura (bosque, montaña, tamaño y características de los encierros), facilidades con las que se cuente, y la capacitación del personal (Montané et al. 2001; Flach, 2003; Santiago-Moreno et al. 2010). Mediante la captura se intenta minimizar los accidentes y el estrés de los animales, y los riesgos del personal. El método de captura utilizado va a determinar una respuesta fisiológica variable en términos de grados de estrés en los animales, con cambios en los diferentes parámetros fisiológicos (Seal y Bush, 1987; Santiago-Moreno et al. 2010). A continuación se presentan los métodos de captura e inmovilización más utilizados, que pueden clasificarse como físicos o químicos.

1.8.1. CAPTURA FÍSICA

Existen varios métodos de captura físicos: trampas, redes, cepos, encierros (Fig. 6), los que presentan varias desventajas:

- en general no son selectivos, se capturan varios animales a la vez sin poder seleccionar al animal.
- pueden provocar muerte súbita por manipulación de animales muy estresables.
- pueden provocar lesiones de diferentes tipos (heridas, fracturas), hipertermia y miopatías (Seal y Bush, 1987), como posibles lesiones a los operarios encargados de la captura.

Existen métodos de captura física que utilizan redes (drop-net y net-gun), que además de ser selectivos parecen producir muy pocas alteraciones en los animales capturados en comparación con otros métodos (Kock et al. 1987). El método drop-net (Fig. 7 A), consiste en una red que se coloca elevada y se deja caer sobre el animal atraído hacia el lugar de captura por un cebo (alimento). El método net-gun (Fig. 7B), consiste en un arma que dispara una red, la que captura al animal ya sea a poca distancia o incluso desde vehículos.

El uso de tranquilizantes disminuyó todas las variables relacionadas con el estrés de captura en íbices (*Capra pyrenaica*) capturados con red (Casas-Díaz et al. 2010). En ciervo dama (*Dama dama*), y axis (*Axis axis*) se demostró que existe un aumento de la concentración sanguínea de las enzimas CK y aspartato aminotransferasa (AST) tras capturar a los animales con red, lo que se relacionó con daño muscular y con el estrés de la captura (English y Lopherd, 1981; Chapple et al. 1991). El daño muscular puede presentar diferentes grados, siendo el más grave el provocado por la miositis por captura (Cardinet, 1997)



Figura 6. Métodos físicos de capturas individuales y colectivas de cérvidos (tomado de Santiago-Moreno et al. 2010).



Figura 7. (A) Métodos de captura físicos mediante el uso de redes drop-net. (B) Método de captura net-gun, desde el suelo y el aire (tomado de www.wildlifecapture.com).

1.8.2. CAPTURA E INMOVILIZACIÓN QUÍMICA

El uso de métodos anestésicos en veterinaria se remonta al siglo XVI, siendo los primeros datos en animales domésticos de 1846 (Jones, 2002). Actualmente existe una amplia gama de medicamentos anestésicos, tanto inyectables como inhalatorios. Los anestésicos pueden ser aplicados luego de la captura física de los animales, o ser utilizados en forma directa como método de captura y anestesia.

Este sistema es especialmente útil cuando hay que capturar especies agresivas, o especies muy estresables. Además es un método selectivo, ya que permite la captura individual de los animales (Montané et al. 2001). Los métodos químicos requieren un conocimiento profundo de las drogas y sus efectos en la especie a ser utilizada o en especies cercanas, ya que en la mayoría de los casos se desconoce el estado físico que presentan los animales y en el caso de manejos como los necesarios para la aplicación de biotecnologías reproductivas siempre se asume que están saludables, lo que puede aumentar el riesgo anestésico (Caulkett y Arnemo, 2007).

El uso de la teleanestesia mediante dardos (Fig. 8A) es el método de captura más comúnmente utilizado (Santiago-Moreno et al. 2010). El dardo tiene una cámara anterior con embolo, donde se dispone el fármaco anestésico, y una cámara de aire con pistón (Fig. 9). Una vez depositado el volumen de anestésico requerido, se coloca una aguja con un pequeño orificio lateral, sobre el que se dispone un pequeño anillo de silicona. El último paso en la preparación del dardo, consiste en llenar la cámara posterior con aire con una jeringa de 20 ml, y al final se coloca el estabilizador en la parte posterior del dardo, quedando así preparado para cargarse en la cerbatana o rifle.

Los dardos pueden ser disparados por diferentes métodos (Fig. 8B), como ser cerbatana, rifles y pistolas de aire comprimido (Zucco y Lopes, 2006). Otro requisito para el éxito de la captura química es la destreza y la puntería del personal, ya que las drogas deben ser administradas en las regiones más musculosas y vascularizadas (cuello, hombro y grupa), lo que facilita la rápida absorción de las drogas (Seal y Bush, 1987). La administración de las drogas en otras zonas corporales puede determinar un menor efecto de las mismas, provocando tiempos de inducción más largos, pudiendo incluso no provocar una profundidad anestésica correcta (Seal y Bush, 1987).



Figura 8. (A) Diferentes tipos de dardos utilizados para la captura por teleanestesia. (B) Cerbatanas, rifles y pistolas de aire comprimido, utilizados para la captura con dardos (www.telinject.com).

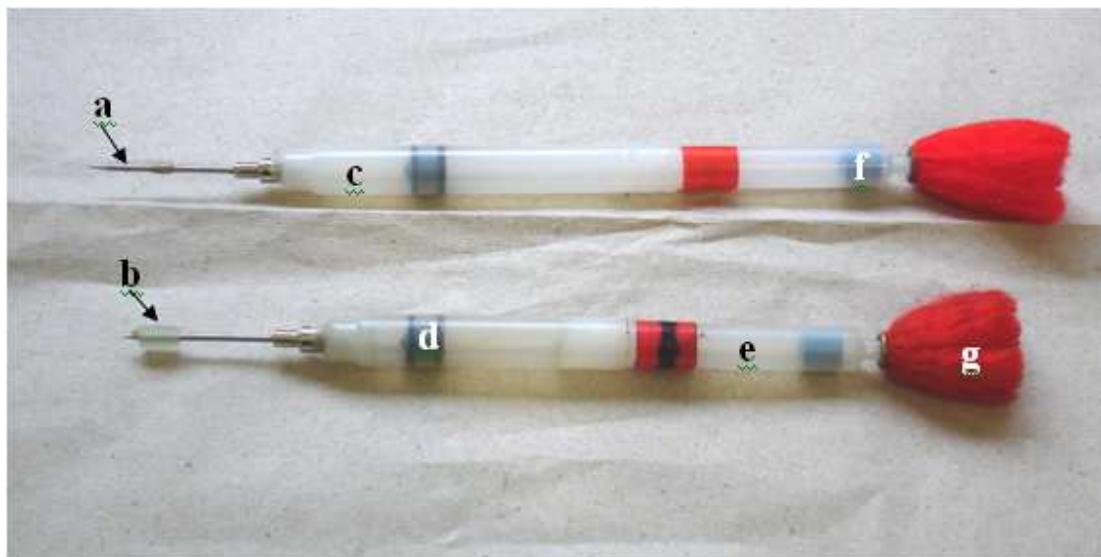


Figura 9. Componentes de un dardo. (a) Orificio de la aguja por donde descarga la droga; (b) Anillo de silicona que obstruye el orificio de la aguja; (c) Cámara anterior donde se coloca el anestésico; (d) Embolo de goma que descarga la droga; (e) Cámara posterior donde se coloca el aire; (f) Pistón que evita el escape del aire una vez colocado; (g) Plumerillo que sirve de estabilizador durante el disparo.

Es de suma importancia que el tiempo entre la administración de la droga y el derribo del animal (tiempo de inducción), sea lo más corto posible (Seal y Bush, 1987; Caulkett y Arnemo, 2007), lo que evita posibles accidentes de los animales y disminuye el estrés de la captura (Caulkett y Arnemo, 2007). Este tiempo permite tener una idea indirecta de la potencia de la asociación anestésica y de la respuesta

biológica de cada individuo a la misma (McGrath y Richey, 2003). Durante este periodo se debe seguir a los animales para evitar que se pierdan o se lesionen por la incoordinación que les provocan las drogas (Caulkett y Arnemo, 2007). El mismo dura unos 10-20 min cuando las drogas se administran por vía intramuscular (Seal y Bush, 1987; McKelvey y Hollingshead, 2003b; Caulkett y Arnemo, 2007). Por tanto, el control visual y la monitorización de los animales durante este periodo y toda la anestesia es fundamental, ya que pueden ocurrir accidentes físicos (laceraciones, fracturas), y alteraciones fisiológicas (hipertermia, hipotermia, depresión respiratoria, e hipoxemia) (Haigh, 1982; Seal y Bush, 1987; Caulkett y Arnemo, 2007; Santiago-Moreno et al. 2011).

1.8.3. ASOCIACIÓN ANESTÉSICA

La ketamina es una ciclohexamina que produce una anestesia característica, denominada anestesia disociativa o catalepsia (McKelvey y Hollingshead, 2003b; Hui-Chu, 2007). La ketamina actúa inhibiendo y estimulando selectivamente diferentes zonas del cerebro (McKelvey y Hollingshead, 2003a; Hui-Chu, 2007): deprime la función neuronal del eje neocorticotálámico y del núcleo central del tálamo, y estimula el sistema límbico, incluido el hipocampo (McKelvey y Hollingshead, 2003a; Hui-Chu, 2007). Esta forma de acción determina el estado cataléptico, donde el animal se encuentra con cierto grado de conciencia hacia algún estímulo sensitivo e inconsciente, y anestesiado para otros (McKelvey y Hollingshead, 2003b; Hui-Chu, 2007). Al ser liposoluble permite un rápido ingreso al tejido nervioso, por lo que luego de su administración, ya sea intravenosa como intramuscular, inicia rápidamente su acción (McKelvey y Hollingshead, 2003a). Los animales anestesiados con esta droga mantienen el reflejo palpebral y corneal con

una marcada dilatación pupilar, lo que dificulta la valoración de la profundidad anestésica (McKelvey y Hollingshead, 2003a). Los reflejos faríngeos y laríngeos se pueden mantener activos, o pueden encontrarse levemente deprimidos durante la anestesia, lo que determina la posibilidad de que los animales vocalicen durante procedimientos dolorosos (McKelvey y Hollingshead, 2003a). Algunos animales pueden manifestar una marcada sensibilidad hacia estímulos sonoros y/o lumínicos. El tono muscular se encuentra incrementado, por lo que existe una marcada rigidez de los miembros y del cuello. Esa hipertonia muscular se previene con el uso de relajantes musculares del tipo de benzodiazepínicos o $\alpha 2$ agonistas (McKelvey y Hollingshead, 2003a; Hui-Chu, 2007). La analgesia superficial de la piel es inmediata, así como la de las extremidades, siendo pobre la analgesia visceral, por lo que en procedimientos que provoquen un dolor de moderado a severo, se debe asociar algún tipo de droga que mejore la analgesia (McKelvey y Hollingshead, 2003a; Hui-Chu, 2007). A la inversa que muchos anestésicos que provocan una marcada bradicardia, la ketamina provoca un incremento de la FC (McKelvey y Hollingshead, 2003a), además de que se puede observar una leve depresión de la FR y alteración del ritmo respiratorio provocando una respiración de tipo apnéustica (apneas entre inspiración y espiración), sin que implique un detrimento en la oxigenación (McKelvey y Hollingshead, 2003a). La ketamina se elimina por metabolización hepática y por excreción renal (McKelvey y Hollingshead, 2003a).

La xilacina fue sintetizada en Alemania en 1962 para ser usada como una droga antihipertensiva en humanos, pero Lemke en 2007, encontró que tenía un potente efecto sedante en los animales. Es una droga agonista de los receptores α -2-adrenérgicos, (McKelvey y Hollingshead, 2003a). La xilacina se puede administrar

por vía intravenosa, intramuscular, o subcutánea, aunque por esta última es menos efectiva, es un potente sedante y relajante muscular y produce un ligero efecto analgésico, el que tiene un tiempo de acción de aproximadamente 20 min, mientras que el efecto sedante puede durar varias horas (McKelvey y Hollingshead, 2003a). Luego de la administración intramuscular se produce un pico en plasma a los 15 min (Lemke, 2007). Se metaboliza en el hígado y se elimina por vía renal (McKelvey y Hollingshead, 2003a). La administración intramuscular determina diferentes efectos hemodinámicos en los bovinos: un descenso de un 20% a un 30% en la FC y del gasto cardíaco, y un descenso de 10% en la presión arterial (Lemke, 2007). También puede observarse la presencia de bloqueo cardíaco de segundo grado (McKelvey y Hollingshead, 2003a), además de que produce arritmias como respuesta fisiológica al incremento del tono vagal (Lemke, 2007). Entre los cambios respiratorios observados luego de la administración de xilacina se encuentra una disminución en la FR en felinos, caninos, y equinos con pocos cambios a nivel del pH arterial, PO₂ y PCO₂ (Lemke, 2007). Según la especie podría provocar una importante depresión respiratoria, incluso con cianosis como se manifiesta en algunas razas de perros braquicéfalos (McKelvey y Hollingshead, 2003a). Se ha descrito que en caninos y felinos provoca vómitos, y en rumiantes timpanismo (McGrath y Richey, 2003) por inhibición de las contracciones de retículo y rumen (Lemke, 2007). La producción de orina aumenta luego de la administración de xilacina en vacas, caballos y gatos (Lemke, 2007). Se ha reportado que en varias especies sedadas o anestesiadas con xilacina se produce una hiperglucemia y una hipoinsulinemia transitorias (Lemke, 2007). La hiperglucemia se produce por la acción de la xilacina sobre los α -2-receptores de las células beta del páncreas, inhibiendo la liberación de la insulina (Lemke, 2007). Debido a sus efectos secundarios en varios órganos y a la larga

duración de su sedación, en algunos casos se recomienda el uso de un fármaco reversor como la yohimbina, la que luego de su administración intravenosa revierte la acción de la xilacina en pocos minutos (Jessup et al. 1985; McKelvey y Hollingshead, 2003a)

1.8.4. USO DE DROGAS ANESTÉSICAS EN ANIMALES SILVESTRES

Caulkett y Arnemo (2007) propusieron criterios para considerar la droga anestésica ideal para la captura de animales silvestres. La misma debe provocar un efecto rápido, con un corto tiempo de inducción (1 a 5 min), tener un amplio margen de seguridad, ya que es utilizada en animales en los que se desconoce el peso exacto, y el estado de salud y fisiológico (gestación, juvenil). Debe provocar el efecto deseado con un pequeño volumen de droga (ideal <3ml), lo que es necesario para el uso de dardos para la captura a distancia. Debe poseer una droga antagonista, lo que permitirá revertir los efectos indeseables de los anestésicos cuando estos se presenten (hipertermia, hipoxemia), así como otros efectos provocados por el decúbito prolongado (timpanismo ruminal, compresiones nerviosas y musculares, regurgitaciones) (Caulkett y Arnemo, 2007; Santiago-Moreno et al. 2011). También debe inducir una narcosis rápida y profunda, logrando disminuir posibles accidentes en la manipulación de especies peligrosas, provocar analgesia durante y luego del procedimiento (colocación de implantes, extracción de muestras de tejidos). Por último, debe ser una droga de fácil acceso (encontrarse en el país, de costo accesible). Al no existir una droga anestésica ideal, que cumpla con todos los requisitos que se pretende para la inmovilización y la anestesia, debe utilizarse una combinación de estas que permita lograr todos los efectos deseados. Estas asociaciones buscan provocar una rápida inducción, que evite lesiones de los

animales, una buena relajación muscular, poca depresión cardíaca y respiratoria, así como contar con un antagonista que sirva para una recuperación rápida (Jessup et al. 1985; Santiago-Moreno et al. 2011).

Para la inmovilización de cérvidos silvestres se han utilizado varias combinaciones (Flach, 2003). Dentro de las drogas que se usan para la inmovilización y la anestesia en animales silvestres se encuentra una gran diversidad de fármacos (Caulkett y Arnemo, 2007), agentes paralizantes (curare, succinilcolina), opioides (etorfina, thiafentanilo, carfentanilo), opiáceos antagonistas (naloxona, naltrexona), ciclohexaminas (ketamina, tiletamina), agonistas α -2 adrenérgicos (xilacina, detomidina, medetomidina), neurolépticos (acepromacina, droperidol, diazepam, zolazepam). Ninguna de estas drogas por sí sola cumple con todos los requisitos antes mencionados, por lo que la mejor opción es combinarlas para sumar efectos benéficos y disminuir los indeseables. El uso de estas drogas solas o combinadas ha sido utilizado para la captura e inmovilización en cérvidos (Seal y Bush, 1987; Zomborszky et al. 1999; Flach, 2003; Caulkett y Arnemo, 2007; Martínez-Pastor et al. 2009; Santiago-Moreno et al. 2010, 2011).

De acuerdo a la literatura una de las combinaciones anestésicas más utilizada para la captura e inmovilización en cérvidos es la de los α 2 agonistas (xilacina) y las ciclohexaminas (ketamina) (Seal y Bush, 1987; Caulkett y Arnemo, 2007; Martínez et al. 2008). Esta asociación provoca diferentes efectos que pueden ser considerados indeseados o incluso patológicos, como ser depresión respiratoria, bradicardia, hipotensión, hipotermia, timpanismo ruminal, todos causados por la xilacina (Caulkett y Arnemo, 2007). Uno de los efectos que siempre se produce con esta droga es la depresión respiratoria, con la consiguiente hipoxemia, siendo común observar valores por debajo de 90% de saturación de oxígeno. En ese sentido, en la

mayoría de los rumiantes los valores de saturación de oxígeno por debajo de 95% indican una incorrecta oxigenación de la hemoglobina (McKelvey y Hollingshead, 2003b; Caulkett y Arnemo, 2007).

De todas formas es una combinación anestésica que cumple con casi todos los requisitos planteados. En el país se cuenta con las dos drogas, existe una droga antagonista de la xilacina (clorhidrato de yohimbina), aunque no existe antagonista disponible para la ketamina. Pueden utilizarse volúmenes pequeños para alcanzar su efecto hipnótico y ambas drogas poseen un bajo costo. Por todo esto es la asociación anestésica que se eligió para ser utilizada en la captura del venado de campo.

El protocolo anestésico no debe provocar grandes trastornos fisiológicos que representen un riesgo de vida para los animales, los que tienen un alto valor individual. Además debe asegurar una correcta analgesia e inmovilización del animal, no interfiriendo con los sistemas neuromusculares que controlan la protrusión, erección del pene, y eyaculación. La anestesia también, debe limitar los problemas relacionados con la contaminación urinaria del semen.

1.8.5. USO DE LA ATROPINA

La atropina es una droga anticolinérgica, extraída de la belladona y otras plantas de la familia de la Solanaceae. Su efecto sobre el sistema nervioso autónomo se debe a su antagonismo competitivo de los receptores muscarínicos de la acetilcolina, por lo que es considerada una droga parasimpaticolítica (McKelvey y Hollingshead, 2003a). Dentro de sus principales efectos se encuentran: aumento de la frecuencia cardíaca, broncodilatación, disminución de la secreción del aparato respiratorio, disminuye la producción de saliva y de secreciones gastrointestinales (McKelvey y Hollingshead, 2003a). Debido a sus efectos, la atropina podría

contrarrestar los efectos adversos de las drogas (xilacina-ketamina) utilizadas para la AG en este estudio, por lo cual su inclusión en el protocolo anestésico sería beneficiosa.

1.9. ENZIMAS ESTUDIADAS

La CK enzima responsable de la captación del ATP para la contracción muscular es la enzima más usada para la determinación de enfermedades neuromusculares en los animales domésticos (Cardinet, 1997). Además del musculo esquelético, está presente en miocardio y cerebro (Cardinet, 1997). Su incremento en suero refleja el trabajo muscular intenso o daño muscular, ya que es una enzima que se encuentra dentro de la célula muscular (Akatas et al. 1993; Cardinet, 1997). La concentración de CK se incrementa rápidamente en suero luego del daño muscular y desciende a valores normales en horas o días (English y Lepherd, 1981; Cardinet, 1997). Tanto la captura como la EE provocan un incremento de esta enzima en el alce y berrendo (Cardinet, 1997), y en carneros (Damián y Ungerfeld, 2011).

Otra enzima utilizada para diagnosticar enfermedades neuromusculares es la AST (Akatas et al. 1993; Cardinet, 1997). La concentración de la AST aumenta con la enfermedad del musculo blanco en corderos, vacas y cerdos (Cardinet, 1997). Su incremento en suero también se produce en minutos u horas, pero su concentración en sangre se mantiene aumentada por días o semanas (Cardinet, 1997). El estudio conjunto de ambas enzimas (CK y AST) permite determinar si el daño muscular está activo o fue anterior (Cardinet, 1997). Por tanto, el análisis de estas dos enzimas en los venados de campo es importante para determinar el posible daño muscular provocado, tanto por la captura como por la EE.

La fosfatasa alcalina sérica (FAS) es una enzima que está presente en la mayoría de los tejidos (Tennant, 1997). Se encuentra en altas concentraciones en intestino, riñón, hueso e hígado (Tennant, 1997). No es clara su función fisiológica, pero al estar relacionada con la membrana celular, se cree que cumple funciones de transporte en la membrana (Tennant, 1997). El aumento de la FAS, se produce en el daño tisular del hígado, en la colestasis intrahepática y extrahepática, daño óseo o crecimiento óseo (Tennant, 1997). La concentración de FAS también se incrementa como respuesta a un aumento de glucocorticoides (Rijnberk y Mol, 1997). En la presente tesis el estudio de la FAS puede permitir valorar si existe daño provocado al hígado por el uso de las drogas anestésicas, además de determinar posibles incrementos en los animales juveniles por no haber finalizado su desarrollo corporal, o posibles incrementos por la secreción de cortisol debida al estrés ya sea por la captura como por la EE.

1.10. FACTORES A CONSIDERAR EN EL ESTUDIO

1.10.1. CATEGORÍAS

En los experimentos se planteó trabajar con dos grupos de animales compuestos por machos adultos y juveniles para determinar si existe una respuesta diferencial por categoría. Como se sabe, las dosis y efectos de los fármacos difieren de acuerdo a la especie, edad, peso, estado de salud del animal, ó temperamento (Pereira, 2002; Caulkett y Arnemo, 2007; Santiago-Moreno et al. 2011). Otros autores han demostrado que los ciervos dama jóvenes son más estresables que los adultos (English y Lepherd, 1981). Esto podría implicar una respuesta diferenciada que se evidencie en las respuestas fisiológicas que se alteran con la EE (cortisol, FC, y respiratoria, pulso, etc.) (Marco et al. 1997; Pérez et al, 2003), así como en la

bioquímica sanguínea (FAS, CK) (Klinger et al. 1986; Kock et al. 1987; Chapple et al. 1991). De igual forma que los parámetros bioquímicos sanguíneos, los fisiológicos, también podrían verse afectados por la edad de los animales.

1.10.2. REPETICIÓN DE LAS EXTRACCIONES O TRATAMIENTO/ESTACIÓN DEL AÑO (OTOÑO, INVIERNO, PRIMAVERA, VERANO, Y NUEVAMENTE OTOÑO).

En este estudio la captura y EE de los animales se realizó en 5 oportunidades. Dado la falta de disponibilidad de animales no pudieron utilizarse animales diferentes en cada extracción (el término **extracción** incluye a la captura y la EE, realizada en diferentes estaciones). Esto podría determinar un “acostumbramiento” a las dosis anestésicas utilizadas en las sucesivas capturas, lo que podría determinar un menor efecto, con diferencias en los tiempos de captura, y una menor inmovilización. También los animales podrían responder de una forma más intranquila, con un mayor estrés a la presencia humana, por haber sido sometidos previamente a iguales situaciones (extracciones previas). Esto también podría determinar que se requiriera un mayor tiempo de persecución para la captura de cada animal, y/o dosis mayores de la asociación anestésica para lograr el mismo efecto que en capturas anteriores.

Por otro lado, existen muchos factores que afectan la fisiología, dentro de los que se encuentran, la nutrición, el ritmo circadiano, temperatura, clima y el fotoperíodo (Lincoln et al. 2006). En muchas especies existe una influencia marcada del fotoperíodo, generando una estacionalidad muy marcada en la reproducción, determinando que en la mayoría de los mamíferos los partos se concentren en la primavera. En los ungulados el fotoperíodo (Karsch et al. 1984) y la nutrición son las dos influencias ambientales de mayor importancia (Lincoln et al. 1998).

En una población de venados de campo de Brasil se determinó que existe un ciclo bianual en la concentración fecal de testosterona (García et al. 2005). También se reportó en la misma especie que existen diferencias en cuanto a la calidad del semen en dos momentos del año (Duarte y Garcia, 1997). Por tanto, es posible entonces que exista una respuesta diferente a los estímulos eléctricos de la EE en diferentes estaciones, modificando el voltaje necesario para la eyaculación. Si ello fuera así, los parámetros que se ven afectados por la EE podrían variar menos en momentos en que es necesario aplicar menos pulsos eléctricos.

Visto todos los antecedentes antes mencionados y considerando todos los efectos adversos tanto de la anestesia como de la EE, se plantea en esta tesis estudiar si la EE bajo AG en el venado de campo es un método efectivo y seguro para la obtención de semen. Analizando también todas las posibles alteraciones que podría provocar dicho manejo en los animales, a sabiendas de que se trata de una especie en riesgo de extinción.

2. HIPÓTESIS DE LA TESIS

Por todo lo anteriormente descrito se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

1) La técnica de EE bajo AG en el venado de campo provoca respuestas de estrés y alteraciones en los parámetros fisiológicos, bioquímicos y comportamentales.

2) Estos cambios varían de acuerdo a la categoría de venado de campo y del voltaje utilizado durante la EE.

3) Los parámetros estudiados varían con la repetición de la EE en diferentes estaciones del año.

3. OBJETIVOS DE LA TESIS

3.1. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO DE TESIS

Caracterizar la respuesta fisiológica, bioquímica y comportamental a la EE bajo AG en el venado de campo, determinando además, si dichas respuestas varían de acuerdo a la categoría de los animales y a la repetición del procedimiento.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar si el voltaje aplicado durante la EE y la categoría de venados de campo anestesiados con xilacina, ketamina y atropina afecta la:

- Frecuencia cardíaca
- Frecuencia de pulso
- Frecuencia respiratoria
- Temperatura rectal
- Saturación parcial de oxígeno
- Concentración sérica de cortisol
- Concentración sérica de creatinquinasa
- Concentración sérica de aspartato aminotransferasa
- Concentración sérica de fosfatasa alcalina sérica

2) Determinar si la respuesta a la EE es afectada por la repetición del procedimiento en forma estacional (otoño, invierno, primavera, verano, y nuevamente otoño).

3) Estudiar si durante la EE bajo AG en el venado de campo, se producen vocalizaciones; caracterizar y analizar dichas vocalizaciones, y determinar si éstas se ven afectadas por la categoría y el voltaje utilizado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Se realizaron cinco muestreos (extracciones) con frecuencia trimestral, comenzando en marzo 2008 y culminando en marzo de 2009. La primera extracción fue realizada en marzo de 2008, pero el método de registro de los datos fisiológicos (FC, FP, FR, SpO₂) durante la EE, fue diferente al utilizado en las siguientes extracciones (a tiempos fijos, y no en función del voltaje). Por lo tanto esos datos no fueron usados para el análisis de la respuesta de acuerdo al voltaje durante la EE. Sin embargo los datos obtenidos antes de la EE (AEE), y después de la EE (DEE) de esa extracción si fueron usados para el estudio de la repetición del tratamiento (extracciones). Por tanto, la extracción realizada en junio-julio de 2008 fue considerada como el primer estudio de caracterización completa realizado en la tesis, en el que se analizaron las variables de respuesta a la EE.

Los estudios realizados y presentados en esta Tesis fueron:

- En una primera etapa, se caracterizaron las respuestas a la EE del venado de campo anestesiado. Estas fueron analizadas en función de la categoría de los animales (adulto vs juvenil), y también de acuerdo al voltaje utilizado durante la EE.
- En el segundo estudio que se presenta (Repetición del Tratamiento), se analizó si los cambios observados fueron diferentes de acuerdo a la repetición de las extracciones (cinco en total).
- En tercer lugar y por último (Análisis de Vocalizaciones), se estudiaron las vocalizaciones registradas durante la EE, las que fueron analizadas tanto en función de la categoría (adulto vs juvenil) como del voltaje utilizado.

4.1. ANIMALES Y SU MANEJO

El estudio se llevó a cabo en la ECFA, ubicada en el km 5 de la ruta 37, en la falda del cerro Pan de Azúcar, Departamento de Maldonado. En la misma se alojaban solamente animales autóctonos entre los que se encontraba la población de venados de campo utilizada. Los animales se encontraban alojados en encierros de aproximadamente 0,5 ha, separados por tejido de alambre de 1,50 m de alto, con abundante agua disponible en recipientes plásticos de unos 100 l, pastura natural, árboles y arbustos (Fig. 10). Dadas las características de los encierros, las variaciones naturales de las pasturas y el espacio de alimentación restringido de que disponían, los animales eran suplementados con ración peleteada de vaca lechera, de lunes a sábado en horas de la mañana, a razón de aproximadamente 600 g por animal, lo que dado el sobrante observado normalmente se consideró como *ad libitum*.

Se trabajó con dos grupos de 6 animales ubicados en dos de estos encierros. Un grupo estaba compuesto por 6 machos adultos, de entre 4 y 6 años de edad, y el otro por 6 animales juveniles, de aproximadamente 1,5 años al comenzar los trabajos. Todos los animales se encontraban identificados con caravanas.

La monitorización de la anestesia y la EE se realizó en la sala veterinaria de la ECFA, la que se encontraba a aproximadamente 50 m de uno de los encierros (adultos), y 100 m del otro (juveniles) (Fig.11). La sala veterinaria contaba con todas las comodidades necesarias para llevar adelante el trabajo: un local de cirugía (agua corriente, buena fuente de luz, dos mesas de acero inoxidable, una quirúrgica de 60 x 1,80 cm y una mesa auxiliar más pequeña) y un laboratorio (microscopio, baño térmico, centrifuga, freezer).



Figura 10. Imagen que muestra uno de los encierros de los venados de campo, donde se aprecia la vegetación, pastura, la altura del alambrado y el recipiente plástico del agua.



Figura 11. Imagen modificada de Google Earth (24 de julio de 2011) que muestra la distribución de los encierros. Los machos adultos se alojaban en el encierro 9, y los juveniles en el 2. También se muestra la ubicación de la sala veterinaria.

4.2. CAPTURA Y ANESTESIA DE LOS ANIMALES

Se realizaron un total de 53 capturas, todas durante la mañana, entre las 08:00 y las 12:00 h.

Para la captura se utilizó una cerbatana (Telinject, Agua Dulce, California, EEUU), y dardos con anestesia (Fig.12). Para facilitar la identificación de los animales a distancia, y seguimiento durante el periodo de inducción se utilizaron prismáticos. La anestesia utilizada en los dardos, fue una combinación de 2,0 mg/kg xilacina 10% (Sedomin; Laboratorio König, Buenos Aires, Argentina), 1,6 mg/kg de ketamina 5% (Vetanarcol; Laboratorio König, Montevideo, Uruguay) y 0,013 mg/kg of atropina 1‰ (Sulfato de Atropina; Laboratorio ION, Montevideo, Uruguay). Las dosis de las drogas se calcularon de acuerdo al peso de animales, los que se consideraron en función de los registros de capturas anteriores.

4.2.1. TIEMPO DE INDUCCIÓN

En todos los animales se registró el tiempo de inducción anestésico. Este fue considerado desde que el animal recibió el dardo, hasta que adoptó la postura de decúbito esternal o lateral (Fig. 13). Una vez determinada la profundidad en la hipnosis de los animales (grado de pérdida del reflejo palpebral y respuesta a manipulación de las extremidades), se controlaron los parámetros vitales (FC y FR). Luego se les colocó una venda en los ojos para evitar el estímulo lumínico y la sequedad de la cornea, y posteriormente fueron transportados en una camilla acolchonada para evitar traumatismos y compresiones hasta la sala veterinaria, donde previo a comenzar con la EE se registraron los pesos (Fig. 14).

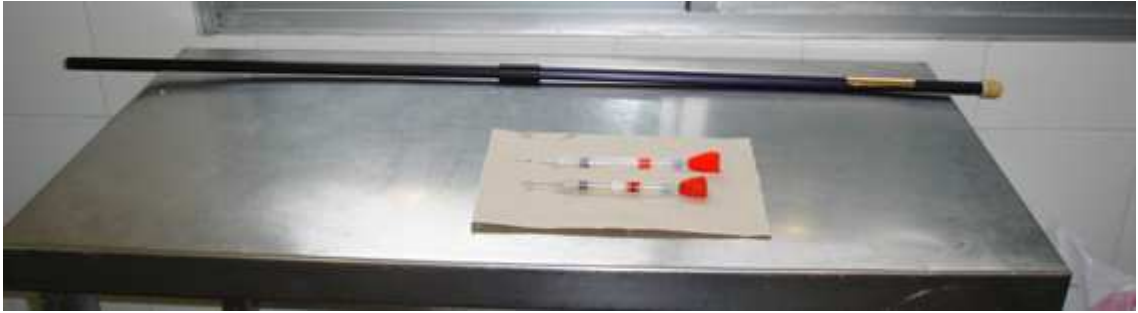


Figura 12. Cerbatana y dardos (Telinject, Agua Dulce, California, EEUU), utilizados para la captura de los venados de campo.



Figura 13. Venado adulto anestesiado, mostrando la postura de decúbito esternal adoptada.



Figura 14. Registro de los pesos, donde se aprecia la camilla de transporte acolchonada y la venda puesta en el rostro del venado.

Una vez dentro de la sala veterinaria, los animales fueron colocados en una mesa de acero inoxidable, acondicionada con un buen acolchonamiento, y recubierta con nailon. Siempre se colocó a los animales en decúbito lateral derecho para prevenir complicaciones respiratorias restrictivas por compresión del diafragma por un timpanismo ruminal. Se les colocó un catéter intravenoso en la vena cefálica, y se les administró una solución de cloruro de sodio 0,9% de forma continua, hasta el final del procedimiento.

4.3. ELECTROEYACULACIÓN

Las muestras de semen fueron obtenidas mediante EE, utilizando una sonda rectal (300 mm de largo x 19 mm de diámetro, con tres electrodos de cobre longitudinales de 30 mm de longitud) (Model 303; P-T Electronics, Oregon, EEUU) (Fig. 15). Previo a colocar la sonda rectal, la ampolla rectal fue vaciada de su contenido de materia fecal. Durante la EE se aplicaron series de 10 pulsos de 4 a 5 seg en cada voltaje, descansando 2 a 3 seg entre series. Se fue incrementando de a 1 V en cada serie, comenzando en 1 V, y finalizando en el momento de la eyaculación. Se registró el voltaje y el número de series que se necesitó para provocar la erección y la eyaculación en cada animal en cada extracción.

4.4. REGISTROS DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Una vez que los animales estaban colocados en decúbito lateral sobre la mesa en la sala veterinaria, y luego de colocada la vía intravenosa, se comenzó con los registros de FC, FP, FR y oximetría. Estos fueron registrados momentos antes de comenzar la EE (AEE), durante la EE (con cada cambio de voltaje), y luego de finalizada la EE (DEE).

La FC se registró con un Polar A3 (S120™; POLAR, Oulu, Finlandia). La FR fue registrada contando los movimientos respiratorios del tórax. El pulso y la oximetría se registraron mediante el uso de oxímetro de pulso (Pulse 503 Oximeter; CSI, Criticare Systems, Waukesha, Wisconsin, EEUU), con sonda lingual. La TR se registró AEE y DEE, con un termómetro electrónico.

4.5. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS EN SANGRE Y CORTISOL

Se tomaron dos muestras de 10 ml de sangre AEE y DEE. Inmediatamente después de cada extracción las muestras fueron centrifugadas a 1080 g durante 20 min, se extrajo el suero, y el mismo fue almacenado a -20°C. La concentración de CK, AST, y FAS en suero se midió en el Laboratorio de Análisis Clínicos (Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay), con un analizador discreto de rango ultravioleta visible (Metrolab 1600 DR, Metrolab, Buenos Aires, Argentina), usando kits comerciales (Bio-Systems, Barcelona, España).

Las concentraciones de séricas de cortisol se midieron en el Laboratorio de Técnicas Nucleares (Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay), por radioinmunoanálisis, usando un kit de fase solida (DPC; Siemens, Los Angeles, California, EEUU). La sensibilidad fue de 0,2 µg/dl. Los coeficiente de variación intra ensayo e inter ensayo, fueron más bajos de 12,5 %.

4.6. RECUPERACIÓN ANESTÉSICA

Luego de finalizado todo el procedimiento, los animales fueron colocados en la camilla y trasladados a sus respectivos encierros. Fueron ubicados sobre el pasto en sitios con pendiente, con la cabeza hacia la parte más alta, y en zonas libres a 4 m a la redonda de cualquier estructura (alambrado, árboles, rocas), para evitar que los

animales se tropezaran al momento del despertar (Fig. 16). Se administraron 0,26 mg/kg de clorhidrato de yohimbina 1% (Reverze, Laboratorio Vetcross, Montevideo, Uruguay) en la vena yugular. Se registró el tiempo de recuperación de la anestesia, el que fue considerado desde la administración del antídoto, hasta que los animales se incorporaron o se colocaron en decúbito esternal.



Figura 15. Electroeyaculador usado en el estudio, con la sonda rectal y sus electrodos longitudinales de cobre.



Figura 16. Venado adulto, durante la recuperación anestésica. Observar la postura en declive del terreno, con la cabeza dirigida hacia la zona más alta, lo que facilita su incorporación.

5. PRIMER ESTUDIO: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA A LA ELECTROEYACULACIÓN, EN VENADOS DE CAMPO MACHOS, ADULTOS Y JUVENILES, ANESTESIADOS

5.1. OBJETIVO

Determinar si el voltaje aplicado durante la EE y la categoría de venados de campo anestesiados con xilacina, ketamina y atropina afecta la:

- Frecuencia cardíaca
- Frecuencia de pulso
- Frecuencia respiratoria
- Temperatura rectal
- Saturación parcial de oxígeno
- Concentración sérica de cortisol
- Concentración sérica de creatinquinasa
- Concentración sérica de aspartato aminotransferasa
- Concentración sérica de fosfatasa alcalina sérica

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. CAPTURA, EE, Y VARIABLES ANALIZADAS

Este estudio fue realizado en los meses de junio y julio de 2008 con 11 animales, 6 adultos (4-7 años de edad) y 5 juveniles (1-1,5 años de edad). La captura se realizó con dardos con anestesia disparados con una cerbatana. Una vez transcurrido el tiempo de inducción y habiendo adoptado el decúbito lateral, los animales fueron transportados en camilla hasta la sala veterinaria. Una vez estabilizados, se registraron los diferentes parámetros fisiológicos (FC, FP, FR, SpO₂, TR), y se extrajo la muestra de sangre AEE en la que se midió la concentración de las enzimas CK, AST, FAS y el cortisol. Se realizó la EE, y DEE se extrajo la segunda muestra de sangre para el análisis de las enzimas y el cortisol, y se volvieron a registrar los parámetros, FC, FP, FR, SpO₂, TR.

5.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los parámetros se compararon por ANOVA para medidas repetidas (mix model, SAS). El modelo incluyó el efecto de la categoría (adultos vs juveniles), del voltaje (AEE, 1-6 V, DEE), y su interacción. Los efectos de la categoría sobre la FC, FP y FR AEE, y sobre el tiempo de inducción y recuperación se compararon por ANOVA. Los resultados fueron considerados significativos con un $\alpha = 0,05$. Los datos se expresaron como las medias \pm SEM.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. CAPTURA Y ANESTESIA

El peso obtenido fue de $29,7 \pm 2,7$ kg en los venados adultos y $24,3 \pm 2,0$ kg en los juveniles ($P = 0,003$). Todos los animales capturados sobrevivieron al menos dos meses luego del muestreo. El protocolo anestésico utilizado permitió una captura rápida y una miorelajación suficiente como para la realización de la EE, aunque en todos los animales se observaron contracciones de los miembros posteriores provocadas por los estímulos eléctricos. No hubo diferencias entre las categorías en el tiempo de inducción o recuperación (Tabla I.) La dosis de yohimbina utilizada fue efectiva en revertir los efectos de la xilacina en todos los animales anestesiados.

Tabla I. Tiempo (min) de inducción y recuperación, de venados adultos (CA) y venados juveniles (CJ) capturados. Los resultados se presentan como medias \pm SEM.

| | CA | CJ |
|------------------------|----------------|----------------|
| Tiempo de inducción | $16,7 \pm 6,8$ | $16,8 \pm 9,5$ |
| Tiempo de recuperación | $3,0 \pm 2,5$ | $1,5 \pm 1,2$ |

5.3.2. PROTRUSIÓN, ERECCIÓN Y EYACULACIÓN

De los 11 animales, solo 6 presentaron erección completa: 2 fueron adultos y 4 juveniles. La erección ocurrió a partir de $4,0 \pm 1,4$ y $3,8 \pm 1,0$ V, en adultos y juveniles (ns). La protrusión ocurrió en 4 de los 11 animales: 2 adultos y dos juveniles. Se obtuvo semen de todos los animales, tanto adultos como juveniles, comenzando la eyaculación en $2,8 \pm 1,6$ y $3,8 \pm 1,3$ V, en adultos y juveniles respectivamente (ns). En uno de los animales juveniles, el semen se contaminó con orina.

5.3.3. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Los resultados de la FC, FP, FR y la SpO₂ en función del voltaje de la EE se presentan en la Fig. 17.

Los valores de FC AEE fueron similares en venados adultos y juveniles (Fig.17a). La FC se incrementó durante la EE ($P = 0,005$), lo que comenzó a observarse desde la aplicación de 1 V ($P < 0,0001$), sin existir cambios en el valor en el resto de los voltajes aplicados ni DEE, siendo el incremento mayor en los adultos ($P < 0,01$). No se encontró interacción entre la categoría y el V en la FC.

La FP AEE fue similar en venados adultos y juveniles (Fig. 17b), aumentó durante la EE ($P < 0,0001$), siendo el incremento mayor en los adultos ($P < 0,01$). No se encontró interacción entre la categoría y el voltaje en el pulso.

La FR no se vio afectada por la EE o la categoría (Fig. 17c). No hubo diferencias en la oximetría de acuerdo a la categoría de los machos ni tampoco a la EE, pero hubo una interacción entre ambas ($P = 0,03$) (Fig. 1d).

La TR bajó DEE ($P < 0,0001$), sin diferencias entre machos adultos y juveniles (Tabla II).

5.3.4. ENZIMAS EN SANGRE Y CORTISOL

La concentración de CK, FAS, y AST en plasma, y del cortisol AEE y DEE en suero se presenta en la Tabla II. La concentración de la FAS y de la CK fueron mayores en los venados juveniles ($P < 0,05$), y la concentración fue mayor DEE ($P < 0,001$, y $P < 0,01$) respectivamente. La AST aumentó DEE ($P < 0,05$), sin existir diferencias entre las categorías. No se observaron efectos significativos en la concentración del cortisol.

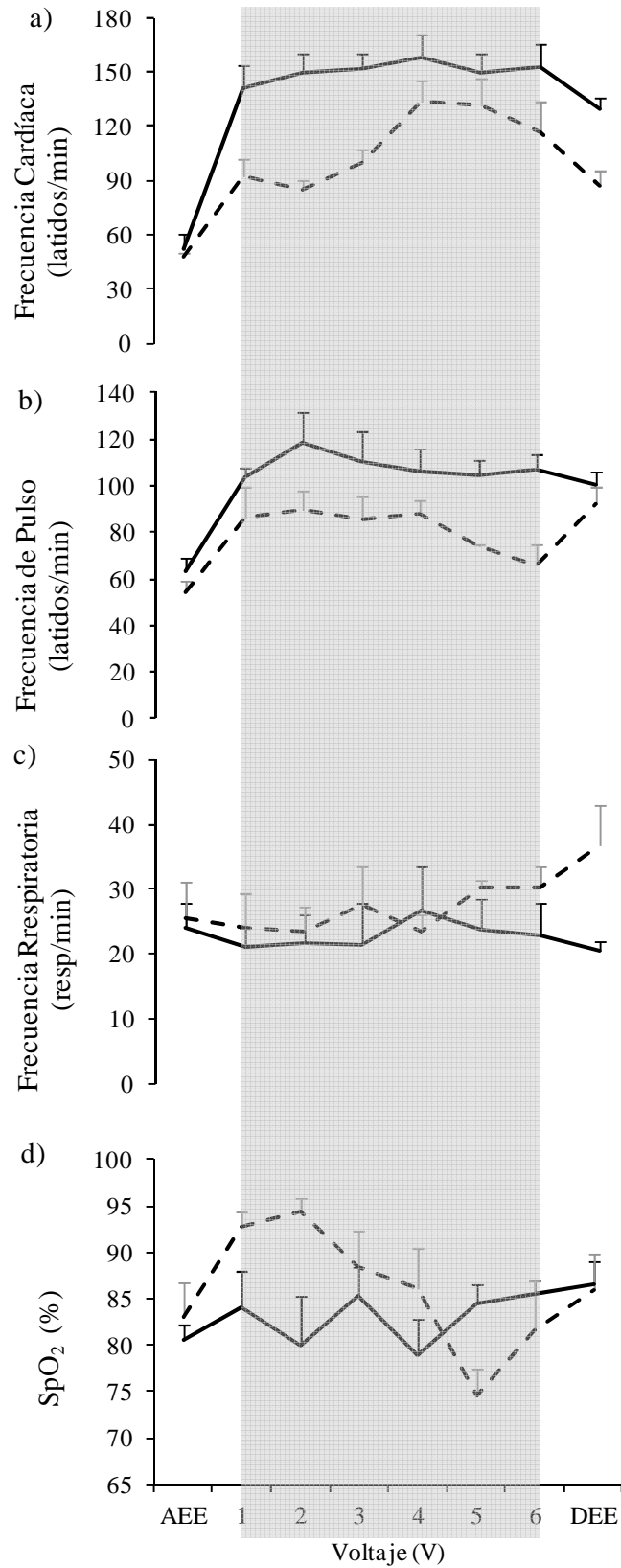


Figura 17. Frecuencia cardíaca (a), frecuencia de pulso (b), frecuencia respiratoria (c), saturación parcial de oxígeno (d), antes (AEE), durante (sombra gris) y después (DEE), de la EE en venados de campo, adultos (línea continua), y juveniles (línea discontinua), anestesiados.

Tabla II. Temperatura rectal, concentración de creatinquinasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina sérica y cortisol, obtenidos antes y después de la EE (AEE y DEE), en adultos (CA) y juveniles (CJ), de venados de campo anestesiados. Los resultados se presentan como medias \pm SEM.

| | CA | | CJ | | P | | |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|--------|-----|
| | AEE | DEE | AEE | DEE | Tr | T | Int |
| TR (°C) | 37,5 \pm 0,8 | 36,7 \pm 0,7 | 37,6 \pm 0,4 | 37,1 \pm 0,4 | NS | 0,0001 | NS |
| CK (UI/l) | 157 \pm 125 | 370 \pm 40 | 303 \pm 56 | 788 \pm 251 | <0,05 | <0,01 | NS |
| AST (UI/l) | 71 \pm 24 | 75 \pm 12 | 76 \pm 19 | 99 \pm 18 | NS | <0,05 | NS |
| FAS (UI/l) | 251 \pm 85 | 323 \pm 118 | 404 \pm 85 | 444 \pm 96 | <0,05 | <0,001 | NS |
| Cortisol (μ g/dl) | 0,2 \pm 0,03 | 1,0 \pm 1,0 | 0,5 \pm 0,3 | 0,9 \pm 0,9 | NS | NS | NS |

TR, Temperatura rectal; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; FAS, fosfatasa alcalina sérica; Tr, efecto de la categoría, T, efecto del tiempo (AEE Vs DEE), Int, interacción entre la categoría y el tiempo.

5.4. DISCUSIÓN

De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer estudio que describe los efectos de la EE bajo AG, sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos sanguíneos en venados de campo. Por otro lado, este tipo de información también es escasa en otros cérvidos, así como en otros rumiantes silvestres y domésticos. En relación a la asociación anestésica y dosis utilizada en este estudio para la captura, como en el manejo anestésico durante la EE, es posible afirmar que la misma resultó ser efectiva ya que todos los animales resultaron inmovilizados y no existieron complicaciones anestésicas.

Todos los animales presentaron un tiempo de inducción rápido, lo que disminuyó el riesgo de accidentes de los mismos, así como del personal que participó de la captura. El tiempo de inducción en este estudio fue más largo a lo observado en el ciervo cola blanca (Delgiudice et al. 1990), pero dentro del rango descrito para la xilacina por Caulkett y Arnemo (2007). Esta diferencia en el tiempo de inducción podría deberse a que se utilizó una menor dosis de ketamina a la usada por otros autores (Delgiudice et al. 1990), incluso menor a la dosis utilizada anteriormente en la misma especie (Duarte y Garcia, 1997), lo que disminuye el efecto residual de la droga (Caulkett y Arnemo, 2007). La misma provoca un despertar prolongado, con una importante ataxia de los animales por un periodo de tiempo considerable luego de finalizada la anestesia. Este efecto queda de manifiesto en anestesias de poca duración donde al revertir a los α -2-agonistas usados en combinación con la ketamina, los efectos de esta última perduran por más tiempo (Kreeger et al. 2002; Caulkett y Arnemo, 2007). Al usar una dosis menor de ketamina, como la utilizada por otros autores (Arnemo et al. 2005), DEE, fue posible llevar rápidamente a los animales a sus encierros y revertir los efectos de la xilacina, sin que se visualizaran

efectos residuales de la ketamina. Esto evitó tener que monitorear por un período de tiempo prolongado a los animales luego de la anestesia (Caulkett y Arnemo, 2007). Además, ello permitió evitar agresiones por parte de los otros machos del encierro, considerando que se ha observado comportamiento agonista hacia los animales anestesiados, tal como sucede en carneros bighorn (Pelletier et al. 2004), y ciervo dama (Jennings, 2007). El efecto de la anestesia fue revertido rápidamente en todos los animales, y el tiempo de reversión fue similar al reportado en cabras montesas anestesiados y electroeyaculados (Santiago-Moreno et al. 2011).

Todos los animales eyacularon, pero no todos presentaron protrusión y erección del pene. Si bien la anestesia no interfirió con el proceso de eyaculación, el que es controlado por la vía nerviosa simpática (Busso et al. 2005), si interfirió en la protrusión y erección que son controlados por la vía parasimpática (Knight, 1974; Busso et al. 2005). Se presume que los α -2-agonistas podrían provocar la contracción de las glándulas anexas en los machos, lo que podría facilitar la eyaculación, mientras que la erección y la protrusión se ven disminuidas o ausentes (Santiago-Moreno et al. 2011). Aparentemente la falta de protrusión y de erección se debería más a un efecto de la ketamina que de la xilacina (Santiago-Moreno et al. 2010). La contaminación de muestras de semen con orina es algo que puede ocurrir relacionado también con la anestesia, dado que el mismo efecto simpático que ocurre en las glándulas anexas ocurriría en la vejiga, determinando la micción (Santiago-Moreno et al. 2010). Además la contaminación de la muestra de semen con orina es algo que ocurre comúnmente en la EE (Scott et al. 1959; Watson, 1978), debido a la proximidad de las vías neurales que controlan la función vesical de las que inducen la eyaculación.

Dado que no existen datos sobre los valores de referencia de la FC, FP, FR y de la TR en el venado de campo, es difícil llegar a conclusiones firmes sobre los cambios cardiorespiratorios y termorregulatorios. De todas formas varias de las modificaciones inducidas por la EE plantean algunos puntos interesantes de discutir.

La FC y el pulso registrados AEE, podrían ser considerados bradicárdicos, más aún considerando que los animales fueron medicados con atropina, lo que debería haber aumentado la FC a valores superiores a los obtenidos. Además del hecho de que las capturas resultan estresantes en los animales silvestres y ese estrés agudo determina un aumento de la FC (Broom y Johnson, 1993). Los valores serían aún más bradicardicos considerando los efectos de la ketamina: aumento de la presión arterial, el gasto y la FC (Walsh y Wilson, 2002; McKelvey y Hollingshead, 2003a), los que contrarrestan los efectos de la xilacina (Hui-Chu, 2007). Además los valores obtenidos fueron inferiores a los descritos para otras especies de rumiantes anestesiados (DelGiudice et al. 1989; Santiago-Moreno et al. 2011). Esto se podría deber al efecto depresor de la xilacina sobre la FC (Seal y Bush, 1987; Caulkett y Arnemo, 2007; Santiago-Moreno et al. 2010). El incremento de los valores de frecuencia cardíaca y de pulso luego de comenzada la EE, podría estar asociado a la presencia de dolor, como sucede en toros (Mosure et al. 1998) y carneros (Orhiuela et al. 2009; Damián y Ungerfeld, 2011) electroeyaculados. Otro dato que refuerza lo anterior, es la tendencia de la FC y FP a disminuir luego de finalizada la EE, aunque el tiempo registrado no fue suficiente para que alcanzaran los valores registrados AEE. La diferencia entre la FC y del pulso entre los venados adultos y juveniles, puede deberse a una menor respuesta dolorosa en estos últimos producida por un mayor efecto analgésico de la xilacina (Mckelvey y Hollingshead, 2003a; Caulkett y Arnemo, 2007).

Los valores de oximetría se mantuvieron siempre (AEE, durante EE y DEE), por debajo de 90%, pudiendo suponer que los animales presentaron una mala oxigenación y por lo tanto hipoxemia durante todo el manejo anestésico. Los valores observados fueron similares a los reportados en otros cérvidos anestesiados (wapití: Read et al. 2001; ciervo porcino: Arnemo et al. 2005; reno: Risling et al. 2011). Estos valores podrían ser causados por la anestesia con los α -2-agonistas (Haigh, 1982; Celly et al. 1997; Read et al. 2001; Caulkett y Arnemo, 2007; Santiago-Moreno et al. 2010, 2011), o por el decúbito lateral prolongado (Wagner et al. 1990; Read et al. 2001).

La disminución de los valores de la TR registrados podría ser consecuencia del tiempo de anestesia con α -2-agonistas (Mckelvey y Hollingshead, 2003b). En este sentido, se sabe que los α -2-agonistas pueden producir tanto hipo como hipertermia (Livingston et al. 1984; Caulkett y Arnemo, 2007; Santiago-Moreno et al. 2010), pudiendo depender esto de la temperatura del medio ambiente (Ponder y Clark, 1980). La temperatura ambiente no presentó variaciones durante la EE, ya que la misma se realizó en un ambiente cerrado con la temperatura controlada, por lo que es posible asumir que la depresión de la TR se deba a la duración de la anestesia y al efecto de los α -2-agonistas.

El incremento de las concentraciones de CK y AST DEE podría deberse a un trabajo muscular intenso, o a daño muscular (Cardinet, 1997). También se describe el aumento de la concentración de CK debido al daño del musculo esquelético y cardiaco (Akatas et al. 1993), por lo que el aumento en este estudio podría deberse al incremento del trabajo cardiaco y a los violentos movimientos de los miembros posteriores observados durante la EE. Otros autores reportaron incrementos similares de CK en carneros electroeyaculados (Damián y Ungerfeld, 2011). A pesar del

incremento de la AST, los valores fueron menores a los descritos por otros autores como consecuencia del daño muscular (berrendo: Chalmers y Barrett, 1977; alces: Haigh et al. 1977; bovinos, cérvidos y equinos: Wallace et al. 1987). Por otro lado, al no conocer las concentraciones basales de estas enzimas en la especie estudiada, no puede descartarse que el valor registrado AEE ya fuera alto, y que su incremento se deba al estrés de la captura (Santiago-Moreno et al. 2011).

Los valores de FAS AEE fueron mayores a los registrados en venados de campo capturados en una población silvestre (Uhart et al. 2003). El aumento de FAS se produce como consecuencia del daño tisular del hígado, daño óseo o crecimiento óseo (Tennant, 1997). No se encontró una explicación para el incremento de FAS DEE. Los venados juveniles presentaron valores mayores de CK y FAS que los venados adultos, probablemente a consecuencia del crecimiento del aparato musculo esquelético en los animales juveniles (Marco et al. 1997; Pérez et al. 2003). La concentración del cortisol no presentó cambios en relación a la EE. Al desconocer los valores basales y máximos del cortisol en esta especie, no puede descartarse que la concentración del cortisol ya estuviera aumentada antes de la primera extracción de sangre, como consecuencia del estrés de la captura (English y Lopherd, 1981; Chapple et al. 1991).

5.5. CONCLUSIONES

La EE bajo AG en el venado de campo provocó cambios en algunos parámetros fisiológicos. Esos cambios variaron de acuerdo a la categoría estudiada, y se vincularon al voltaje utilizado durante la EE.

Los cambios en los parámetros estudiados no indicaron riesgos para la vida de los animales, a excepción de la saturación parcial de oxígeno, la cual se debería monitorear y en caso necesario, corregir.

La electroeyaculación bajo anestesia general, con xilacina, ketamina y atropina, es un método adecuado para la obtención de semen en el venado de campo adulto y juvenil.

6. SEGUNDO ESTUDIO: REPETICIÓN DE LAS EXTRACCIONES DE SEMEN MEDIANTE EE EN VENADOS DE CAMPO MACHOS ADULTOS Y JUVENILES ANESTESIADOS

6.1. OBJETIVO

Determinar si la respuesta a la EE es afectada por la repetición del procedimiento en forma estacional (otoño, invierno, primavera, verano, y nuevamente otoño).

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron 53 capturas y electroeyaculaciones en 5 oportunidades diferentes. La primera extracción, marzo 2008, se trabajó con 12 animales, la segunda extracción se realizó en junio-julio 2008 con 11 animales, la tercera extracción fue en setiembre-octubre 2008 con 11 animales, la cuarta extracción en enero 2009 con 10 animales, y la última y quinta extracción en marzo 2009 con 9 animales. Se analizaron los datos de las 5 extracciones, pero para determinar el efecto de la repetición de la EE sobre las variables fisiológicas (FC, FP, FR y SpO₂) se analizaron los datos de cuatro extracciones, dado que como ya fue explicado en la primera extracción no se registraron los mismos datos. En la evaluación de la repetición de la EE sobre las variables enzimáticas y hormonales (cortisol), así como de la TR, se analizaron los datos de las 5 extracciones.

6.2.1. CAPTURA, EE, Y VARIABLES ANALIZADAS

En las cinco extracciones siempre se trabajó con los mismos grupos de venados de campo, 6 adultos y 5 juveniles (4-7 años y 1-1,5 años respectivamente al inicio del estudio). Toda la metodología y los materiales utilizados fueron los mismos descritos en la metodología general y en el Estudio 1. La captura se realizó por intermedio de dardos con anestesia disparados con una cerbatana. La combinación anestésica utilizada siempre fue la misma en todas las extracciones (xilacina + ketamina + atropina).

Se evaluaron las mismas variables en todas las extracciones: FC, FR, FP, TR, SpO₂, cortisol sérico, enzimas (CK, FAS) AEE y DEE. No se determinó la concentración de AST, en todas las extracciones, por lo que el efecto de la repetición de la extracción no fue estudiado. Durante la EE, se volvieron a registrar todas las

variables fisiológicas antes descritas en cada pulso eléctrico. También se determinó el voltaje en que comenzó la erección, y la protrusión del pene, así como el comienzo de la eyaculación. Por último los animales fueron devueltos a sus encierros, y la anestesia fue revertida con yohimbina. Se registraron los tiempos de inducción y los tiempos en que los animales se despertaron.

6.2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los parámetros se compararon por ANOVA para medidas repetidas. El modelo incluyó el efecto categoría (adultos vs juveniles), el efecto voltaje (AEE, 1-6 V, DEE), y el efecto del número de extracción. Se analizó la interacción categoría y repetición de la extracción. Los resultados fueron considerados significativos con un $\alpha = 0,05$. Los datos se expresaron como las medias \pm SEM.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. CAPTURA Y ANESTESIA

Todos los animales capturados sobrevivieron al menos dos meses luego de cada muestreo. Durante el período del estudio murió un animal juvenil que sólo formó parte de la primera extracción (otoño de 2008), utilizándose 5 juveniles durante el resto de las extracciones (invierno, primavera, verano y otoño de 2009). En el grupo de adultos murieron 2 animales, quedando 5 durante el verano, y 4 en la última extracción (otoño de 2009). Si bien estos tres animales murieron durante el período del estudio, ninguna de estas muertes estuvo vinculada a las manipulaciones realizadas.

Aunque la combinación y la dosis utilizada permitió en todos los casos la captura de los animales, en 10 de las 53 capturas se debió reforzar la dosis anestésica con ketamina (0,8 mg/kg) intravenosa durante la EE. La dosis de yohimbina utilizada fue efectiva en revertir los efectos de la xilacina en todos los animales anestesiados, solo en 3 de las capturas se observó luego de la reversión un efecto residual de la ketamina, provocando que los animales demoraran en incorporarse y caminaran de forma atáxica por unos 20 minutos. No hubo efectos de la categoría en los tiempos de inducción y de recuperación (Tabla III).

Tabla III. Tiempo (min) de inducción y recuperación de las 53 capturas de venados adultos (CA) y venados juveniles (CJ). Los resultados se presentan como medias \pm SEM.

| | CA | CJ |
|------------------------|----------------|-----------------|
| Tiempo de inducción | 12,0 \pm 0,6 | 14,0 \pm 10,0 |
| Tiempo de recuperación | 2,6 \pm 2,4 | 2,3 \pm 1,8 |

6.3.2. ERECCIÓN, PROTRUSIÓN Y EYACULACIÓN

De las 53 extracciones realizadas solo en 22 (41,5%) hubo una erección completa. De los animales que la presentaron, la mitad fueron de cada categoría. La erección ocurrió a partir de $4,2 \pm 0,9$ y $4,5 \pm 1,0$ V en adultos y juveniles (ns). Solo en 13 (24,5%) de las extracciones hubo protrusión del pene. En todas las extracciones se obtuvo semen: la eyaculación se inició en $3,0 \pm 1,5$ y $3,8 \pm 1,8$ V, en adultos y juveniles respectivamente ($P = 0,06$). En 3 de las 53 extracciones la muestra de semen se contaminó con orina (1 adulto y 2 juveniles).

6.3.3. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

La FC AEE fue similar en los venados adultos y juveniles en todas las extracciones (65 ± 33 latidos/min) (Fig. 18a). Existió un efecto repetición de la extracción, con aumento ($P < 0,0001$) de los valores de FC en la 3^{er} y 5^a extracción, sin que existiera un efecto categoría (en la repetición de las extracciones los resultados se presentan agrupados) (Fig. 19). No se encontró una interacción entre la categoría y la repetición de la extracción.

El valor de FP AEE fue similar en los machos adultos y juveniles en todas las extracciones (69 ± 25 latidos/min) (Fig. 18b). La FP no fue afectada por la repetición de la extracción, ni por la categoría (Fig. 20), siendo el único efecto el voltaje (Fig. 18b).

Los valores de FR AEE, durante y DEE, fueron similares en ambas categorías (Fig. 18c). Existió un efecto del voltaje, que produjo un incremento en ambas categorías ($P = 0,0005$) a partir de los 4 V, aumento que se mantuvo en el resto de los voltajes y DEE. Los valores de la FR fueron menores en la 4^a extracción y mayores

en la 5ª ($P < 0,0001$) (Fig. 21). No hubo interacción entre la categoría y el voltaje, ni tampoco entre la categoría y la repetición de la extracción.

La SpO_2 no varió en función del voltaje ni de la categoría (Fig. 18d), pero si hubo un efecto de la repetición de la extracción ($P = 0,02$), presentando valores menores durante la 4ª extracción (Fig. 22). No hubo interacción entre la categoría y el voltaje, ni tampoco entre la categoría y la repetición de la extracción.

Los valores de TR no fueron diferentes entre venados adultos y juveniles, aunque disminuyeron DEE ($P = 0,007$) (Tabla IV). Los valores de TR variaron entre las extracciones ($P = 0,0001$), presentando valores más altos en la 1ª, 4ª y 5ª y más bajos en la 2ª y 3ª extracción (Fig. 23).

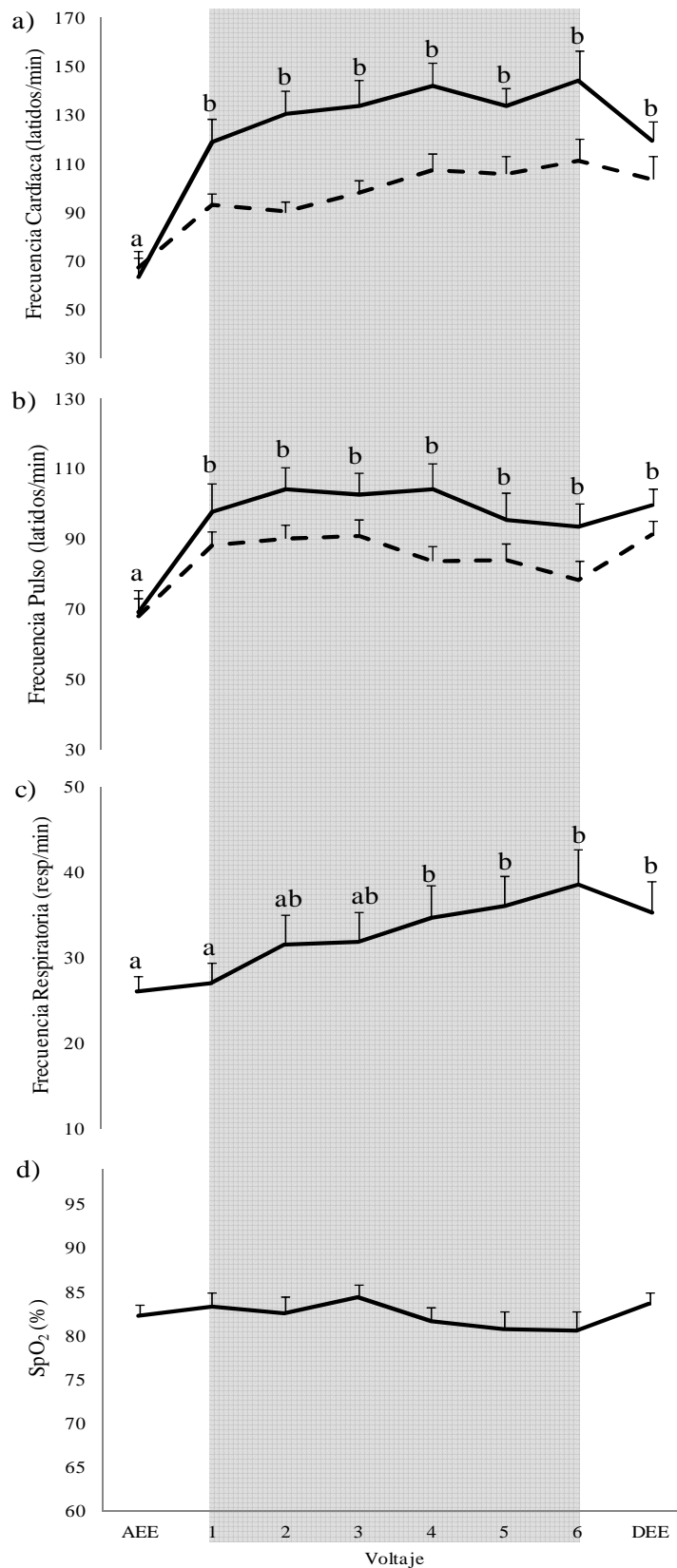


Figura 18. Frecuencia cardíaca (a), frecuencia de pulso (b), frecuencia respiratoria (c), saturación parcial de oxígeno (d), antes (AEE), durante (sombra gris) y después (DEE), de la EE en venados de campo, adultos (línea continua), y juveniles (línea discontinua), anestesiados. Los datos de frecuencia respiratoria y SpO₂, se presentan agrupados.

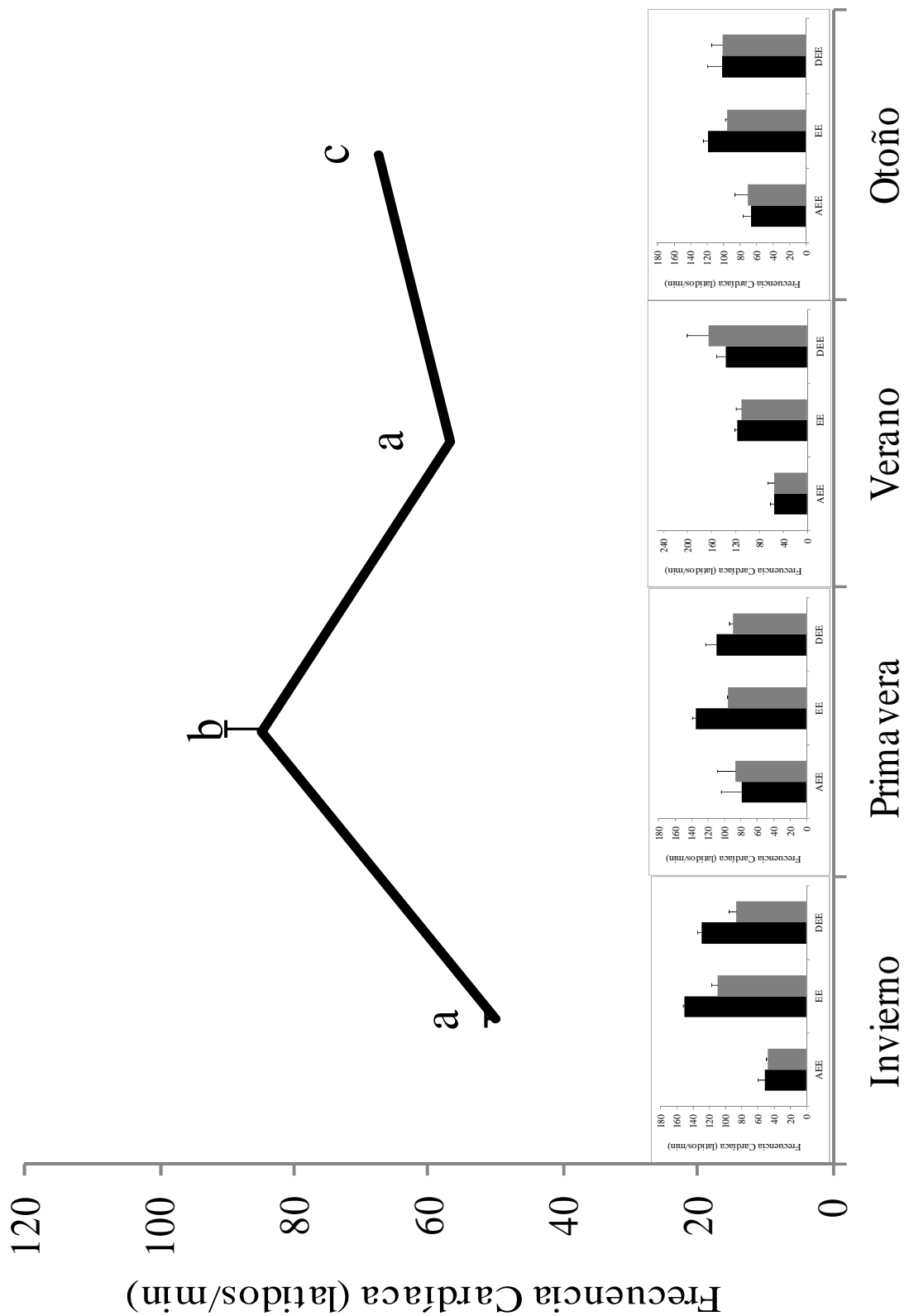


Figura 19. Frecuencia cardíaca, en la 2^a, 3^a, 4^a, y 5^a extracción (trimestrales) en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. Los datos durante las extracciones se presentan agrupados. Se incluyen en gráficas insertas los datos de frecuencia cardíaca AEE, durante y DEE, de cada extracción, en venados adultos (barras oscuras) y juveniles (barras claras). Letras diferentes indican diferencias entre las extracciones.

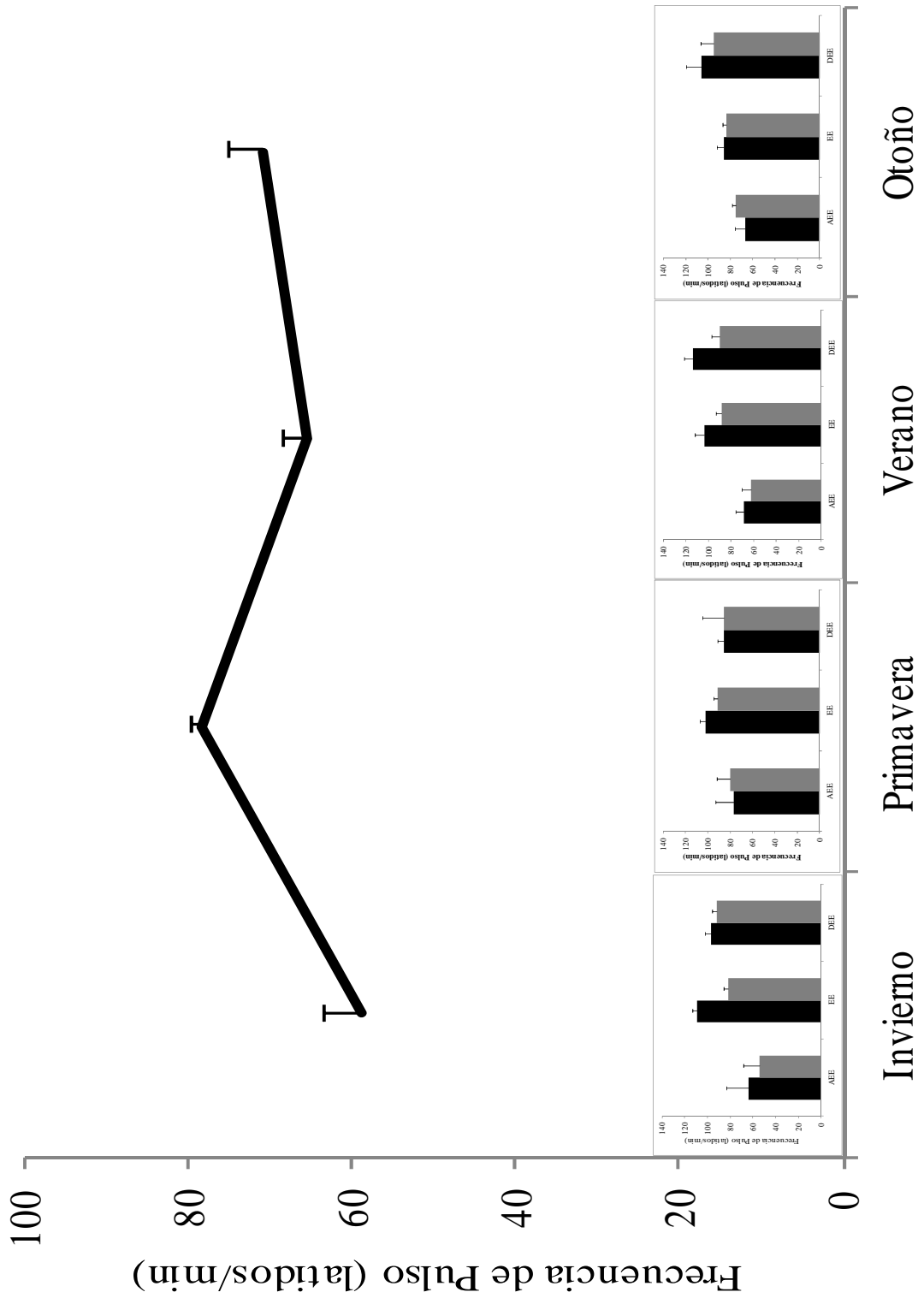


Figura 20. Frecuencia pulso, en la 2^a, 3^a, 4^a, y 5^a extracción (trimestrales) en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. Los datos durante las extracciones se presentan agrupados. Se incluyen en gráficas insertas los datos de frecuencia pulso AEE, durante y DEE, de cada extracción, en venados adultos (barras oscuras) y juveniles (barras claras).

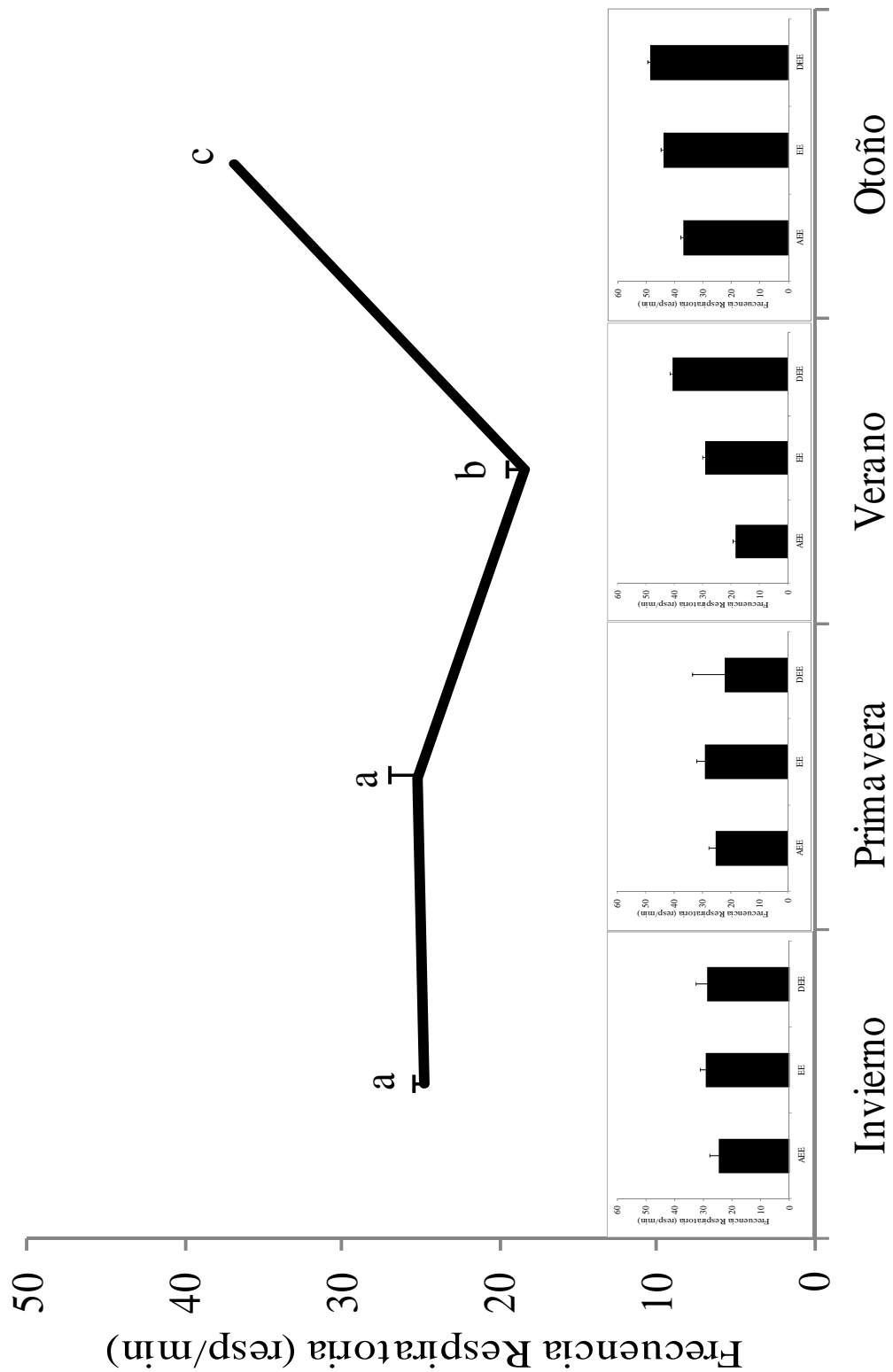


Figura 21. Valor de frecuencia respiratoria, en la 2^a, 3^a, 4^a, y 5^a extracción (trimestrales) en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. Los datos durante las extracciones se presentan agrupados. Se incluyen en gráficas insertas los datos agrupados de frecuencia respiratoria AEE, durante y DEE, de cada extracción, en venados adultos y juveniles (barras oscuras). Letras diferentes indican diferencias entre las extracciones.

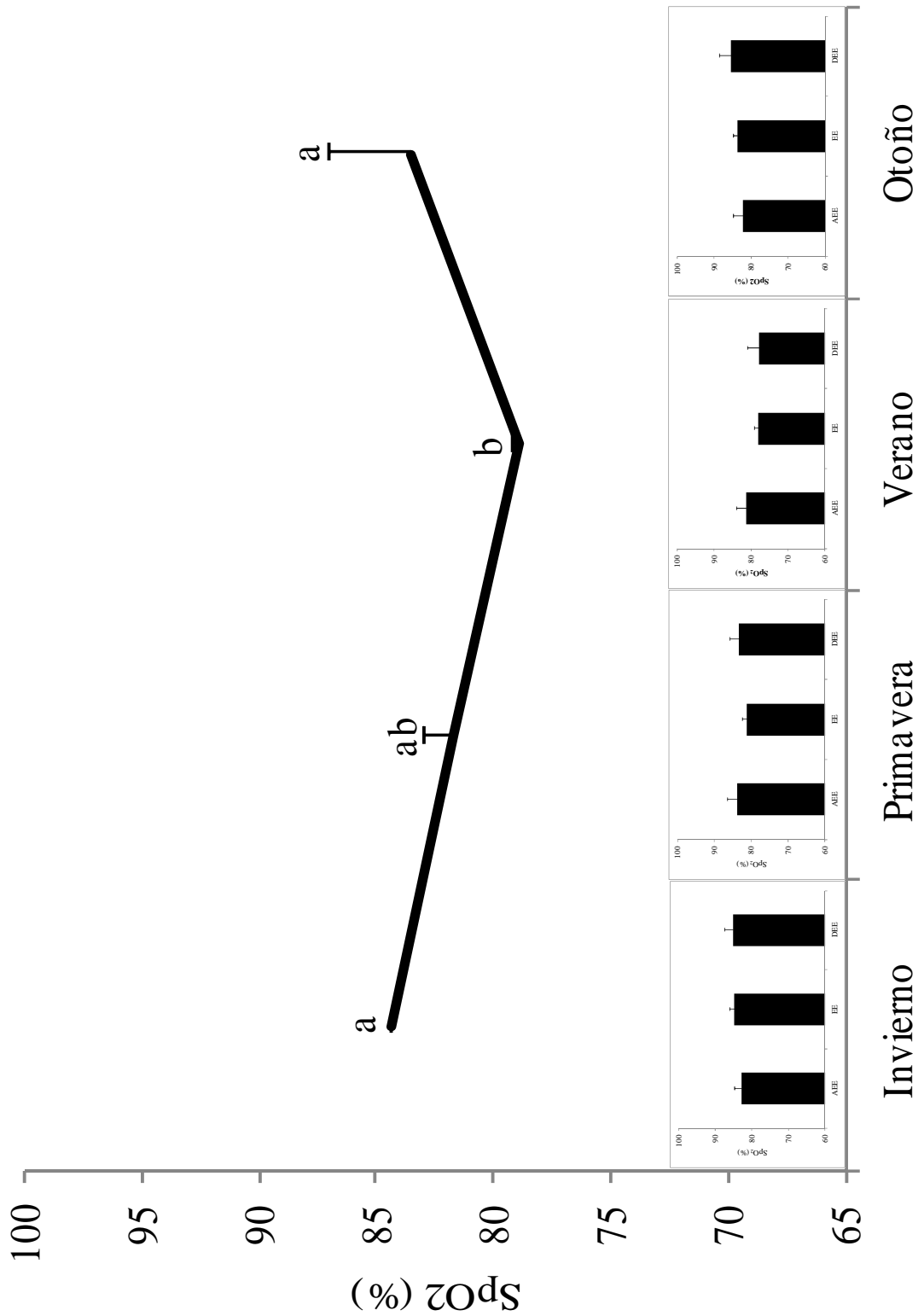


Figura 22. Valor de SpO₂, en la 2^a, 3^a, 4^a, y 5^a extracción (trimestrales) en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. Los datos durante las extracciones se presentan agrupados. Se incluyen en gráficas insertas los datos agrupados de SpO₂ AEE, durante y DEE, de cada extracción, en venados adulto y juveniles (barras oscuras). Letras diferentes indican diferencias entre las extracciones.

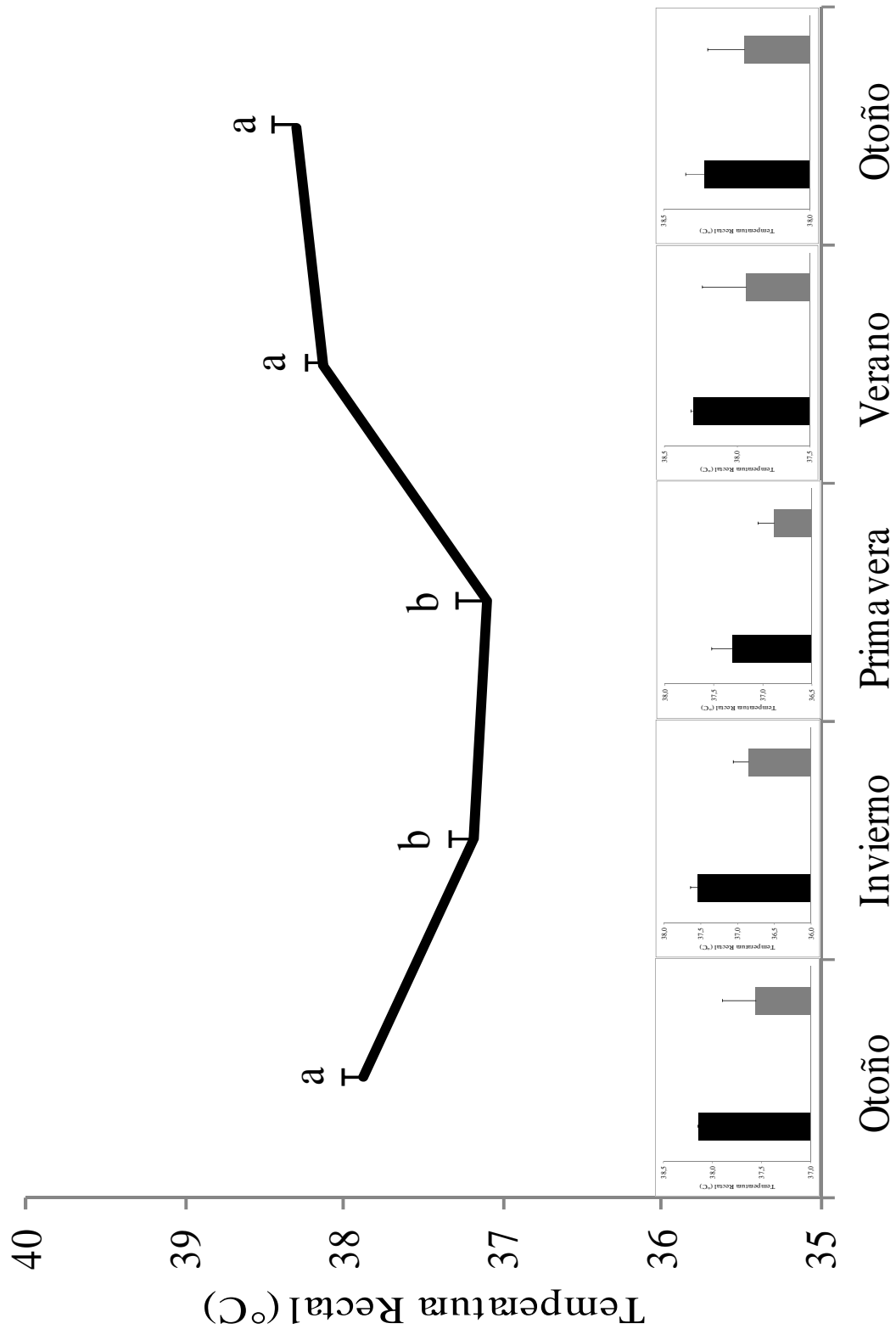


Figura 23. Valor de temperatura rectal, en las cinco extracciones (trimestrales) en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. Los datos durante las extracciones se presentan agrupados. Se incluyen en gráficas insertas los datos de temperatura rectal, los mismos se presentan agrupados AEE (barras oscuras) y DEE (barras claras), de cada extracción, en venados adultos y juveniles. Letras diferentes indican diferencias entre las extracciones.

6.4.4. ENZIMAS EN SANGRE Y CORTISOL

Los resultados de las enzimas (CK, AST, FAS) y del cortisol de los venados adultos (CA) y juveniles (CJ), estudiados durante la EE en todas las extracciones, se resumen en la Tabla IV. Existió un incremento en la concentración de CK DEE ($P < 0,001$), y una tendencia ($P = 0,09$) a que la concentración en los venados juveniles fuese mayor que la de los adultos. La concentración de CK fue afectada por la repetición de la extracción ($P = 0,02$), mostrando una concentración más alta en la 2ª extracción y más baja en la 5ª extracción (Fig. 24). La concentración de AST no fue diferente entre categorías. Existió un incremento en la concentración de esta enzima, en ambas categorías DEE. La concentración de FAS fue similar entre las categorías, pero presentó una tendencia a incrementarse DEE ($P = 0,08$). Existieron diferencias en la concentración de la FAS entre las extracciones ($P = 0,0001$), siendo mayor la concentración en la 3ª y 5ª extracción (Fig. 25).

La concentración del cortisol aumentó DEE ($P = 0,005$) sin diferencias entre las categorías. La concentración del cortisol (Fig. 26) presentó una tendencia a ser diferente entre las extracciones ($P = 0,08$).

Tabla IV. Valores de Temperatura rectal, concentración de creatina quinasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina sérica y cortisol, obtenidos antes y después de la EE (AEE y DEE), en 5 extracciones en venados adultos (CA) y juveniles (CJ) anestesiados. Los resultados se presentan como medias \pm SEM.

| | CA | | CJ | | P | | |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------|-------|-----|
| | AEE | DEE | AEE | DEE | Tr | T | Int |
| TR (°C) | 37,7 \pm 0,8 ^a | 37,2 \pm 0,8 ^b | 38,0 \pm 0,6 ^a | 37,6 \pm 1,2 ^b | NS | 0,007 | NS |
| CK (UI/l) | 144 \pm 73,6 ^a | 290 \pm 225 ^b | 246 \pm 172 ^a | 447 \pm 331 ^b | 0,09 | 0,001 | NS |
| AST (UI/l) | 71 \pm 24 ^a | 75 \pm 12 ^a | 76 \pm 19 ^a | 99 \pm 18 ^b | NS | 0,05 | NS |
| FAS (UI/l) | 372 \pm 192 | 477 \pm 235 | 472 \pm 339 | 506 \pm 284 | NS | 0,08 | NS |
| Cortisol (μ g/dl) | 0,49 \pm 0,45 ^a | 1,27 \pm 0,96 ^b | 0,96 \pm 0,60 ^a | 1,59 \pm 1,45 ^b | NS | 0,005 | NS |

TR, Temperatura rectal; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; FAS, fosfatasa alcalina sérica; Tr, efecto de la categoría, T, efecto del tiempo (AEE Vs DEE), Int, interacción entre la categoría y el tiempo.

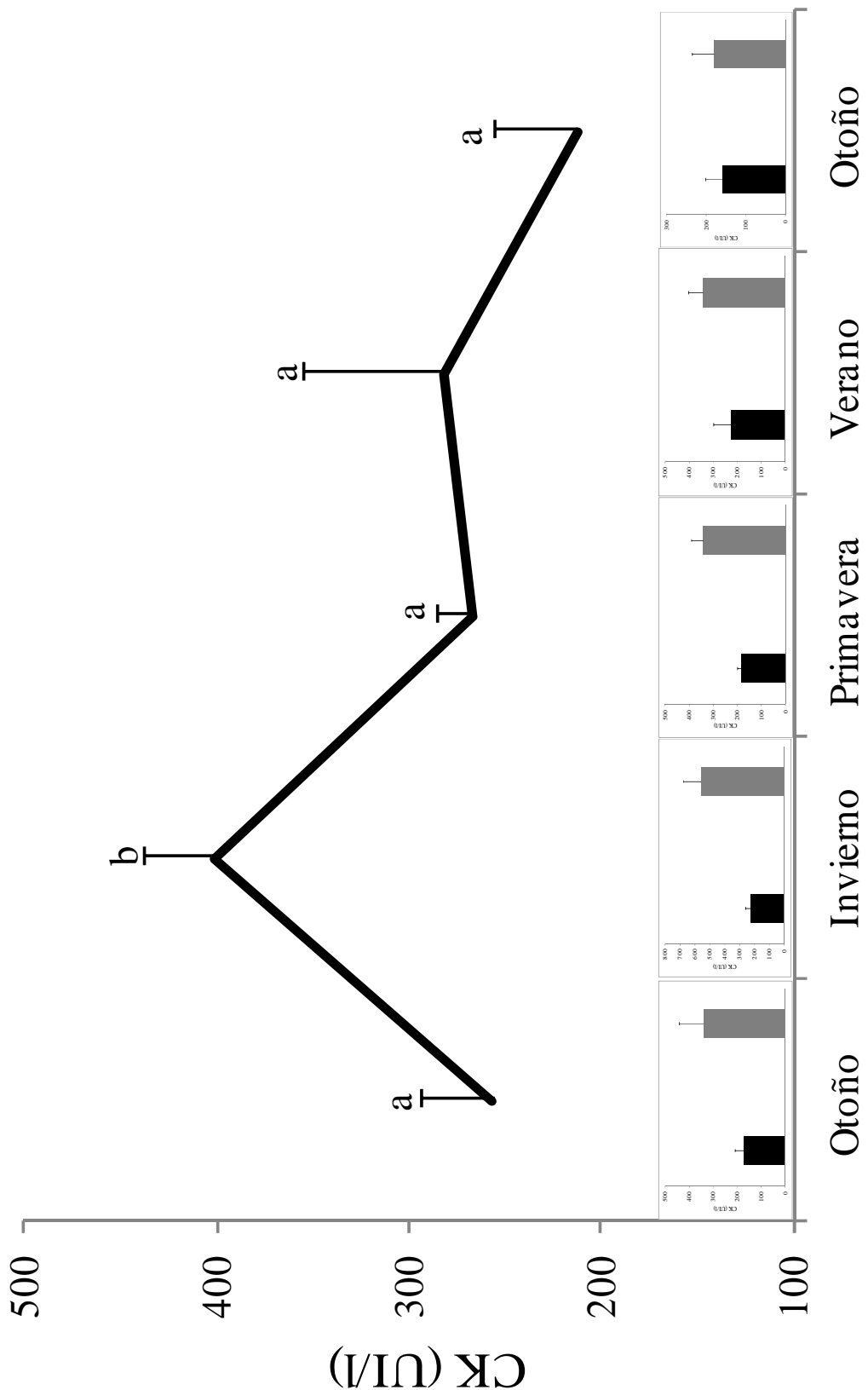


Figura 24. Valor de creatinquinasa, en las cinco extracciones (trimestrales) en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. Los datos durante las extracciones se presentan agrupados. Se incluyen en gráficas insertas los datos de creatinquinasa, los mismos se presentan agrupados AEE (barras oscuras) y DEE (barras claras), de cada extracción, en venados adultos y juveniles. Letras diferentes indican diferencias entre las extracciones.

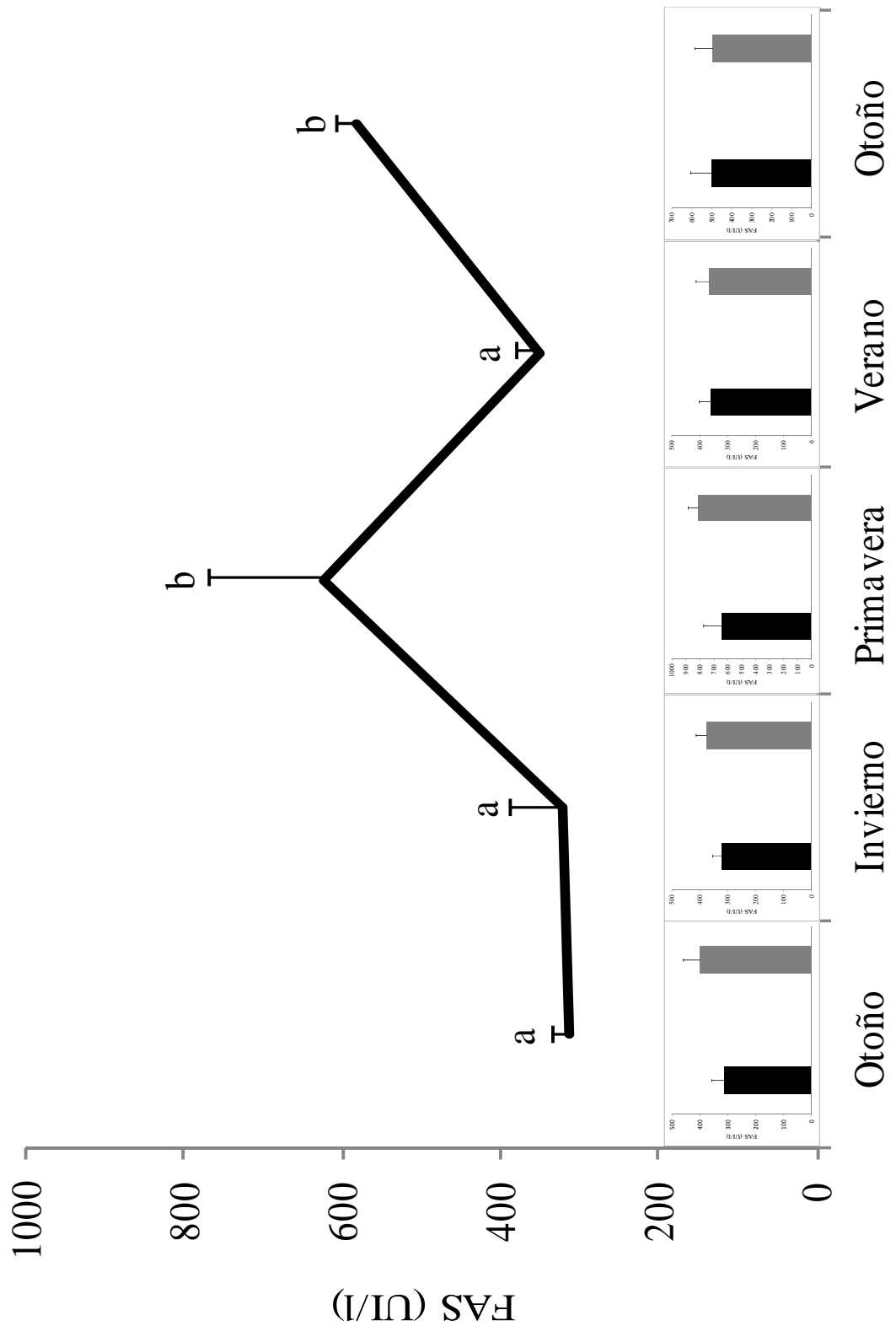


Figura 25. Valor de fosfatasa alcalina sérica, en las cinco extracciones (trimestrales) en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. Los datos durante las extracciones se presentan agrupados. Se incluyen en gráficas insertas los datos de fosfatasa alcalina sérica, los mismos se presentan agrupados (barras oscuras) AEE y DEE (barras claras), de cada extracción, en venados adultos y juveniles. Letras diferentes indican diferencias entre las extracciones.

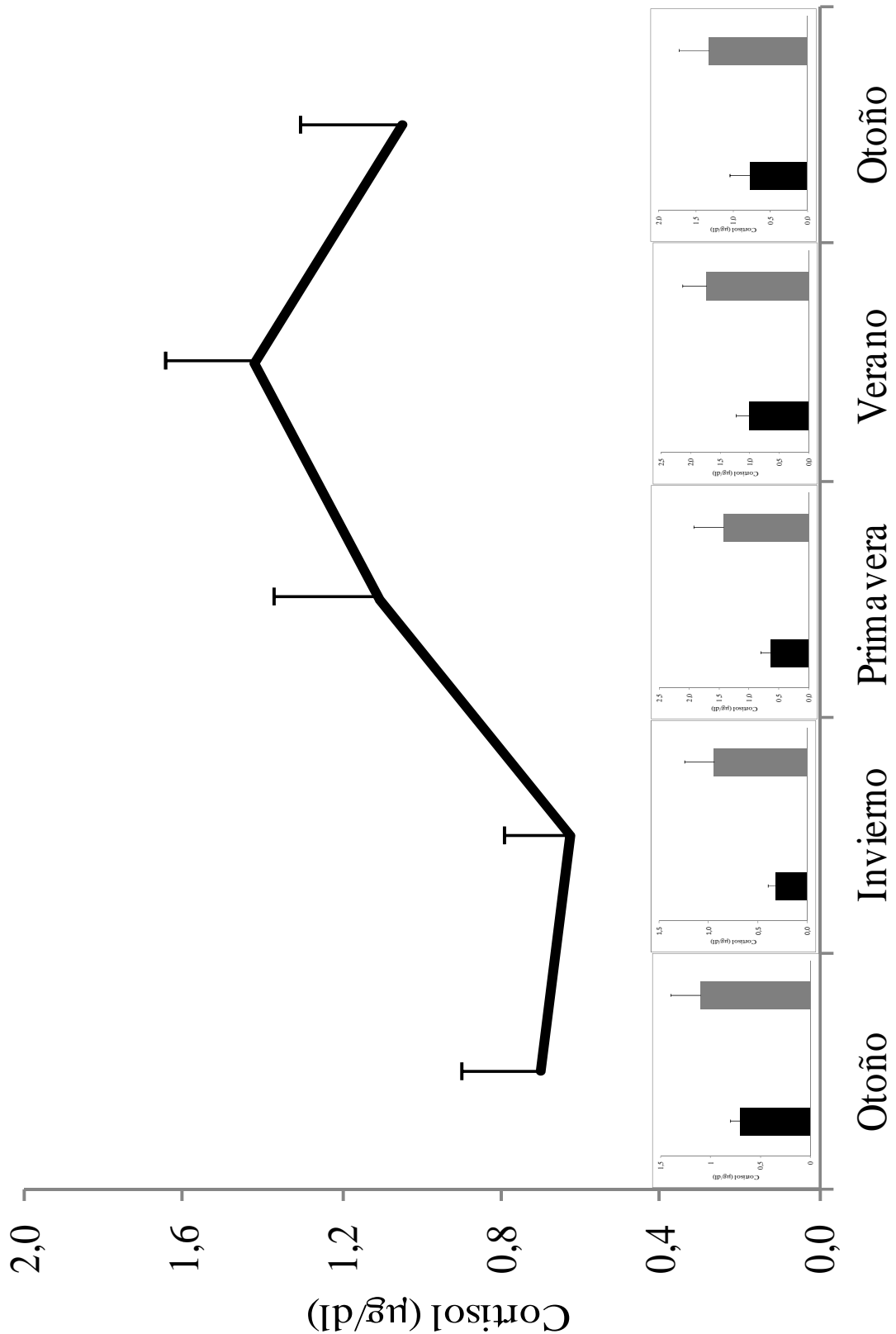


Figura 26. Cortisol, en las cinco extracciones (trimestrales) realizadas en venados de campo, adultos, y juveniles, anestesiados. Los datos durante las extracciones se presentan agrupados. Se incluyen en gráficas insertas los datos de cortisol, los mismos se presentan agrupados (barras oscuras) AEE y DEE (barras claras), de cada extracción, en venados adultos y juveniles. Letras diferentes indican diferencias entre las extracciones.

6.4. DISCUSIÓN

Al haberse utilizado los mismos animales en todas las extracciones, no fue posible discriminar los efectos de la estación de los de la repetición de los tratamientos. Dado que se trabajó con una especie en riesgo, la repetición permitió trabajar con un bajo número de animales, aumentando el número de extracciones con las repeticiones.

Si bien hubo cambios en algunas de las variables estudiadas durante las extracciones, los mismos no pueden ser adjudicados a la repetición de la extracciones, y si probablemente a efectos ambientales en cada una de las extracciones. Esto surge a partir de que ninguno de los cambios vistos en los parámetros estudiados se mantuvo en más de una extracción, y la direccionalidad de los cambios no se repitió en extracciones sucesivas. Por lo tanto no es posible afirmar que la repetición provoque incrementos o disminuciones en las variables estudiadas, y si que estos efectos se deban a situaciones puntuales (crecimiento de las astas) relacionadas al momento o la estación en que se realizo la extracción.

La asociación anestésica y dosis utilizada en este estudio para la captura, como el manejo anestésico durante la EE, fueron efectivos ya que en las 53 extracciones los animales resultaron inmovilizados, no existieron complicaciones anestésicas en ningún caso, y en todos los casos se obtuvo semen. Al igual que en el primer estudio, todos los animales en todas las extracciones presentaron un tiempo de inducción rápido, lo que evitó posibles accidentes de los mismos, como del personal que participó de la captura.

El incremento en los valores de la FC y la tendencia al aumento de la FP durante la 3^{era} extracción (setiembre-octubre, 2008) coincidió con el periodo (primavera), en que en los machos de venado campo se produce el crecimiento de las

astas, estando en este período recubiertas de felpa (Ungerfeld et al. 2008a). Este crecimiento implica un aumento de los requerimientos para los animales (Dryden, 2011), lo que podría influir en que se produzca un incremento de la FC y de la FP. También el incremento de la FC podría deberse a estrés por dolor (Chapple et al. 1991; Broom y Johnson 1993) generado por el crecimiento de las astas y una alta sensibilidad de la presencia de la felpa (Woodbury et al, 2002), lo que coincide con la tendencia al aumento del cortisol observada en esa extracción.

El incremento de la FR luego de comenzada la EE, podría estar determinado por el estrés o dolor causado por la misma, aumentando de igual forma que la FC y FP, o acompañando incremento de estas dos variables. Existieron diferencias en los valores de FR entre las extracciones, siendo más bajos los valores en la 4^a extracción y mayores en la 5^a. La posible explicación para esa disminución de la FR durante la 4^a extracción podría ser un efecto restrictivo, ya que se vieron durante esas extracciones un mayor número de animales con timpanismo (datos no cuantificados). Ese timpanismo impediría la correcta ventilación debido a una menor amplitud de movimiento de la caja torácica (FR) y del diafragma (McGrath y Richey, 2003; McDonell y Kerr, 2007) contribuyendo a una menor oxigenación del animal. De todas formas no fue posible determinar la causa de esa mayor incidencia de timpanismo en los animales en ese momento. No se encontró una explicación para la causa del incremento de la FR durante la 5^a extracción.

La TR presentó los valores más bajos durante las 2^a y 3^{era} extracción, coincidiendo ambas con las menores temperaturas ambientales registradas durante las extracciones (Dirección Nacional de Meteorología, 2009). Por tanto, es probable que las diferencias entre las extracciones se deban a un efecto climático, donde la temperatura corporal de los animales se vio afectada durante el momento de la

captura por la temperatura ambiente, siendo esto agudizado por el efecto de la anestesia (Caulkett y Arnemo, 2007; Santiago-Moreno et al. 2010).

En el primer estudio realizado los animales juveniles presentaron una mayor concentración de FAS que los adultos, pero ese efecto desapareció al incluir las nuevas extracciones. Esto podría indicar que los valores de FAS en las últimas extracciones fueron similares entre las categorías. Dado que la FAS es una enzima íntimamente relacionada al movimiento de minerales a nivel óseo (Rosol y Capen, 1997), esa igualdad en la concentración de la FAS, debería estar íntimamente relacionado al desarrollo musculo esquelético de los animales juveniles o al ciclo de astas en ambas categorías. Probablemente los animales juveniles estuviesen culminando su desarrollo óseo durante el resto de las extracciones (Rosol y Capen, 1997), y por lo tanto presenten una menor concentración de FAS en sangre. Dado que los animales adultos tienen una inversión proporcionalmente mayor en el crecimiento de las astas (Ungerfeld et al, 2011b), podrían requerir mayores cantidades de FAS y por tanto reflejarse esto en su mayor concentración en sangre. La concentración de FAS fue mayor en la 3ª extracción, realizada durante la primavera, período en el que ocurre el crecimiento de las astas en los venados machos (Ungerfeld et al, 2011b). El incremento de FAS durante la 5ª extracción puede deberse a que en este período aún no hubiera culminado la mineralización de las astas.

En este segundo estudio se observó un incremento en la concentración de cortisol DEE en ambas categorías, lo que podría ser consecuencia del estrés o dolor causado por la EE (Orihuela et al. 2009; Damián y Ungerfeld, 2011).

6.5. CONCLUSIONES

En conclusión, la repetición de las extracciones en venados de campo machos, adultos y juveniles anestesiados no afectó los parámetros de respuesta a la EE, observándose solamente efectos posiblemente adjudicables al momento o a la estación en que se realizó la extracción.

La EE bajo AG puede ser utilizada en el mismo macho de venado de campo de forma reiterada, sin que esto sea un perjuicio para la salud del animal. Esto reduciría el número de animales necesarios para la obtención de semen en esta especie, siendo beneficioso considerando que se trata de una especie amenazada de extinción.

7. TERCER ESTUDIO: CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VOCALIZACIONES

7.1. OBJETIVO

Estudiar si durante la EE bajo AG en el venado de campo, se producen vocalizaciones, caracterizar y analizar dichas vocalizaciones, y determinar si éstas se ven afectadas por la categoría y el voltaje utilizado.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. REGISTRO DE VOCALIZACIONES

Las vocalizaciones fueron registradas en 10 extracciones en machos adultos y 11 extracciones de machos juveniles. Se registró la emisión de vocalizaciones durante la EE con un micrófono direccional acoplado a un sistema de registro de grabación con formato mp4 (Insignia NS-4V24, China). El micrófono se colocó siempre a la misma distancia de la cabeza de los animales (2 m).

El análisis de las vocalizaciones se realizó con un programa de computación (WaveSurfer 1.8.5, Centre for Speech Technology, Stockholm, Sweden). Se analizó, el número total de vocalizaciones emitidas, el tiempo total de emisión, el tiempo de duración de las vocalizaciones, las frecuencias (Hz), inicial (F_{ini}), final (F_{fin}), máxima ($F_{máx}$) y mínima ($F_{mín}$) de la frecuencia fundamental (f_0).

7.2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VOCALIZACIONES

Los resultados de las categorías en el tiempo total de vocalización, el número de vocalizaciones, el tiempo de emisión en cada vocalización, las F_{ini} , F_{fin} , $F_{máx}$ y $F_{mín}$, durante la EE fueron comparadas por ANOVA. Los resultados fueron considerados significativos con un $\alpha = 0,05$. Los datos se expresaron como las medias \pm SEM.

7.3. RESULTADOS

Los resultados del número de vocalizaciones, tiempo total de vocalización, duración de cada vocalización, y análisis de la frecuencia fundamental, se presentan en la Tabla V. Los venados vocalizaron durante la EE 10 ± 5 y 11 ± 5 vocalizaciones (adultos y juveniles respectivamente; ns). El tiempo total de vocalización durante la EE y la duración de las mismas fue mayor en animales juveniles que adultos ($P = 0,01$ y $P=0,02$ respectivamente) (Tabla V). En forma similar, las frecuencias fundamentales, $F_{\text{máx}}$, F_{fin} , $F_{\text{mín}}$, fueron mayores en los venados juveniles que en los adultos ($P = 0,04$; $P = 0,05$; y $P = 0,05$ respectivamente), y la F_{ini} también tendió a ser mayor también en juveniles que adultos ($P = 0,06$). En la figura 27A y 27B se presentan sonogramas representativos de los venados adultos y juveniles respectivamente.

Tabla V. Número de vocalizaciones, tiempo total de vocalización, duración de cada vocalización, y análisis de la frecuencia fundamental, de venados adultos (CA) y juveniles (CJ) durante la EE en venados de campo bajo AG. Los valores se expresan como media \pm SEM.

| | CA (n=10) | CJ (n=11) | <i>P</i> |
|---|---------------|---------------|----------|
| N | 10 | 11 | |
| Número de vocalizaciones por extracción | $11 \pm 2,0$ | $10 \pm 2,0$ | NS |
| Tiempo total de vocalización por extracción (s) | $12 \pm 2,0$ | $20 \pm 2,0$ | 0,01 |
| Duración de vocalización (s) | $1,4 \pm 0,2$ | $2,0 \pm 0,2$ | 0,02 |
| F_{ini} (Hz) | 286 ± 51 | 405 ± 50 | 0,06 |
| $F_{\text{máx}}$ (Hz) | 314 ± 59 | 484 ± 67 | 0,04 |
| F_{fin} (Hz) | 243 ± 51 | 377 ± 59 | 0,05 |
| $F_{\text{mín}}$ (Hz) | 222 ± 43 | 331 ± 47 | 0,05 |

F_{ini} , frecuencia inicial, $F_{\text{máx}}$, frecuencia máxima, F_{fin} , frecuencia final, $F_{\text{mín}}$, frecuencia mínima.

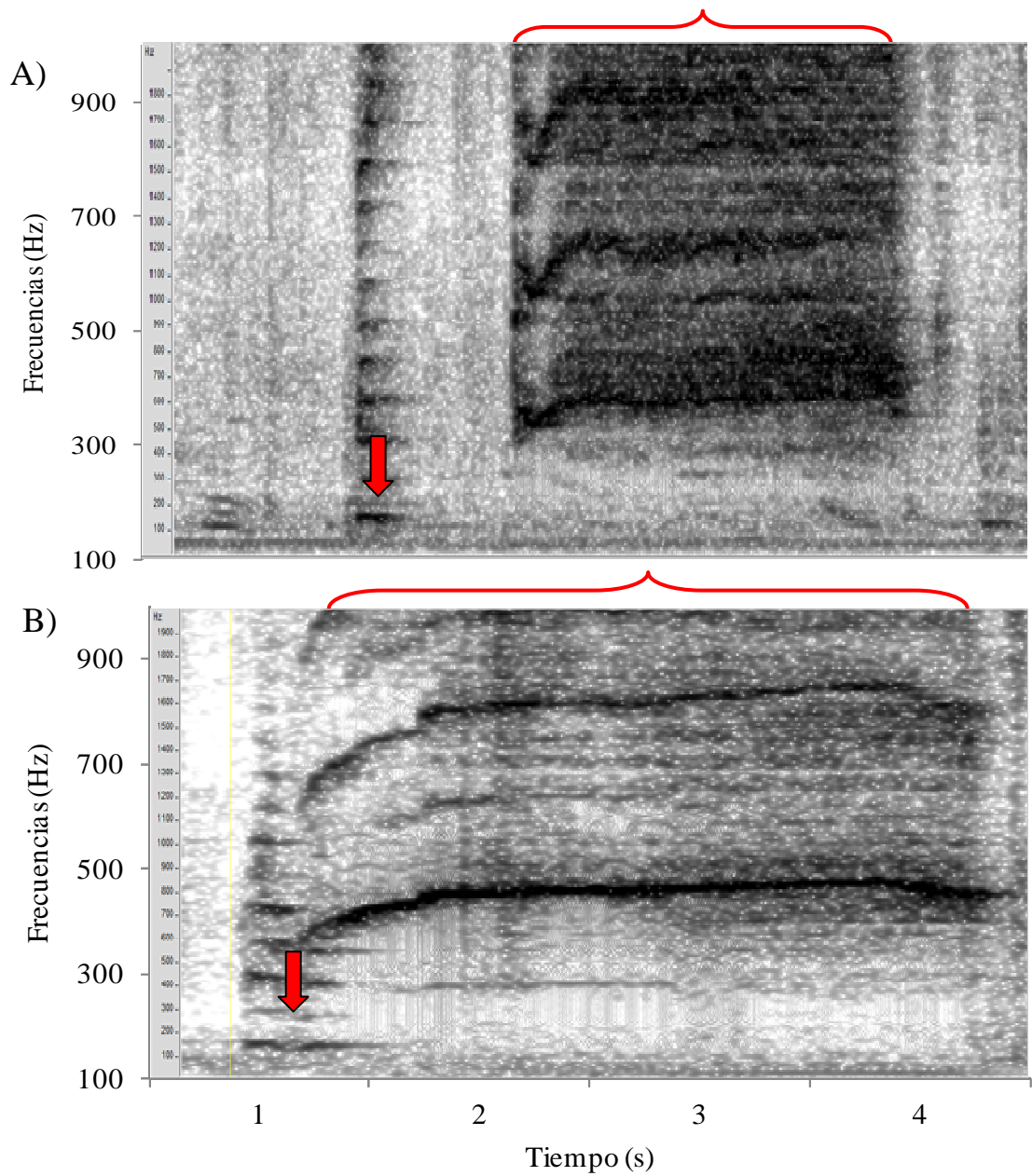


Figura 27. Sonograma de las vocalizaciones de venado de campo adulto (A), y juvenil (B), registradas durante la EE, mostrando el momento en que es aplicado el voltaje (flecha roja), y la ocurrencia de la vocalización a continuación (llave roja). Frecuencias en Hz, tiempo en segundos.

7.4. DISCUSIÓN

De acuerdo a nuestro conocimiento, por primera vez se describen las vocalizaciones emitidas por una especie de cérvido, el venado de campo, durante la EE bajo AG. Si bien en algunos animales se han registrado vocalizaciones durante la EE, y en algunos casos se han analizado las mismas (toros: Falk et al. 2001; carneros: Damián y Ungerfeld, 2011), en todos estos casos los registros se realizaron en animales conscientes. En carneros se ha reportado que la aplicación de anestesia epidural bloquea la emisión de vocalizaciones durante la EE (Damián y Ungerfeld, 2010). Dado que los venados de campo vocalizaron durante la EE a pesar de estar bajo AG, la interpretación relativa al dolor planteada (toros: Falk et al. 2001; Palmer, 2005; carneros: Damián y Ungerfeld (2010) no sería aplicable en forma directa a las vocalizaciones registradas. Es posible que en los venados la anestesia con xilacina, ketamina y atropina no inhibiera completamente el dolor, y dado que la misma provoca una leve depresión de la función laríngea (Mckelvey y Hollingshead, 2003a), la capacidad de vocalización de los animales no fue mayormente afectada (Mckelvey y Hollingshead, 2003a).

Se observó que los venados juveniles vocalizaron más veces y durante un tiempo mayor durante la EE, lo que podría indicar una sensibilidad mayor a la EE. Esto se podría deber a la diferencia en el tamaño corporal entre las categorías, ya que el desarrollo corporal en los venados juveniles se completa recién a los 3 años de edad (Ungerfeld et al. 2011a). El menor tamaño corporal de los animales juveniles implicaría un desarrollo menor de la región pélvica y por tanto una distancia menor entre la sonda del electroeyaculador y el plexo lumbosacro. Por lo tanto esto determinará una mayor transmisión del estímulo eléctrico, el que en carneros es esencial para la sensación dolorosa de la electroeyaculación (Damián y Ungerfeld,

2010). Por tanto, los animales juveniles podrían ser más sensibles a la EE desencadenándose entonces una mayor respuesta de estrés o dolor al mismo estímulo eléctrico, y por tanto un mayor número y tiempo de vocalizaciones.

El sonograma fue diferente en machos adultos y juveniles, siendo la mayor parte de las frecuencias de las vocalizaciones, mayores en los machos juveniles. En ciervo rojo se ha demostrado que las frecuencias de las bramas (vocalizaciones emitidas durante la estación reproductiva) son mayores en machos juveniles que en machos adultos (Reby et al. 2005). Estas diferencias fueron utilizadas por otros autores para demostrar el interés de las hembras por la fonación de los machos más grandes, así como las respuestas de posibles rivales, siendo en este caso mayor la respuesta hacia las vocalizaciones de frecuencias bajas (Reby et al. 2005; Charlton et al. 2007). Los resultados de este trabajo, coinciden con los de estos autores, en que las variables de la frecuencia fundamental fueron mayores en los machos juveniles que en los adultos. Estas diferencias podrían estar provocadas por la anatomía de la región del cuello y sobre todo de la laringe, la que es considerada el órgano de fonación en especies como cerdos, ovinos, bovinos (Alipour et al. 2008), y en los cérvidos (Reby et al. 2005). El perímetro de cuello es un carácter sexual secundario de los cérvidos, directamente influenciando por la acción anabólica de la testosterona antes de la estación reproductiva (Handelsman, 2006). En el caso de los venados de campo, tanto la secreción de testosterona como el perímetro de cuello son menores en los animales juveniles que en los adultos (Ungerfeld et al. 2011a), lo que podría determinar diferencias de la anatomía de la laringe entre animales juveniles y adultos. Estas diferencias anatómicas explicarían las diferencias en las frecuencias de las vocalizaciones entre las categorías estudiadas.

7.5. CONCLUSIONES

En conclusión, el venado de campo emite vocalizaciones durante la EE bajo anestesia con xilacina, ketamina y atropina. El tiempo total de vocalización fue mayor, y las frecuencias fueron más altas en los venados juveniles que en los adultos.

El dolor para sentirse vivo es inevitable, el sufrimiento porque si, es innecesario.

Fernando Fumagalli 2011.

8. CONCLUSIONES GENERALES

En función de los trabajos presentados se concluyó que:

- La EE bajo AG en el venado de campo provocó cambios en algunos parámetros fisiológicos.
- La repetición de las extracciones en venados de campo machos, adultos y juveniles anestesiados no afectó los parámetros de respuesta a la EE.
- El venado de campo emite vocalizaciones durante la EE bajo AG con xilacina, ketamina y atropina, pudiendo las mismas ser una respuesta dolorosa al voltaje utilizado.
- La electroeyaculación bajo anestesia general, con xilacina, ketamina y atropina, es un método adecuado para la obtención de semen en el venado de campo adulto y juvenil, pudiendo ser utilizada de forma reiterada en el mismo animal.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akatas M, Auguste D, Lefebvre HP, Toutain PL, Braun JP. (1993). Creatine kinase in the dog: a review. *Vet Res Commun* 17: 353-369.
2. Alipour F, Jaiswal S. (2008). Phonatory characteristics of excised pig, sheep and cow larynges. *J Acoust Soc Am* 123: 4572-4581.
3. Amann RP, Hay SR, Hammerstedt RH. (1982). Yield, characteristics, motility and cAMP content of sperm isolated from seven regions of ram epididymis. *Biol Reprod* 27: 723-733.
4. Arnemo JM, Storaas T, Khadka CB, Wegge P. (2005). Use of medetomidine-ketamine and atipamezole for reversible immobilization of free-ranging hog deer (*Axis porcinus*) captured in drive nets. *J Wild Dis* 41: 467-470.
5. Berndt A. (2005). Nutrição e ecología nutricional de cérvidos brasileiros em cautiverio e no Parque Nacional das Emas – Goiás. Tesis Doctoral. PIRACICABA. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo. Brasil.
6. Broom DM and Johnson KG. (1993). Assessing welfare: Short-term responses. En: *Stress and animal welfare*, Broom DM, Johnson KG (eds.). Chapman & Hall, London, UK. P- 87-114.

7. Busso JM, Ponzio MF, Chiaraviglio M, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD. (2005). Electroejaculation in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*): effects of anesthesia on seminal characteristics. ResVet Sci 78: 93-97.
8. Cabrera A. (1943). Sobre la sistemática del venado y su variación individual y geográfica. Rev Museo La Plata (Argentina) P- 5-41.
9. Cameron RD. (1977). Semen collection and evaluation in the ram. The effect of method of stimulation on response to electro ejaculation. Aust Vet J 153: 380-383.
10. Cardinet III GH. (1997). Skeletal Muscle Function. En: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds), Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 5th ed. San Diego, USA. Academic Pr. P- 407-440
11. Carvalho CT. (1973). O veado campeiro (Mammalia, Cervidae). Boletim Tecnico 7. Secretaria de Estado dos Negocios da Agricultura, Coordenadoria da Pesquisa de Recursos Naturais, Insituto Florestal, Brasil. P- 9.
12. Casas-Díaz E, Marco I, López-Olvera JR, Mentaberre G, Lavín S. (2010). Use of acepromazine for stress control in spanish ibex (*Capra pyrenaica*) captured by drive-net. Vet J 183: 332-336.

13. Caulkett NA, Arnemo JM. (2007). Chemical Immobilization of Free-Ranging Terrestrial Mammals. En: Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia Fourth Edition, Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. (Ed). P-807-830.
14. Celly CS, Mcdonell W, Young SS, Black WD. (1997). The comparative hypoxaemic effect of four α_2 adrenoceptor agonists (xylazine, romifidine, detomidine and medetomidine) in sheep. J Vet Pharm Ther 20: 464-471.
15. CITES. (2012). Disponible en: <http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2012.
16. Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. (2000). Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. Reprod Nutr Dev 40: 493-504.
17. Cortes S, Santiago-Moreno J, Gonzaléz-Bulnes A. (1996). Recogida de semen de muflón (*Ovis gmelini musimon*) mediante vagina artificial. Trofeo 1317: 34-36.
18. Cosse M. (2001). Dieta y solapamiento de la población de venado de campo "Los Ajos", (*Ozotoceros bezoarticus* L, 1758) (Artiodactyla: Cervidae). Tesis de Maestría. PEDECIBA. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.
19. Chalmers GA, Barrett MW. (1977). Capture myopathy in pronghorns in Alberta, Canada. J Am Vet Med Assoc 171: 918-923.

20. Chapple RS, English AW, Mulley RC, Lephherd EE. (1991). Hematology and serum biochemistry of captive unsedated chital deer (*Axis axis*) in Australia. *J Wild Dis* 27: 396-406.
21. Charlton BD, Reby D, McComb K. (2007). Female red deer prefer the roars of larger males. *Biol Let* 3: 382-385.
22. Damian JP, Ungerfeld R. (2010). Vocalizations are reliable indicators of pain during electroejaculation in rams. Proceedings of the 44th Congress of the International Society for Applied Ethology, 4-7, August, Uppsala, Sweden. P-184.
23. Damián JP, Ungerfeld R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reprod Dom Anim* 46: 646-650.
24. Dellafiore CM, Demaría M, Maceira N, Bucher E. (2003). Distribution and abundance of the pampas deer in San Luis province, Argentina. *J Neotrop Mammal* 10: 41-47.
25. Delgiudice GD, Kunkel KE, Mech LD, Seal US. (1990). Minimizing capture-related stress on white-tailed deer with a capture collar. *J Wildl Manage* 54: 299-303.

26. DelGiudice GD, Krausman PR, Bellantoni ES, Etchberger RC, Seal US. (1989). Reversal by tolazoline hydrochloride of xylazine hydrochloride-ketamine hydrochloride immobilizations in free-ranging desert mule deer. *J Wild Dis* 25: 347-352.
27. Delgiudice GD, Sampson BA, Kuehn DW, Powell MC, Fieberg J. (2005). Understanding margins of safe capture, chemical immobilization, and handling of free-ranging white-tailed deer. *Wildl Soc B* 33: 677-687.
28. Demaría MR, McShea WJ, Koy K, Maceira NO. (2003). Pampas deer conservation with respect to habitat loss and protected area considerations in San Luis, Argentina. *Biol Cons* 115: 121-130
29. Dirección Nacional de Meteorología. (2009). Temperaturas máximas y mínimas del Uruguay, marzo 2008-2009. <http://www.meteorologia.gub.uy/>. Consulta mayo de 2009.
30. Dryden GM. (2011). Quantitative nutrition of deer: energy, protein and water. *Anim Prod Sci* 51: 292-302
31. Duarte JMB, Arantes IG, Garcia JM, Nascimento AA. (1993) Captura e avaliacao de uma populacao de *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* no Brasil. In: UICN. Population and Viability Assessment for the Pampas Deer. SSCIUCN. No pages

32. Duarte JMB, Garcia JM. (1997). Tecnologia da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção. En: Biología e Conservacao de Cervídeos Sul-americanos, Duarte JMB. (Ed). Brasil. P- 228-238.
33. Durrant BS. (2009). The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology* 71: 113-122.
34. Dziuk PJ, Graham EF, Donker JD, Marion GB, Petersen WE. (1954). Some observations in collection of semen from bulls, goats, boars and rams by electrical stimulation. *Vet Med* 49: 455-458.
35. Evans G, Maxwell WMC. (1990). Recogida del semen. En: Inseminación artificial de ovejas y cabras, Salamon S. (Ed). Zaragoza, España. P- 87-94.
36. English AW, Lepherd EE. (1981). The haematology and serum biochemistry of wild fallow deer (*Dama dama*) in new south wales. *J Wild Dis* 17: 289-295.
37. Falk AJ, Waldner CL, Cotter BS, Gudmundson J, Barht AD. (2001). Effects of epidural lidocaine anesthesia on bulls during electroejaculation. *Can Vet J* 42: 116-120.
38. Fariborz A, Sanyukta J. (2008). Phonatory characteristics of excised pig, sheep, and cow larynges. *J Acous Soc America* 123: 4572-4581.

39. Flach E. (2003). Cervidae and Tragulidae. En: Zoo and Wild Animal Medicine, Fowler M. (Ed). Philadelphia, EEUU. P- 634-649.
40. García RJG, Duarte JMB, 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 bezoarticus*). Theriogenology 63: 2113-2125.
41. Garcia-Macias V. (2006). Assessment of chromatin status (SCSA 1) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. Theriogenology 66: 1921-1930.
42. Garde JJ, Martínez-Pastor F, Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, García AJ, Anel L, Roldán ER. (2006). The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. Reprod Dom Anim 41: 93-102.
43. Gizejewski Z. (2004). Effect of season on characteristics of red deer (*Cervus elaphus*) semen collected using modified artificial vagina. Reprod Biol 4: 51-66.
44. Gómez JA, García AJ, Landete-Castillejos T, Gallego L. (2006). Effect of advancing births on testosterone until 2.5 years of age and puberty in red deer stags (*Cervus elaphus hispanicus*). Reprod Dom Anim 96: 79-88.

45. González EM. (2001). Guía de campo de los mamíferos de Uruguay: introducción al estudio de los mamíferos. En: Vida Silvestre, Montevideo, Uruguay. P- 206.
46. González-Pensado S. (2011). Estacionalidad reproductiva en machos de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) adultos y juveniles Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.
47. González S. (1993). Situación poblacional del venado de campo en el Uruguay. En: Population and habitat viability assessment for the pampas deer *Ozotoceros bezoarticus*. Reunión informativa. IUCN. Rocha, Uruguay.
48. González S, Maldonado JE, Leonard JA, Vila C, Barvanti J M, Merino M, Brum-Zorrilla N, Wayne R N. (1998). Conservation genetics of the endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Mol Ecol 7: 47-56.
49. González S, Cosse M, Pacheco A. (1999). Demografía y genética de las poblaciones de Venados de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) en el Uruguay. En: II Taller de cérvidos del Uruguay. Montevideo, Uruguay.
50. González S, Álvarez-Valín F, Maldonado J. (2002). Morphometric differentiation of endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with description of new subspecies from Uruguay. J Mammal 83: 1127-1140.

- 51.** González S, Duarte JMB. (2003). Emergency pampas deer capture in Uruguay. Deer Sp Gr News 18: 16-17.
- 52.** Góss-Braga F. (1999). Redescoberta do veado-campeiro, *Ozotoceros bezoarticus*, no estado do Paraná-Brasil. En: II Taller de Cérvidos del Uruguay. Montevideo, Uruguay.
- 53.** Haigh JC, Stewart RR, Wobeser G, Macwilliams PS. (1977). Capture myopathy in a moose. J Am Vet Med Assoc 171: 924-932.
- 54.** Haigh JC. (1982). Mammalian immobilizing drugs their pharmacology and effects. En: Chemical immobilization of north american wildlife, Nielsen L, Haigh JC, Fowler ME. (Ed). The Wisconsin Humane Society. Wisconsin, EEUU. P- 46-57.
- 55.** Handelsman DJ. (2006). Aging in the hypothalamic-pituitary-testicular axis. En: Neill ED (Ed). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 3a ed. Academic Press. St Louis, Mo. EEUU. P- 2697-2728.
- 56.** Hui-Chu Lin. (2007). Dissociative anesthetics. En: Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia Fourth Edition, Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. (Ed). Boston, Massachusetts, EEUU. P- 301-354.
- 57.** Jackson JE, Langguth A. (1980). Pampas deer in Uruguay. Oryx 15: 257-272.

- 58.** 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, Washington. P- 402-409.
- 59.** Jackson JE, Giuliatti JD. (1988). The food habits of pampas deer *Ozotoceros bezoarticus celer* in relation to its conservation in a relict natural grassland in Argentina. Biol Cons 45: 1- 10.
- 60.** Jennings DJ. (2007). The effect of chemical immobilization on dominance rank in the fallow deer. Anim Behav 74: 1107-1110.
- 61.** Jessup DA, Jones K, Mohr R Y Kucera T. (1985). Yohimbine antagonism to xylacine in free ranging mule deer and desert bighorn sheep. J Am Vet Med Assoc 187: 1251-1252.
- 62.** Jones RS. (2002). Veterinary Anesthesia History. En: Anestesia Veterinaria. Murcia. España. P- 7-15.
- 63.** Junguis H. (1975-76). Status and distribution of threatened deer species in South America. Report to SSC/IUCN deer group. World Wildlife Fund Yearbook. Gland. Switzerland. P- 203-217.

- 64.** Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res* 40: 185-232.
- 65.** Klinger SR, Robel RJ, Brown BA, Brent BE. (1986). Blood characteristics of white-tailed deer from northeastern Kansas. *J Wild Dis* 22: 385-388.
- 66.** Knight TW. (1974). A qualitative study of factors affecting the contractions of the epididymis and ductus deferens of the ram. *J Reprod Fertil* 40: 19-29.
- 67.** Kock MD, Jessup DA, Clark RK, Franti CE. (1987). Effects of capture on biological parameters in free-ranging bighorn sheep (*Ovis canadensis*): evaluation of drop-net, drive-net, chemical immobilization and the net-gun. *J Wild Dis* 23: 641-651.
- 68.** Kreeger TJ, Arnemo JM, Raath JP. (2002). Handbook of wildlife chemical immobilization. International Edition. Wildlife Pharmaceuticals, Inc., Fort Collins, Colorado, EEUU. P- 409.
- 69.** Lemke AK. (2007). Anticholinergics and Sedatives. En: Lumb and Jones' *Veterinary Anesthesia and Analgesia Fourth Edition*, Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. (Ed). Boston, Massachusetts, EEUU. P- 203-240.

70. Lincoln GA, Guinness F, Short RV. (1972). The way in which testosterone controls the social and sexual behavior of the red deerstag (*Cervus elaphus*). *Horm Behav* 3: 375-396.
71. Lincoln GA. (1998). Photoperiod-melatonin relay in deer. *Acta Vet Hun* 46: 341-56.
72. Lincoln GA, Clarke IJ, Hut RA, Hazlerigg DG. (2006). Characterizing a mammalian circannual pacemaker. *Science* 314: 1941-4.
73. Livingston A, Low J, Morris B. (1984). Effects of clonidine and xylazine on body temperature in the rat. *J Clin Pharmacol* 81: 189-195.
77. Marco I, Viñas L, Velarde R, Pastor J, Lavín S. (1997). Effects of capture and transport on blood parameters in free-ranging mouflon (*Ovis ammon*). *J Zoo Wild Med* 28: 428-433.
75. Martínez AF, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Fernández-Santos MR, Estes MC, de Paz P, Garde JJ, Anel L. (2008). Sperm parameters on Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology* 70: 216-226.
76. Martínez-Pastor F, Martínez F, Álvarez M, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Soler AJ, Garde JJ, de Paz P, Anel L. (2009). Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology* 71: 628-638.

77. Martínez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraéz P, de Paz P. (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65: 471-85.
78. McDonell WN, Kerr CL. (2007). Respiratory System. En: Lumb and Jones' *Veterinary Anesthesia and Analgesia Fourth Edition*, Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. (Ed). Boston, Massachusetts, EEUU. P-117-152.
79. McGrath C, Richey M. (2003). Anestesia Grandes Animales. En: *Manual de Anestesia y Analgesia Veterinaria*, McKelvey D & Hollingshead KW. (Ed). Barcelona, España. P- 399-426.
80. McKelvey D, Hollingshead KW. (2003a). Agentes y técnicas anestésicas. En: *Manual de Anestesia y Analgesia Veterinaria*, McKelvey D & Hollingshead KW. (Ed). Barcelona, España. P-123-168.
81. McKelvey D, Hollingshead KW. (2003b). Anestesia General. En: *Manual de Anestesia y Analgesia Veterinaria*, McKelvey D & Hollingshead KW. (Ed). Barcelona, España. P- 55-122.
82. Merino ML. (1993). Dieta del venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus* Linneus 1758) en la Reserva de Vida Silvestre "Campos del Tuyú", Bahía de Samborombón, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Iº Encontro para a Conservacao de Cervídeos Brasileiros*. San Pablo. Brasil. P- 48.

- 83.** Montané J, Marco I, López J, Manteca X, Lavín S. (2001). Captura y manejo postcaptura del corzo (*Capreolus capreolus*). Med Vet 18: 341-351.
- 84.** Morris JM, Bubenik GA. (1983). Seasonal levels of minerals, enzymes, nutrients and metabolic products in plasma of intact and castrated adult male white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Comp Biochem Physiol 74: 21-28.
- 85.** Mosure WL, Meyer RA, Gudmundson J, Barth AD. (1998). Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bulls. Can Vet J 39: 504-506.
- 86.** Orihuela A, Aguirre V, Hernandez C, Flores-Perez I, Vazquez R. (2009). Effect of anesthesia on welfare aspects of hair sheep (*Ovis aries*) during electroejaculation. J Anim Vet Adv 8: 305-308.
- 87.** Ortiz-de-Montellano M, Galindo-Maldonado F, Cavazos-Arizpe EO, Aguayo-Arceo AM, Torres-Acosta JFJ, Orihuela A. (2007). Effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response of criollo goats (*Capra hircus*). Small Ruminant Res 69: 228-231.
- 88.** Palmer CW, Britoa LFC, Arteagaa AA, Oderquistb LS, Perssonb Y, Bartha AD. (2005). Comparison of electro ejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. Anim Reprod Sci 87: 25-31.

- 89.** Parera A, Moreno D. (2000). El venado de las pampas en Corrientes, diagnóstico de su estado de conservación y propuestas de manejo: situación crítica. Fundación Vida Silvestre (Argentina). P- 40.
- 90.** 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. J Neotrop Mammal 9: 64-69.
- 91.** Pelletier F, Hogg JT, Festa-Bianchet M. (2004). Effect of chemical immobilization on social status of bighorn rams. Anim Behav 67: 1163-1165.
- 92.** Pereira JL, González A. (2002). Principios generales de anestesia. En: Farmacología y Terapéutica Veterinaria, Botana LM, Landoni MF, Martín-Jiménez T. (Ed). Madrid, España. P- 137-147.
- 93.** Perez JM, González FJ, Granados JE, Pérez MC, Fandos P, Soriguer RC, Serrano E. (2003). Hematologic and biochemical reference intervals for spanish ibex. J Wild Dis 39: 209-215.
- 94.** Ponder SW, Clark WG. (1980). Prolonged depression of thermoregulation after xylazine administration to cats. J Vet Pharmacol Therapeut 3: 203-207.
- 95.** Read MR, Caulkett NA, Symington A, Shury TK. (2001). Treatment of hypoxemia during xylazine-tiletamine-zolazepam immobilization of wapiti. Can Vet J 42: 861-864.

96. Reby D, McComb K, Cargnelutti B, Darwin C, Tecumseh Fitch W, Clutton-Brock T. (2005). Red deer stags use formants as assessment cues during intrasexual agonistic interactions. *P R Soc London* 272: 941-947.
98. Rijnberk AD, Mol JA. (1997). Adrenocortical Function. En: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. San Diego, USA: Academic Pr. P- 553-558.
99. Risling TE, Fahlman Å, Caulkett NA, Kutz S. (2011). Physiological and behavioural effects of hipoxemia in reindeer (*Rangifer tarandus*) immobilised with xylazine-etorphine. *Anim Prod Sci* 51: 355-358.
100. Rosol TJ, Capen CC. (1997). Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium) metabolism. En: Kaneko JJ, Harvey JW Bruss ML (Eds). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5a ed. Academic Press Inc. San Diego. USA. P- 619-687.
101. Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, Sookhthezary A, Gómez-Guillamón F, Salas de la Vega R, Pulido-Pastor A, López-Sebastián A. (2011). Effects of anesthetic protocols on electroejaculation variables of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Res Vet Sci* 90: 150-155.

- 101.** Santiago-Moreno J, Coloma MA, Toledano-Díaz A, Gómez-Brunet A, Pulido-Pastor A, López-Sebastián A. (2010). Métodos de estudio de la actividad reproductiva en ungulados de interés cinegético. En: Ungulados silvestres de España: biología y tecnologías reproductivas para su conservación y aprovechamiento cinegético. (Ed). INIA, Madrid, España. P- 53-55.
- 102.** Scott JV, Dziuk PJ. (1959). Evaluation of the electroejaculation technique and the sperm thus obtained from rats, mice and guinea pigs. *Anat Record* 133: 655-664.
- 103.** Seal US, Bush M. (1987). Capture and chemical immobilization of cervids. En: *Biology and Management of the Cervidae*, Wemmer CM. (Ed). Smithsonian Institution, Washington. P- 480-504.
- 104.** Stafford KJ, Spoorenberg J, West DM, Vermunt JJ, Petrie N, Lawoko CR. (1996). The effect of electro-ejaculation on aversive behavior and plasma cortisol concentration in rams. *New Zeal Vet J* 44: 95-98.
- 105.** Soto A, Vallejos P, Mezino MI, Carpiretti BM. (1995). Obtención de semen por medio de vagina artificial en venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*, Linneaus 1756). X Jornadas Argentinas de Mastozoología, 14 al 17 de noviembre, La Plata. Argentina, 61.

- 106.** Tarifa T. (1993). Situación de la especie en Bolivia. En: Population and habitat viability assessment for the pampas deer *Ozotoceros bezoarticus*. Reunión informativa. IUCN. Rocha, Uruguay. P-171.
- 107.** Tennant BC. (1997). Hepatic function. En: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (Eds), Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 5th ed. San Diego, USA: Academic Pr. P- 327-352.
- 108.** Thornback J, Jenkins M. (1982). The IUCN mammal red data book. Part II. IUCN, Gland, Switzerland.
- 109.** Uhart MM, Vila AR, Beade MS, Balcarce A, Karesh WB. (2003). Health evaluation of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos Del Túyu wildlife reserve, Argentina. J Wild Dis 39: 887-893.
- 110.** UICN. (2012). The IUCN red list of threatened species. *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis*. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/search/details.php>.
Fecha de consulta: 13 de marzo de 2012.
- 111.** Umapathy G, Sontakke SD, Reddy A, Shivaji S. (2007). Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). Theriogenology 67:1371-1378.

- 112.** Ungerfeld R, Bielli A, González-Pensado S, Villagrán M, González-Sierra UT. (2008a). Antler size and weight in a herd of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Mamm Biol* 73: 478-481.
- 113.** Ungerfeld R, González-Pensado S, Bielli A, Villagrán M, Olazabal D, Pérez W. (2008b). Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. *Acta V Scand* 50:16.
- 114.** Ungerfeld R, González-Pensado S, Villagrán M, Bielli A, Rossini C, Morales J, Pérez W, Damián J. (2011a). Biología reproductiva del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*) (Ed). UCUR-CSIC. Montevideo, Uruguay. P- 107.
- 115.** Ungerfeld R, Villagrán M, González-Pensado S. (2011b). Antler weight and body weight relationship in adult and young pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. *North-West J Zool* 7: 208-212.
- 116.** Vila A, Beade M. (1997). Situación de la población del venado de las pampas en la Bahía Samborombón. *Boletín Técnico* 37, Fundación Vida Silvestre (Argentina). P-30.
- 117.** Wagner AE, Muir WW, Grospitch BJ. (1990). Cardiopulmonary effects of position in conscious cattle. *Am J Vet Res* 51: 7-10.
- 118.** Wallace RS, Bush M, Montali LJ. (1987). Deaths from exertional myopathy at the national zoological park from 1975 to 1985. *J Wildlife Dis* 23: 454-462.

- 119.** Walsh VP, Wilson PR. (2002). Sedation and chemical restraint of deer. *New Zealand Vet J* 50: 228-36.
- 120.** Watson PF. (1976). Electroejaculation, semen characteristics and semen preservation of the brindled gnu. *J Reprod Fertil* 47:123-126.
- 121.** Watson PF. (1978). A review of techniques of semen collected in mammals. *Symp Zool Soc London* 43: 97-126.
- 122.** Weber M, González S. (2003). Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. *Écoscience* 10:443-454.
- 123.** Woodbury MR, Caulkett NA, Wilson PR. (2002). Comparison of lidocaine and compression for velvet antler analgesia in wapiti. *Can Vet J* 43:869–875
- 124.** Zomborszky Z, Zubor T, Toth J, Horn P. (1999). Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilization of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta Vet Hun* 47:263-270.

- 125.** Zucco CA, Lopes F. (2006). Uso de dardos anestésicos para captura de veados campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Pantanal. Corumbá, Embrapa, Pantanal. P- 1517-1981.

10. ANEXOS

Reproduction in Domestic Animals

Reprod Dom Anim doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01859.x
ISSN 0936-6768

Physiological and Biochemical Parameters in Response to Electroejaculation in Adult and Yearling Anesthetized Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) Males

F Fumagalli^{1,2}, M Villagrán², JP Damián³ and R Ungerfeld²

¹Clinica Semiológica, ²Departamento de Fisiología, ³Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Contents

The aim of this study was to characterize changes in physiological and biochemical parameters during electroejaculation (EE) under general anaesthesia in adult and yearling pampas deer males (*Ozotoceros bezoarticus*). The relation between heart rate, pulse rate, respiratory rate and oximetry with EE voltages was studied. The changes in cortisol, alkaline phosphatase, creatine kinase, aspartate aminotransferase and rectal temperature were determined before and after electroejaculation (BEE and AEE). Heart rate and pulse rate values increased during EE, with a greater increase in heart rate in adults ($p < 0.01$). Respiratory rate and SpO₂ were not affected by EE or category. The rectal temperature decreased in adults and yearlings during EE ($p = 0.0001$). Alkaline phosphatase, creatine kinase and aspartate aminotransferase concentrations increased AEE ($p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Alkaline phosphatase and creatine kinase concentrations were greater in young than in adult males ($p < 0.05$). In conclusion, the EE under general anaesthesia in the pampas deer provoked increases in heart and pulse rates, as well as in creatine kinase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase concentrations, and a decrease in rectal temperature in both categories. Oximetry values were especially low during the procedure. Heart rate increase was greater in adult males, and alkaline phosphatase and creatine kinase concentrations were greater in yearlings.

Introduction

The pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus, 1758) used to be a widespread species originally distributed in the open grasslands in South America (Jackson and Langguth 1987). However, habitat fragmentation, agriculture development, competition with farmed animals and unregulated hunting led to the decrease in size and distribution of the species (Demaría et al. 2003). This species is considered as Near Threatened in the light of an ongoing decline (IUCN, 2010) and is listed in Appendix I of CITES (2010). In Uruguay, there are two wild pampas deer populations, and there is also a third semicaptive group (Ungerfeld et al. 2008). The last population is allocated at the Estación de Cría de Fauna Autóctona Cerro Pan de Azúcar (ECFA) (Maldonado, Uruguay; 33°47'S, 54°00'W), and it has approximately 80 individuals.

The cryopreservation of gametes and the development of gene banks are useful techniques to improve conservation status of endangered species as the pampas deer. For this purpose, techniques for semen collection should be adequately adapted to the biology of each species. Semen from pampas deer has been collected by electroejaculation (EE) (Duarte et al. 1993; Duarte and Garcia 1997) and artificial vagina (Soto et al. 1995). As artificial vagina can only be used in tame trained individuals, EE

is the widely used technique for semen collection in wild animals. In deer, it is conventionally used under general anaesthesia (Umapathy et al. 2007; Martínez et al. 2008; Martínez-Pastor et al. 2009). Several authors have described the undesirable effects of EE on physiological parameters as heart, pulse and respiratory rates, rectal temperature or cortisol concentration in rams, bucks and bulls (Stafford et al. 1996; Ortiz-De-Montellano et al. 2007; Damián and Ungerfeld 2011). In general, physiological and biochemical responses may also differ in relation to males' age (Klinger et al. 1986; Kock et al. 1987; Chapple et al., 1991).

Considering all this information, our aim was to characterize changes in physiological and biochemical parameters during EE under general anaesthesia in adult and yearling pampas deer males. This included recording of heart, pulse and respiratory rates, oximetry, rectal temperature, cortisol concentration and blood biochemical parameters (creatinine kinase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase).

Materials and methods

Animals and facilities

The study was conducted between the end of June and early July (late breeding season) at the ECFA with 11 males. From those, six were adults [4–7 years old; 29.7 ± 2.7 kg (mean ± SEM)] and five yearlings (1–1.5 years old; 24.3 ± 2.0 kg). Both groups were housed in different paddocks (approximately 0.5 ha), with abundant water, natural pasture, trees and shrubs. Animals grazed on native pastures and received approximately 600 g ration for dairy cows/deer daily.

Capture and anaesthesia

The animals were captured with anaesthetic darts fired from a blowpipe (Telinject, CA, USA). The anaesthetic solution contained 2.0 mg/kg of xylazine 10% (Sedomin; Laboratorio König, Buenos Aires, Argentina), 1.6 mg/kg of ketamine 5% (Vetanarcol; Laboratorio König) and 0.013 mg/kg of atropine 1% (Sulfato de Atropina; Laboratorio ION, Montevideo, Uruguay). The induction time was considered from the moment in which the animal received the dart until lateral or sternal recumbency. The animals were transported on a stretcher, weighted and placed in right lateral position on a padded table. An intravenous catheter was placed in the cephalic vein, and sodium chloride 0.9% was continuously administered.

Electroejaculation

Semen was collected by EE using a rectal probe (300 mm length \times 19 mm width, with 30 mm electrodes) (Model 303; P-T Electronics, Sandy, OR, USA). Electroejaculation was performed in series of 10 periods (4–5 s per period) of voltage stimulus, with rest intervals of 2–3 s, increasing 1 V in each series, from 1 V until ejaculation. The voltage and number of series when ejaculation started were recorded.

Physiological recordings

Heart, pulse and respiratory rates, as well as oximetry, were recorded since recumbency, before EE (BEE), during EE immediately after each increase in voltage and after EE finished (AEE). Heart rate (beats/min) was recorded with a Polar A3 (S120™; Damant, Montevideo, Uruguay). Respiratory rate (breaths/min) was calculated recording thoracic movements. The pulse and oximetry were recorded using a pulse oximeter (Pulse 503 Oximeter; CSI, Criticare Systems, Waukesha, WI, USA) with a transmission probe placed on the tongue. Rectal temperature was recorded BEE and AEE with a digital thermometer.

Blood enzymes and serum cortisol determinations

Two 10 ml blood samples were collected BEE and AEE. The blood samples were placed in tubes without anticoagulant. Immediately after each extraction, the samples were centrifuged at 1080 g for 20 min, and the serum was stored at -20°C . Creatine kinase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase serum concentrations were measured in the Laboratorio de Análisis Clínicos (Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay), with a computer discrete analyser visible ultraviolet range (Metrolab 1600 DR; Metrolab, Buenos Aires, Argentina).

Serum cortisol concentrations were measured in the Laboratorio de Técnicas Nucleares (Facultad de Veterinaria) by radioimmunoassay using a solid-phase kit (DPC; Siemens, Los Angeles, CA, USA). The analytical sensitivity of the assay for cortisol was 0.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were both lower of 12.5%.

Recovery

After the whole procedure finished, the animals were taken back on stretchers to their respective paddocks. Anaesthesia was reversed with a jugular vein injection of 0.26 mg/kg of yohimbine hydrochloride 1% (Reverze, Laboratorio Vetcross, Montevideo, Uruguay).

Statistical analysis

All parameters were compared by ANOVA for repeated measures. The model included the effect of category (adults vs yearlings), voltage (BEE, 1–8 V, and AEE), as well as their interaction. The heart, pulse and respiratory rates BEE and the differences between age categories in the induction time and recovery time were

compared by ANOVA. Data are expressed as mean \pm SEM.

Results

Capture, anaesthesia, recovery and ejaculation

There were no differences between categories on the time of induction or recovery (Table 1). All animals survived at least for 5 months after capture and semen extraction. The animals remained anesthetized 64.0 ± 3.1 and 58.8 ± 2.6 min in adults and yearlings, respectively. The dose of yohimbine used was effective in reversing the effects of anaesthesia in all animals from both categories. Semen was obtained from all animals: ejaculation began at 2.8 ± 1.6 and 3.8 ± 1.3 volts in adults and yearlings, respectively.

Physiological parameters

Heart, pulse and respiratory rates and oximetry are presented in Fig. 1. Before EE, heart rate was similar in adult and yearling males (Fig. 1a). Heart rate increased during EE ($p = 0.005$); the increase began with 1 V ($p < 0.0001$) without changes with greater voltages; with a greater increase in adults ($p < 0.01$). There was no interaction between the parity and voltage on heart rate. Pulse rate values BEE were similar in adults and yearlings (Fig. 1b), increasing during EE ($p < 0.0001$), with a greater increase in adults ($p < 0.01$). There was no interaction between the parity and voltage on pulse rate. Respiratory rate was not affected by parity or EE (Fig. 1c). There were no differences on oximetry according to male parity or EE, but there was a significant interaction ($p = 0.03$) (Fig. 1d). Rectal temperature was lower AEE ($p = 0.0001$), without differences between adults and yearlings (Table 2).

Blood enzymes and serum cortisol

Blood enzymes and serum cortisol concentration are presented in Table 2. Alkaline phosphatase and creatine kinase concentrations were greater in yearlings ($p < 0.05$) and increased AEE ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively). Aspartate aminotransferase increased AEE ($p < 0.05$) without differences between adults and yearlings. There were no significant effects on cortisol concentrations.

Discussion

To our knowledge, this is the first report of the effects of the EE performed under general anaesthesia on biochemical and physiological parameters in pampas

Table 1. Induction and recovery times and total time (min) during which adult (CA) and yearlings (CJ) pampas deer males remain anesthetized and were electroejaculated. Results are expressed as means \pm SEM

| | CA | CJ |
|----------------|----------------|----------------|
| Induction time | 16.7 \pm 6.8 | 16.8 \pm 9.5 |
| Recovery time | 3.0 \pm 2.5 | 1.5 \pm 1.2 |

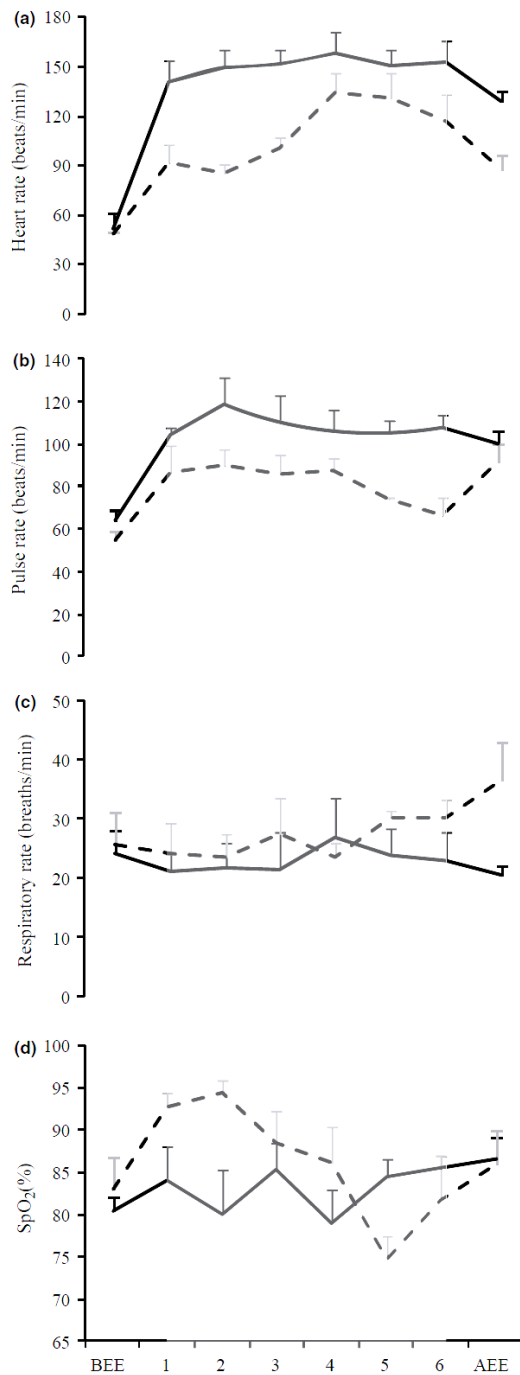


Fig. 1. Heart rate (a; beats/min), pulse rate (b; beats/min), respiratory rate (c; breaths/min), oxygen saturation (d; %) before (BEE), during and after (AEE) electroejaculation in adults (continuous lines) and yearlings (discontinuous lines) anesthetized pampas deer. Grey area corresponds to the period of electroejaculation

deer males. Moreover, similar information is scarce also in other species of cervids. The anaesthetic combination and dose used in this study were effective for the capture and anaesthetic management. The rapid induction prevented the occurrence of possible accidents in the animals and staff. However, the length of the induction time was greater than that reported in other species such as white-tailed deer (Delgiudice et al. 1990). This may be due to a lower dose of ketamine than the dose used in other trials (Delgiudice et al. 1990), including experiences with the same specie (Duarte and Garcia 1997). The use of this low dose of ketamine could diminish its residual effects. Added to this, and once the effect of xylazine was reversed, animals could be taken back quickly to their paddocks. Overall, we can affirm that all anesthetized animals showed a quickly and pleasant decubitus, and the anaesthetic effect was effectively and quickly reversed, similarly to what was reported in electroejaculated anesthetized Iberian ibex (Santiago-Moreno et al. 2011).

As reference values for heart, pulse and respiratory rates and rectal temperature have not been reported for pampas deer, it is difficult to drive strong conclusions on cardiopulmonary and thermoregulatory changes induced by anaesthetic and EE management. The increase in heart activity may be associated with the presence of pain, as happens in electroejaculated rams (Damián and Ungerfeld 2011), in which that response was achieved to stress caused by EE. Moreover, the increase in heart rate values may be related to electrical stimuli during EE. During the recorded period, pulse rate had a similar pattern than heart rate, probably as a consequence of the increase in heart rate. However, heart rate was tending to go back to initial values after EE finished, at least during the recorded period it remained still elevated.

The oximetry values were low enough to assume that animals were hypoxemic during the anaesthetic management. Similar values of oximetry were described by other authors in other deer under anaesthesia (Read et al. 2001; Arnemo et al. 2005). This could be due to the effect of alpha-2-agonists (Celly et al. 1997; Read et al. 2001) or the prolonged lateral recumbency (Wagner et al. 1990; Read et al. 2001). The decline in rectal temperature recorded in our study AEE could be due to time of anaesthesia with alpha-2-agonists. In this sense, alpha-2-agonists are known to induce dose-dependent hypo or hyperthermia (Livingston et al. 1984), depending on the environmental temperature (Ponder and Clark 1980). Therefore, considering that there were little changes on the environmental temperature while the animals were electroejaculated, oximetry and thermal decreases may probably be more related to the long period during which animals remained anesthetized.

Creatine kinase and aspartate aminotransferase increased in serum, possibly reflecting the presence of strong activity or muscle damage (Kramer and Hoffman 1997). Those increases may be expected because of intensive hind movements observed during EE. A similar increase in creatine kinase concentrations was previously reported in electroejaculated rams

Table 2. Rectal temperature, blood enzymes and cortisol concentration obtained before and after electroejaculation (BEE and AEE) in adult (CA) and yearlings (CJ) anaesthetized pampas deer. The results are presented as mean \pm SEM

| | CA | | CJ | | p | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|--------|-----|
| | BEE | AEE | BEE | AEE | Tr | T | Int |
| RT (°C) | 37.5 \pm 0.8 | 36.7 \pm 0.7 | 37.6 \pm 0.4 | 37.1 \pm 0.4 | NS | 0.0001 | NS |
| AP (U/L) | 251 \pm 85 | 323 \pm 118 | 404 \pm 85 | 444 \pm 96 | <0.05 | <0.001 | NS |
| CK (U/L) | 157 \pm 125 | 370 \pm 40 | 303 \pm 56 | 788 \pm 251 | <0.05 | <0.01 | NS |
| AST (U/L) | 71 \pm 24 | 75 \pm 12 | 76 \pm 19 | 99 \pm 18 | NS | <0.05 | NS |
| Cortisol (μ g/dl) | 0.21 \pm 0.03 | 0.99 \pm 1.01 | 0.45 \pm 0.31 | 0.87 \pm 0.90 | NS | NS | NS |

RT, rectal temperature; AP, alkaline phosphatase; CK, creatine kinase; AST, aspartate aminotransferase; Tr, effect of categories (adults vs yearlings); T, time effect (BEE vs AEE); Int, interaction between categories and time.

(Damián and Ungerfeld 2011). Although aspartate aminotransferase values increased with EE, values were lower than those that reflect muscle damage in pronghorn (Chalmers and Barrett 1977), moose (Haigh et al. 1977), bovids, other cervids and equids (Wallace et al. 1987). However, as there are no reports of basal data in any of these enzymes for this specie, we cannot discard that also the first sample had high values.

In our study, the alkaline phosphatase concentration before EE was greater than what previously reported in free-living pampas deer (Uhart et al. 2003). Alkaline phosphatase increases are associated with liver cell damage, liver and bone diseases and bone development (Tennant 1997). We do not have an explanation to the increase observed in alkaline phosphatase concentrations AEE.

Yearling males had greater values in creatine kinase and alkaline phosphatase concentrations than adults, probably because of musculoskeletal growth of young animals (Marco et al. 1997; Perez et al. 2003).

Cortisol concentrations did not change in relation to EE. Cortisol increases are associated with physical and emotional challenges, exercise or hypoglycaemia (Broom and Johnson 1993) and is a reliable indicator of acute stress associated with capture and handling of wild animals (Delgiudice et al. 1990). Therefore, as there are no data of basal values available, we cannot discard that cortisol concentration increased before the first sample, as a consequence of capture stress.

Overall, we concluded that the EE under general anaesthesia in the pampas deer provoked increases in heart and pulse rates, as well as in creatine kinase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase concentrations, and a decrease in rectal temperature in

both categories. Oximetry values were especially low during the procedure, although were not affected by EE. Heart rate increase was greater in adult males, and alkaline phosphatase and creatine kinase concentrations were greater in yearlings. There were no changes in cortisol concentrations after EE. Throughout anaesthesia, proper monitoring and oxygen therapy should be carried out because of the risks of hypoxaemia when alpha-2-agonists are used.

Acknowledgements

This work was supported by CSIC (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay), Intendencia Municipal de Maldonado (Uruguay) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). Tabaré González-Sierra as Director of the ECFA, Johnny Brioso, Ricardo Sorello, Edgardo Barrios from ECFA for help with animal management; Solana González, Helen Viotti, Pedro Martino helped with the determination of haematological parameters; Marcela Canabal, Tatiana Morales, Lorena Lacuesta and Leticia de la Fuente for data collection.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest to declare.

Author contributions

Fernando Fumagalli participated in the experimental design, organization of the experiment, data collection and analysis, lab analysis, and wrote the basis of the manuscript. Matías Villagrán participated in the organization of the experiment, data collection and analysis, and writing the manuscript. Juan Pablo Damián participated in data collection and analysis, lab analysis, and writing the manuscript. Rodolfo Ungerfeld Participated in experimental design, coordinated all the activities, data collection and analysis, and writing the manuscript.

References

- Arnemo JM, Storaas T, Khadka CB, Wegge P, 2005: Use of medetomidine ketamine and atipamezole for reversible immobilization of free-ranging hog deer (*Axis porcinus*) captured in drive nets. *J Wildl Dis* **4**, 467–470.
- Broom DM, Johnson KG, 1993: Assessing welfare: short-term responses. In: Broom DM, Johnson KG (eds), *Stress and Animal Welfare*. Chapman & Hall, London, United Kingdom, pp. 87–114.
- Celly CS, Mcdonell W, Young SS, Black WD, 1997: The comparative hypoxaemic effect of four α 2 adrenoceptor agonists (xylazine, romifidine, detomidine and medetomidine) in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* **20**, 464–471.
- Chalmers GA, Barrett MW, 1977: Capture myopathy in pronghorns in Alberta, Canada. *J Am Vet Med Assoc* **171**, 918–923.
- Chapple RS, English AW, Mulley RC, Lephed EE, 1991: Haematology and serum biochemistry of captive unsedated chital deer (*Axis (Cervus) axis*) in Australia. *J Wildl Dis* **27**, 396–406.
- CITES, 2010: [homepage on the Internet] Appendices I, II and III. [updated 2010 October 4] Available: <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml> (accessed 13 May 2011).
- Damián JP, Ungerfeld R, 2011: The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reprod Domest Anim* **46**, in press.
- Delgiudice GD, Kunkel KE, Mech LD, Seal US, 1990: Minimizing capture-related stress on white-tailed deer with a capture collar. *J Wildl Manage* **54**, 299–303.
- Demaría MR, Meshea WJ, Koy K, Maccira NO, 2003: Pampas deer conservation with respect to habitat loss and protected area considerations in San Luis, Argentina. *Biol Conserv* **115**, 121–130.
- Duarte JMB, García JM, 1997: Tecnología da reprodução para propagação e conservação de espécies ameaçadas de extinção.

- In: Duarte JM (ed), *Biología e Conservação de Cervídeos Sul-americanos*. FUNEPA, Brasil, pp. 228–238.
- Duarte JMB, Arantes IG, Garcia JM, Nascimento AA, 1993: Captura e avaliação de uma população de *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* no Brasil. In: IUCN. Population and Viability Assessment for the Pampas Deer SSC/UICN.
- Haigh JC, Stewart RR, Wobeser G, Macwilliams PS, 1977: Capture myopathy in a moose. *J Am Vet Med Assoc* **171**, 924–932.
- Jackson JE, Langguth A, 1987: Ecology and status of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) in the Argentinian pampas and Uruguay. In: Wemmer C (ed.), *Biology and Management of the Cervidae*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp. 402–409.
- Klinger SR, Robel RJ, Brown BA, Brent BE, 1986: Blood characteristics of white-tailed deer from northeastern Kansas. *J Wildl Dis* **22**, 385–388.
- Kock MD, Jessup DA, Clark RK, Franti CE, 1987: Effects of capture on biological parameters in free-ranging bighorn sheep (*Ovis canadensis*): evaluation of drop-net, drive-net, chemical immobilization and the net-gun. *J Wildl Dis* **23**, 641–651.
- Kramer JW, Hoffman WE, 1997: Clinical enzymology. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th edn. Academic Press, San Diego, USA, pp. 309–325.
- Livingston A, Low J, Morris B, 1984: Effects of clonidine and xylazine on body temperature in the rat. *Br J Pharm* **81**, 189–195.
- Marco I, Viñas L, Velarde R, Pastor J, Lavín S, 1997: Effects of capture and transport blood parameters in free-ranging mouflon (*Ovis ammon*). *J Zoo Wildl Med* **28**, 428–433.
- Martínez AF, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Fernández-Santos MR, Esteso MC, de Paz P, Garde JJ, Anel L, 2008: Sperm parameters on Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology* **70**, 216–226.
- Martínez-Pastor F, Martínez F, Álvarez M, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Soler AJ, Garde JJ, de Paz P, Anel L, 2009: Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electro-ejaculation. *Theriogenology* **71**, 628–638.
- Ortiz-De-Montellano M, Galindo-Maldonado F, Cavazos-Arizpe EO, Aguayo-Arceo AM, Torres-Acosta JF, Orihuela A, 2007: Effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response of Criollo goats (*Capra hircus*). *Small Rumin Res* **69**, 228–231.
- Pérez JM, González FJ, Granados JE, Pérez MC, Fandos P, Soriguer RC, Serrano E, 2003: Hematologic and biochemical reference intervals for Spanish ibex. *J Wildl Dis* **39**, 209–215.
- Ponder SW, Clark WG, 1980: Prolonged depression of thermoregulation after xylazine administration to cats. *J Vet Pharmacol Ther* **3**, 203–207.
- Read MR, Caulkett NA, Symington A, Shury TK, 2001: Treatment of hypoxemia during xylazine-tiletamine zolazepam immobilization of wapiti. *Can Vet J* **42**, 861–864.
- Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, Sookhthearay A, Gómez-Guillamón F, Salas de la Vega R, Pulido-Pastor A, López-Sebastián A, 2011: Effects of anesthetic protocols on electroejaculation variables of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Res Vet Sci* **90**, 150–155.
- Soto A, Vallejos P, Mezino MI, Carpiretti BM, 1995: Obtención de semen por medio de vagina artificial en venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1756). X Jornadas Argentinas de Mastozoología, 14 to 17 November. La Plata, Argentina, p61.
- Stafford KJ, Spoorenberg J, West DM, Vermunt JJ, Petrie N, Lawoko CR, 1996: The effect of electro-ejaculation on aversive behavior and plasma cortisol concentration in rams. *N Z Vet J* **44**, 95–98.
- Tennant BC, 1997: Hepatic function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th edn. San Diego, USA: Academic Pr, pp. 327–352.
- Uhart MM, Vila AR, Beade MS, Balcarce A, Karesh WB, 2003: Health evaluation of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos Del Túyu wildlife reserve, Argentina. *J Wildl Dis* **39**, 887–893.
- IUCN, 2010: [homepage on the Internet] The iucn Red List of Threatened Species. *Ozotoceros Bezoarticus Uruguayensis*. Available: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/15803/0> (accessed 12 May 2011).
- Umaphathy G, Sontakke SD, Reddy A, Shivaji S, 2007: Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). *Theriogenology* **67**, 1371–1378.
- Ungerfeld R, González-Pensado S, Bielli A, Villagrán M, Olazabal D, Pérez W, 2008: Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. *Acta Vet Scand* **50**, 16.
- Wagner AE, Muir WW, Grospitch BJ, 1990: Cardiopulmonary effects of position in conscious cattle. *Am J Vet Res* **51**, 7–10.
- Wallace RS, Bush M, Montali LJ, 1987: Deaths from exertional myopathy at the national zoological park from 1975 to 1985. *J Wildl Dis* **23**, 454–462.

Submitted: 16 May 2011; Accepted: 20 Jun 2011

Author's address (for correspondence): Rodolfo Ungerfeld, Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo 11600, Uruguay. E-mail: rungerfeld@gmail.com