



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL

**BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO
APLICADA AL DESARROLLO DE UN BANCO DE RECURSOS GENÉTICOS
EN EL OSO PARDO (*Ursus arctos*)**

**Male reproductive biology applied to the development of a genetic resource bank
in the brown bear (*Ursus arctos*)**

Patricia Manrique Revuelta

Programa de Doctorado:
Ciencias Veterinarias y de los Alimentos

Tutora:
María Mercedes Álvarez García

Dirigida por:
Luis Anel Rodríguez
María Mercedes Álvarez García

León, 2023

AGRADECIMIENTOS

No son pocas las personas a quienes quiero agradecer haber formado parte, de una u otra forma, de este proyecto que ha marcado más de 10 años del comienzo de mi vida profesional.

A mis directores de tesis, Luis Anel y Mercedes Álvarez, sin los que esto no habría sido posible. A Paulino de Paz por su inestimable ayuda. A Santiago Borragán por ser mi guía en el Parque de Cabárceno y tenderme su mano en tantos aspectos. A Miguel Ángel Prieto, Miguel Ángel Marañón, los cuidadores de la sección de Ruta y a todo el personal del Parque de la Naturaleza de Cabárceno que ha colaborado en este proyecto. A mis compañeros investigadores de la Universidad de León, en especial a Elena López Urueña.

A Estela Molinero y tantos amigos que también han “sufrido” mi tesis durante todos estos años.

Pero sobre todo a mi familia. A mi padre Marcelino Manrique, mi madre Rosa Revuelta, mis hermanos Judit Manrique y Samuel Manrique y mi sobrino Óliver Manrique.

Gracias por todo.

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A continuación, se muestran las definiciones de una serie de abreviaturas y acrónimos utilizados en este documento.

ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide
Cor_Log	Conversión logarítmica de la testosterona
EB	Periodo reproductivo temprano (Early Breeding)
FR	Fracción rica del eyaculado
iACRO	Espermatozoides viables con acrosomas intactos
LB	Periodo reproductivo tardío (Late Breeding)
LIN	Índice de linealidad ($LIN = VSL / VCL \times 100$, donde VCL = velocidad curvilínea)
MI	Espermatozoides móviles totales
MIT	Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial
MP	Espermatozoides con movimiento progresivo
N	Tamaño muestral
PB	Periodo reproductivo central (Peak Breeding)
PBS	Tampón fosfato salino
PI	Ioduro de propidio
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i> conjugada con isotiocianato de fluoresceína
PostB	Periodo posterior a la época reproductiva (Post-Breeding)
PreB	Periodo previo a la época reproductiva (Pre-Breeding)
STR	Rectitud
SEM	Error estándar de la media
Spz	Espermatozoides
T	Concentración sérica de testosterona
Tes_Log	Conversión logarítmica de la testosterona
VCL	Velocidad curvilínea (velocidad de trayectoria curvilínea)
VAP	Velocidad media (velocidad de la trayectoria suavizada)
VIAB	Espermatozoides viables
VSL	Velocidad rectilínea (velocidad de la trayectoria rectilínea)

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY.....	7
3. INTRODUCCIÓN	13
3.1. El oso pardo: estatus y estrategias de conservación	15
3.2. Biología reproductiva	18
3.2.1. Estructura social	20
3.2.2. Ritmo biológico anual	27
3.2.3. Calidad seminal	47
4. OBJETIVOS.....	65
5. OBJECTIVES.....	69
6. MATERIAL Y MÉTODOS	73
6.1. Animales y área de estudio	75
6.2. Metodología	76
6.2.1. Estudio etológico.....	77
6.2.1.1. Estudio de la estructura social.....	78
6.2.1.2. Estudio de los ritmos anuales en el comportamiento	81
6.2.2. Toma de medidas morfológicas y muestras biológicas	83
6.2.2.1. Manejo anestésico	83
6.2.2.2. Peso corporal y morfometría	84
6.2.2.3. Análisis sanguíneos.....	84
6.2.2.4. Recogida y valoración de eyaculados	85
7. EXPERIENCIA I. ESTRUCTURA SOCIAL DE LOS MACHOS DE OSO PARDO (<i>Ursus arctos</i>).....	89
7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	91
7.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	93
7.3. RESULTADOS	94
7.3.1. Establecimiento de la estructura social	94
7.3.2. Descripción de los factores asociados al estatus social.....	97
7.4. DISCUSIÓN.....	101
7.4.1. Establecimiento de la estructura social	102
7.4.2. Descripción de los factores asociados al estatus social.....	107

8. EXPERIENCIA II. RITMO REPRODUCTIVO ANUAL DE LOS MACHOS DE OSO PARDO (<i>Ursus arctos</i>).....	113
8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	115
8.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	117
8.3. RESULTADOS	118
8.3.1. Establecimiento de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo	119
8.3.1.1. Ritmo anual de la concentración de testosterona sérica	119
8.3.1.2. Ritmo anual del comportamiento reproductivo.....	119
8.3.1.3. Delimitación de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo	121
8.3.2. Descripción de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual de los machos de oso pardo	122
8.3.2.1. Descripción de las variaciones anuales en el comportamiento asociadas a la estacionalidad reproductiva.....	122
8.3.2.2. Descripción de las variaciones anuales en parámetros morfológicos y fisiológicos asociadas a la estacionalidad reproductiva	126
8.4. DISCUSIÓN.....	131
8.4.1. Establecimiento de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo	131
8.4.1.1. Ritmo anual de la concentración de testosterona sérica	131
8.4.1.2. Ritmo anual del comportamiento reproductivo.....	132
8.4.1.3. Delimitación de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo	135
8.4.2. Descripción de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual en los machos de oso pardo	136
8.4.2.1. Descripción de las variaciones anuales en el comportamiento asociadas a la estacionalidad reproductiva.....	137
8.4.2.2. Descripción de las variaciones anuales en parámetros morfológicos y fisiológicos asociadas a la estacionalidad reproductiva	145
9. EXPERIENCIA III. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE LOS EYACULADOS DE OSO PARDO (<i>Ursus arctos</i>)	159
9.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	161
9.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	163
9.3.1. Características generales de los eyaculados.....	164
9.3.2. Análisis de los factores de variación de la calidad de los eyaculados	166
9.3.2.1. Estacionalidad	167
9.3.2.2. Edad.....	167

9.3.2.3. Volumen testicular	170
9.3.2.4. Testosterona sérica	170
9.3.2.5. Estatus social	174
9.4. DISCUSIÓN.....	175
9.4.1. Características generales de los eyaculados.....	176
9.4.2. Análisis de los factores de variación de la calidad de los eyaculados	178
9.4.2.1. Estacionalidad	178
9.4.2.2. Edad.....	180
9.4.2.3. Volumen testicular	182
9.4.2.4. Testosterona sérica	184
9.4.2.5. Estatus social	187
10. CONCLUSIONES.....	191
11. CONCLUSIONS.....	195
12. BIBLIOGRAFÍA	199
13. APÉNDICE A. Material complementario	223
14. APÉNDICE B. Documentos gráficos.....	253
15. APÉNDICE C. Curriculum Vitae	265

1. RESUMEN

Los bancos de recursos genéticos constituyen una herramienta prioritaria en la conservación de las especies o poblaciones en peligro de extinción como es el caso de la población de oso pardo que habita en la Cordillera Cantábrica. La optimización de esta estrategia de conservación implica el uso de protocolos adaptados a la especie, que requieren el conocimiento previo de su biología reproductiva. Sin embargo, las dificultades de su observación y manejo en libertad junto con la compleja fisiología de esta especie han propiciado que aún exista un importante desconocimiento al respecto.

La presente Tesis Doctoral aporta información de interés en este contexto acerca de la estructura social de los machos de oso pardo en régimen de semilibertad, la influencia de su ritmo biológico reproductivo anual en el comportamiento y la fisiología, y la relación de la calidad seminal con la estacionalidad, así como con factores propios del macho (edad, niveles de testosterona, tamaño testicular y estatus social).

En la primera experiencia, se estudió la jerarquía de dominancia y los factores asociados a la misma de los 27 machos mayores de tres años de la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. El estudio de la relación de dominancia entre todos los pares de individuos (díadas) mostró que en la gran mayoría de interacciones agresivas en las que se puede determinar el sentido de la dominancia (encuentros decisivos) siempre fue vencedor el mismo macho de cada díada, lo cual indica una jerarquía social muy estable durante los dos años del estudio. Los intentos de definir un orden jerárquico poblacional lineal revelaron la falta de un método de análisis apropiado, lo cual se debió principalmente a la falta de información acerca de encuentros decisivos en más de dos tercios de las díadas de la población. La solución fue permitir situaciones de igualdad en la dominancia entre individuos, para lo cual se optimizó el algoritmo de ordenación jerárquica I & SI desarrollado por Schmid & de Vries (2013) con la finalidad de describir grupos de individuos en los que éstos son intercambiables en su estatus de dominancia. El uso del lenguaje Python para su desarrollo sirvió además para agilizar el análisis ante un gran volumen de datos. El orden resultante reveló tres clases de dominancia: la clase dominante con 3 individuos, la clase intermedia con 8 individuos y una clase subordinada formada por 16 individuos y que incluyó la mayoría de osos subadultos. Estas clases de dominancia han podido ser explicadas en base a parámetros morfométricos (peso corporal, medidas de colmillos, pies y manos), endocrinos (niveles de testosterona) y etológicos (interrupción de montas). Las características más representativas de los osos dominantes fueron un mayor peso corporal y exhibición de comportamiento de interrupción de montas hacia otros osos.

En la segunda experiencia, el ritmo biológico anual de los machos se definió en base a criterios reproductivos y se describió en función de parámetros etológicos (comportamiento agresivo, de monta, juego y presencia en el área de estudio), morfológicos (peso corporal y volumen testicular) y sanguíneos (hemograma completo, proteínas totales, colesterol, glucosa, testosterona y cortisol). La época reproductiva ocurrió entre marzo y agosto y tuvo un periodo reproductivo central en la segunda quincena de abril y el mes de mayo caracterizado por un pico en la actividad reproductiva y en los niveles testosterona sérica (>5 ng/mL). Así, el año natural se dividió en cinco unidades temporales denominadas periodos: PreB (previo a la época reproductiva; enero y febrero), EB (reproductivo temprano; marzo y primera quincena de abril), PB (reproductivo central; segunda quincena de abril y mayo), LB (reproductivo tardío; junio, julio y agosto) y PostB (posterior a la época reproductiva; septiembre a diciembre). Existieron variaciones significativas entre los periodos en todos los tipos de comportamiento, todos los parámetros morfológicos y en la mayoría de parámetros sanguíneos. En EB los machos tuvieron mayor peso corporal que en el resto de la época reproductiva ($p < 0,01$). Durante PB los machos se caracterizaron por tener el máximo índice de comportamiento sexual ($p < 0,01$) y la máxima concentración de testosterona ($p < 0,01$) y, debido a la intensa competición por las hembras, también los máximos índices de comportamiento agonístico ($p < 0,01$) y los mínimos de juego ($p < 0,01$) de todo el año. Con respecto a LB, en PB también se observaron un mayor volumen testicular ($p < 0,05$) y mayores concentraciones de leucocitos, neutrófilos y monocitos ($p < 0,05$), así como menores concentraciones de eosinófilos ($p < 0,01$). Aunque no se encontró linfopenia, el resto de hallazgos de la serie blanca sanguínea coinciden con los indicadores de un leucograma de estrés durante PB. Sin embargo, el cortisol sérico, considerado también un marcador de estrés, no presentó cambios significativos a lo largo del año. Los componentes de la serie roja y plaquetaria no variaron durante la época reproductiva. Los niveles más bajos de colesterol de la época reproductiva se observaron durante PB ($p < 0,05$) y las proteínas totales fueron menores en PB que en LB ($p < 0,01$). Por otra parte, la mayor presencia de individuos del año se observó en LB ($p < 0,01$) en respuesta a un aumento del apetito en la fase de hiperfagia ya que el área de observación es también el lugar de administración de alimento. La concentración sanguínea de glucosa estuvo positivamente correlacionada con el peso corporal ($p < 0,01$; $r = 0,40$) y sus valores mínimos anuales se detectaron durante LB ($p < 0,01$).

Finalmente, en la tercera y última experiencia se evaluó la influencia de diversos factores sobre la calidad seminal en la fracción con mayor concentración espermática (fracción rica) del eyaculado: la estacionalidad (como principal factor ambiental) y la edad, el volumen testicular, los niveles de testosterona y el estatus social (estos como aspectos dependientes del macho

donante). Los factores dependientes del macho fueron analizados sólo durante PB para minimizar influencias estacionales. A partir de la segunda quincena de abril (PB) la fracción rica del eyaculado no presentó diferencias significativas con LB en los parámetros pH, osmolalidad, volumen, concentración espermática, producción espermática, MI, MP, VAP, VSL, ALH, iACRO (espermatozoides viables con acrosomas intactos), VIAB (espermatozoides viables) ni MIT (espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial). En EB, las muestras espermáticas presentaron menores valores de volumen, VAP, VSL, LIN e iACRO en comparación con LB ($p < 0,05$), aunque pueden considerarse eyaculados de buena calidad para su criopreservación. El estatus social de los machos no influyó en ninguna característica seminal. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en algunas características seminales en función del volumen testicular y la edad del macho, pero éstas no implican mejoras evidentes en la calidad de los eyaculados para ninguno de los grupos estudiados. En este sentido, los osos del grupo de edad entre 10 y 20 años tuvieron una menor concentración espermática ($p < 0,05$), lo cual podría estar relacionado con elevadas frecuencias de eyaculación en ese grupo. Por otra parte, eyaculados de machos con valores de testosterona inferiores a 1 ng/mL se asociaron a menores porcentajes de espermatozoides móviles, y una disminución de VAP y VSL ($p < 0,05$).

En consecuencia, podemos afirmar que, aunque los machos sexualmente maduros de oso pardo presentan una marcada jerarquía social e importantes variaciones asociadas a la estacionalidad reproductiva en aspectos etológicos, morfológicos y fisiológicos, su calidad seminal se mantiene en rangos apropiados para su conservación en el banco de recursos genéticos durante todos los periodos de la época reproductiva e independientemente de los factores individuales estudiados en la presente tesis doctoral.

2. SUMMARY

Genetic resource banks are a priority tool for the conservation of endangered species or populations such as the Cantabrian brown bear population. Optimizing this conservation strategy means using protocols adapted to the species, which require prior knowledge of its reproductive biology. However, the difficulties of observing and handling brown bears in the wild, together with their complex physiology, have led to a significant lack of knowledge on the matter.

This doctoral dissertation provides relevant information about the social structure of male brown bears living under semi-free conditions, the influence of their annual reproductive biological rhythm on their behaviour and physiology, and the relationship between seminal quality and seasonality, as well as individual male factors (age, testosterone levels, testicular volume and social status).

In the first experience, the dominance hierarchy of the 27 males older than three years in the brown bear population from Cabárceno Nature Park and the factors associated with dominance status were studied. The study of the dominance relationship between all pairs of individuals (dyads) showed that in the vast majority of aggressive interactions in which winner and loser can be determined (decisive encounters) the same male of each dyad was always the winner. This shows a very stable social hierarchy during the two years of the study. Attempts to define a linear hierarchical order for the population revealed the absence of an appropriate method of analysis, mainly due to the lack of information about decisive encounters in more than two thirds of the population dyads. The solution found was to allow situations of equality in dominance between individuals, using an optimized version of the I & SI hierarchical ordering algorithm developed by Schmid & de Vries (2013), to be able to describe groups of individuals in which their dominance status is interchangeable. The use of the Python language allowed to speed up the analysis of large volumes of data. The resulting order revealed three dominance classes: the dominant class with 3 individuals, the intermediate class with 8 individuals and a subordinate class with 16 individuals in which the majority of subadult individuals were included. These dominance classes could be explained based on morphometric (body weight, measurements of canine teeth, feet and hands), endocrine (testosterone levels) and ethological (interruption of mating) parameters. The most representative characteristics of dominant males were higher body weight and display of interruption of mating behaviour towards other bears.

In the second experience, the annual biological rhythm of brown bear males was defined based on reproductive criteria and it was described in terms of ethological (aggressive, mounting and play behaviours and number of bears in the study area), morphological (body weight and testicular volume) and blood (complete hemogram, total protein, cholesterol, glucose,

testosterone and cortisol levels) parameters. The reproductive season occurred between March and August and had a central reproductive period in the second half of April and May characterized by a peak in reproductive activity and serum testosterone levels (>5 ng/mL). Thus, the natural year is divided into five temporal units called periods: PreB (Pre-Breeding; January and February), EB (Early Breeding; March and the first fortnight of April), PB (Peak Breeding; the second half of April and May), LB (Late Breeding; June, July and August) and PostB (Post-Breeding; September to December). There were changes between periods in all types of behaviours, all morphological parameters and in most blood parameters. Males had higher body weight in PB than during the rest of the reproductive season ($p < 0,01$). During PB, males showed the highest rate of sexual behaviour ($p < 0,01$) and testosterone concentration ($p < 0,01$) and, due to the intense competition for females, also the highest rates of agonistic behaviour ($p < 0,01$) and the lowest rates of play behaviour ($p < 0,01$) of the year. If compared to LB, PB also showed higher testicular volume ($p < 0,05$), higher leukocyte, neutrophil and monocyte concentrations ($p < 0,05$) and lower eosinophil ($p < 0,01$) concentrations. Although lymphopenia was not observed, the rest of the findings regarding the white blood cells match the indicators of a stress leukogram during PB. However, serum cortisol, also considered to increase under stress conditions, did not present changes during the whole year. The components of the red and platelet series did not change during the reproductive season. The lowest levels of cholesterol during the breeding season were observed during PB ($p < 0,05$) and total protein levels were lower during PB than during LB ($p < 0,01$). The highest number of bears in the study area of the year happened in LB ($p < 0,01$) in response to increased appetite during the hyperphagia phase because the study area is also the place used for food administration. Blood glucose concentration was positively correlated to body weight ($p < 0,02$; $r = 0,40$) and was the lowest during LB ($p < 0,01$).

Finally, in the third and last experience the influence of several factors on the seminal quality of the more concentrated fraction (rich fraction) of the ejaculate were studied: seasonality (as main environmental factor) and age, testicular volume, testosterone levels, and social status (as main individual male factors). Factors dependent on the male were evaluated only during PB to minimize seasonal influences. As of the second fortnight of April (PB) the rich fraction of the ejaculate did not present changes with respect to LB in the parameters pH, osmolality, volume, spermatozoa concentration and production, MI, MP, VAP, VSL, LIN, ALH, iACRO (viable spermatozoa with intact acrosomes), VIAB (viable spermatozoa), and MIT (spermatozoa with high mitochondrial membrane potential). During EB, seminal samples showed lower volume, VAP, VSL, LIN and iACRO compared to LB ($p < 0,05$), but they still can be considered a good

quality sample for cryopreservation. The male social status did not have any influence in seminal characteristics. However, significant differences were found in some seminal characteristics depending on the testicular volume and age of the male, but such differences do not imply clear improvements in seminal quality for any of the groups. Bears from the age group between 10 and 20 years old had lower spermatozoa concentration ($p < 0,05$), which could be related to higher ejaculation frequencies at that age group. Serum testosterone levels below 1 ng/mL were associated with lower percentages of motile spermatozoa and decreases in VAP and VSL ($p < 0,05$).

Therefore, it can be asserted that, although sexually mature male brown bears present a marked social hierarchy and important variations associated with reproductive seasonality in ethological, morphological and physiological aspects, their seminal quality is appropriate for cryopreservation into the genetic resource bank during all the periods comprising the reproductive season and regardless of all the individual factors studied in this doctoral dissertation.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. EL OSO PARDO: ESTATUS Y ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN

La pérdida de biodiversidad supone actualmente una crisis medioambiental sin precedentes para el ser humano. La velocidad de desaparición de especies sobre el planeta, que sigue incrementándose, se estima que supone ya decenas o cientos de veces las cifras medias de los últimos millones de años (Díaz et al., 2019). Las alarmantes cifras indican que el 28 % de las especies catalogadas en la Lista Roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) están oficialmente declaradas como amenazadas y un creciente número de autores habla incluso de una posible sexta extinción masiva (Finn et al., 2023). Asimismo, a estas clasificaciones por especie deben añadirse categorías fijadas para numerosas poblaciones que, aunque pertenezcan a una especie no amenazada a nivel global, pueden encontrarse en peligro de desaparición en un territorio concreto. En este contexto, se dibuja un escenario en el que el inherente vínculo entre Naturaleza y bienestar humano conlleva la necesidad de proteger la salud de los ecosistemas y, por tanto, de la diversidad de especies que forman parte de ellos. La situación supone un desafío urgente cuyo abordaje, tanto in situ como ex situ, comenzó hace décadas, y cuyo mayor o menor grado de éxito dependerá del uso de diversas tácticas y estrategias desde una orientación global e integradora.

Los grandes mamíferos, debido principalmente a la gran influencia que ejerce sobre ellos la modificación antropogénica de los ecosistemas, necesitan ser objeto de una especial atención por parte de los esfuerzos conservacionistas. Este es el caso de los úrsidos, grupo conformado por ocho especies distintas de las cuales seis de ellas ya se encuentran clasificadas como en peligro de extinción por la UICN. El oso pardo (*Ursus arctos*), por su parte, a pesar de considerarse globalmente aún como especie de preocupación menor, es especialmente sensible a los cambios ya que necesita muy extensas áreas de distribución y se caracteriza por exhibir bajas tasas reproductivas. Esta fragilidad se ha hecho patente en numerosas áreas donde encontramos poblaciones, muy a menudo fragmentadas y en ocasiones con un número muy bajo de individuos, que ostentan el estatus de amenazadas. Esta situación es frecuente en Europa, debido a la estrecha convivencia a la que seres humanos y osos se han visto forzados en áreas humanizadas.

En España, el oso pardo, históricamente distribuido por toda la Península Ibérica, se encuentra actualmente categorizado como especie "en peligro de extinción" (Real Decreto 139/2011, de 4 de Febrero, Para El Desarrollo Del Listado de Especies Silvestres En Régimen de Protección Especial y Del Catálogo Español de Especies Amenazadas). Su caza no está permitida desde el año 1973 (Wiegand et al., 1998). En su territorio existen dos poblaciones de oso pardo europeo

(*Ursus arctos arctos*), situadas: en el área de la Cordillera Cantábrica, en adelante población "cantábrica"; y de los Pirineos, en adelante población "pirenaica". Ambas poblaciones se encuentran divididas a su vez en varias subpoblaciones cada una, con la consiguiente problemática de variabilidad genética asociada. Las estimaciones de tamaño poblacional realizadas mediante el uso de métodos genéticos hablaban de 223 osos en el núcleo cantábrico en 2014 (Pérez et al., 2014) que aumentaron a alrededor de 370 en 2020 (Fundación Oso Pardo, 2023), y de al menos 76 en la pirenaica en el año 2022 (Fundación Oso Pardo, 2023). Estas cifras contrastan abiertamente con las mostradas por la mayoría de censos previos a la década de los '80, los cuales, a pesar de estar generalmente sesgados o de basarse en una discutible metodología, coincidían en señalar menos de 100 individuos en la población cantábrica (Palomero et al., 2006). El hecho de que ambas poblaciones estén mostrando signos de recuperación durante las últimas décadas es el resultado de un intenso esfuerzo a muy distintos niveles, que ha debido adoptar diferentes estrategias en cada región para adaptarse a sus necesidades concretas. Mientras que en la población pirenaica ha sido necesaria la introducción de ejemplares, concretamente de procedencia eslovaca, la que ocupa la Cordillera Cantábrica conserva la genética original de la Península Ibérica. Los peligros a los que se enfrenta el mayor animal terrestre de la Península Ibérica derivan a grandes rasgos de la pérdida y fragmentación del hábitat, de la baja variabilidad genética, y del conflicto con el ser humano, el cual se está viendo incrementado a medida que aumenta el número de ejemplares. No obstante, la intensidad de cada amenaza varía en las diferentes subpoblaciones. La población pirenaica presenta una doble problemática, asociada por un lado a un histórico conflicto con el ser humano y por otro a la consanguinidad, agravada por la supremacía reproductiva de un macho durante más de una década (Palazón et al., 2012). La población cantábrica, por su parte, debe hacer frente a la fragmentación de sus dos subpoblaciones, aunque la descripción de casos puntuales de conectividad entre ellas a principios de siglo (Pérez et al., 2010) supone un hito en la recuperación de esta población, representante de una línea genética especialmente vulnerable. Desde el punto de vista filogenético, las poblaciones cantábrica, pirenaica y del sur de Escandinavia eran las únicas remanentes de uno de los tres clados descritos para la subpoblación de osos europea mediante el análisis de ADN mitocondrial (Taberlet & Bouvet, 1994). La hibridación de la población pirenaica no hace sino subrayar la importancia de la conservación de estas dos poblaciones restantes por su especial interés evolutivo.

En vista de la situación actual, se puede afirmar que la pérdida de variabilidad genética es uno de los grandes retos de la conservación del mayor mamífero de la Península Ibérica. Ya en 2003, las heterozigosis observadas en ambas poblaciones del territorio español eran las menores de

las descritas en todas las poblaciones continentales de oso pardo estudiadas hasta el momento (García et al., 2003). Además de sus consecuencias directas sobre la presencia de defectos congénitos, la fertilidad o la resistencia a enfermedades, la variación genética generalmente se considera uno de los factores que favorecen la capacidad de adaptación de las poblaciones (Soulé, 1991). No debemos olvidar que, a pesar de los esperanzadores datos en cuanto al tamaño poblacional, estamos hablando de una población vulnerable por su pequeño tamaño y el alto grado de humanización de su hábitat. El aumento de la variabilidad genética en la población de los Pirineos se ha abordado principalmente a través de la introducción de nuevos individuos con sucesivas traslocaciones. Sin embargo, en la población cantábrica, y bajo la premisa de no alteración de su genética ancestral, los genes necesarios deben proceder de la misma población y por tanto los esfuerzos deben centrarse en preservar la variabilidad actual y en aumentar el flujo genético entre los dos núcleos que la conforman, en los cuales se ha demostrado la presencia de alelos muy diferentes (García et al., 2003).

La diversificación en el uso de las distintas tácticas de conservación existentes es clave a la hora de abordar planes de conservación de poblaciones pequeñas y con limitada variabilidad genética, que son las más afectadas por la fragmentación del hábitat. Acciones encaminadas a la preservación de los ecosistemas y a la educación ambiental idealmente deberán complementarse con la preservación de la diversidad biológica ex situ, en la cual juegan un papel de creciente importancia las tecnologías de la reproducción. En este contexto, cabe destacar muy especialmente la figura de los bancos de recursos genéticos (BRG), auténticos almacenes in vitro de material genético, especialmente de germoplasma, que son clave para los programas de reproducción asistida (Wildt et al., 1997). Los bancos de germoplasma tienen la finalidad de: por un lado, preservar, en teoría de forma indefinida, la variabilidad genética que albergan; y, por otro, servir como fuente de materiales potencialmente utilizables en procedimientos como la inseminación artificial o la transferencia de embriones, constituyendo de esta manera un nexo entre la conservación in situ y ex situ de las especies. Sus aplicaciones son, por tanto, de incalculable valor para poblaciones fragmentadas o que hayan sufrido uno o varios cuellos de botella a lo largo de su historia evolutiva, como es el caso del oso pardo en la Cordillera Cantábrica, ya que su optimización permitiría tanto salvaguardar alelos únicos procedentes de animales de elevado valor genético como realizar intercambios de material genético entre subpoblaciones sin necesidad de recurrir a la translocación de animales vivos.

En mayor o menor medida, el éxito de cualquiera de los métodos de conservación de especies de los que disponemos en la actualidad, incluyendo el uso de tecnologías reproductivas, requieren el conocimiento previo de la biología reproductiva de cada especie (Holt & Pickard,

1999; Wildt, 1992). En este sentido, los aspectos fisiológicos y etológicos son esenciales tanto para desarrollar tecnologías reproductivas específicas de especie como para determinar los factores que modulan las estrategias reproductivas, la dispersión genética o la intensidad de la selección sexual, y por ende la supervivencia de la especie.

3.2. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

La necesidad de comprensión de los procesos que determinan la dinámica poblacional en el oso pardo contrasta abiertamente con la dificultad de su estudio en libertad. Aunque se ha desarrollado una intensa actividad investigadora en las últimas décadas, aún existe una crucial falta de datos en campos de gran interés para la especie. Son varias las razones que favorecen esta situación, las cuales pasan por sus bajas densidades de población, su elevada movilidad o por su carácter típicamente elusivo hacia el ser humano. Del mismo modo, algunos de los complejos mecanismos fisiológicos adoptados por la especie complican la comprensión de su biología reproductiva y todos los aspectos etológicos y adaptativos que de ella derivan.

El oso pardo es una especie de reproducción estacional en la que ambos sexos son polígamos y pueden tener descendencia con varios individuos distintos en cada época reproductiva (Bellemain et al., 2006a; Shimozuru et al., 2020). La mayoría de montas registradas para la especie suceden en primavera y verano, aunque existen registros ocasionales de cópulas en otoño (Steyaert et al., 2012). No existen diferencias en las medias ni medianas de las fechas de estro entre poblaciones cautivas o en libertad (Spady et al., 2007). Las hembras presentan celos de duración muy variable, existiendo registros entre 1 y 50 días, y se cree que, al igual que en el oso negro, existe ovulación inducida (Boone et al., 2004; Steyaert et al., 2012). Recientemente se ha demostrado que las hembras de oso negro americano pueden experimentar una segunda ovulación con capacidad de ser fértil dentro de la misma época reproductiva, incluso cuando ya están preñadas (Himelright et al., 2014). Además, las osas presentan implantación diferida, de forma que ésta sucede alrededor de 5 meses después de la fecundación (Steyaert et al., 2012). Estudios basados en las concentraciones de progesterona y en las cicatrices uterinas sugieren una considerable incidencia de pseudogestaciones (Ishikawa et al., 2003; Tsubota et al., 1992) y de reabsorciones embrionarias (Tsubota et al., 1990), respectivamente. Las gestaciones exitosas darán lugar generalmente a entre uno y tres oseznos, pero más frecuentemente dos, de tipo altricial, que nacerán durante el ayuno invernal de las osas. Existe incluso la descripción de un caso de una camada con oseznos del mismo padre nacidos en diferentes fechas separadas por 17 días (Ware et al., 2011). No hay participación del macho en el cuidado de las crías, y la

duración del cuidado maternal es variable pero siempre mayor a un año, pudiendo llegar incluso hasta más de cuatro (Schwartz et al., 2003). Son comunes los casos de infanticidio durante la época reproductiva, y las hembras pueden entrar en estro potencialmente fértil si pierden la camada entera (Steyaert et al., 2014).

Los machos también presentan estacionalidad reproductiva, paralela a la de las hembras, tanto en su comportamiento como en distintos caracteres anatómicos y fisiológicos. La estructura testicular pasa por cuatro fases distintas en relación a su estructura y capacidad funcional: quiescencia, durante la cual no existe espermatogénesis; recrudescencia, caracterizada por un crecimiento y diferenciación con la finalidad de preparar la fase activa de espermatogénesis y actividad sexual; pico funcional, que se superpone a la época reproductiva; y regresión, con disminución de la función testicular una vez finalizada la época reproductiva (Spady et al., 2007). Las concentraciones séricas de testosterona (T) y el tamaño o masa testicular también varían cíclicamente, con los valores más bajos durante el letargo invernal y los máximos coincidiendo con la espermatogénesis (Tsubota & Kanagawa, 1989; White et al., 2005). Aunque algunos individuos de entre 3 y 4 años pueden ser fértiles (White et al., 1998; Zedrosser et al., 2007), la edad más frecuente de madurez sexual en machos descrita para para oso grizzly es de 4,5 (Erickson et al., 1968) o 5,5 años (White et al., 1998). Existe no obstante el caso de un oso pardo de Hokkaido con espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos en su segundo año de vida (White et al., 1998). No hay evidencia de senescencia en los machos, existiendo casos de descendencia hasta edades tan avanzadas como los 34 años en osos en libertad (Shimozuru et al., 2020). La paternidad múltiple dentro de la misma camada es relativamente frecuente en el oso pardo (Bellemain et al., 2006a).

Nuestro conocimiento de la biología reproductiva del oso pardo aún es limitado. Steyaert et al. (2012), en la revisión más completa hasta la fecha, ya señalaba explícitamente la necesidad de investigar su biología reproductiva en escalas espaciales reducidas. Entre las muchas incógnitas que aún rodean a esta enigmática especie, destacan tanto numerosos aspectos del ciclo estral, incluyendo el momento de la ovulación, como indicadores de diagnóstico de gestación. Centrándonos en el macho, se debería considerar prioritario el estudio de los determinantes tanto del acceso a las hembras como de la función testicular y la calidad seminal, los cuales darán las claves, en última instancia, para comprender el éxito reproductivo individual y por tanto la expresión de la variabilidad genética poblacional. La comprensión del comportamiento, estacionalidad reproductiva, gametogénesis y mecanismos reguladores del éxito reproductivo son algunos de los elementos clave que determinarán, en última instancia, la utilidad de la reproducción asistida en la conservación de la especie (Wildt, 1992).

3.2.1. Estructura social

Significado biológico del estatus social

En una especie como el oso pardo, debido a las particularidades de su comportamiento y sistema reproductivo, cabría esperar que el acceso a un elevado número de hembras fuese uno de los determinantes del éxito reproductivo en los machos. Además, el momento del ciclo reproductivo de las hembras en el que suceden los encuentros sexuales con un macho concreto debería ser clave en las posibilidades de fecundación por parte de ese macho. El estatus social o grado de dominancia a menudo se asocia, en numerosas especies, con un mejor acceso a recursos reproductivos y alimenticios o mejoras de los índices de supervivencia. En ocasiones, puede incluso influir en la calidad seminal (Montrose et al., 2008). En el oso pardo, se ha observado la interrupción de una monta debido al ataque o aproximación de otro macho (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962), es decir, de lo que sería la mayor expresión de acceso preferente a las hembras reproductoras. Del mismo modo, se ha sugerido que un mayor grado de dominancia significaría diferenciación en el comportamiento sexual. Así, Craighead et al. (1995a) observaron cómo los osos dominantes son capaces de alejar a subordinados de una hembra en celo, mientras que otros por debajo en la escala jerárquica generalmente obtuvieron oportunidades de cópula en ausencia de dominantes y, posiblemente, de forma más frecuente con hembras que se encontraban al final su periodo receptivo. Aunque en dicho estudio, realizado en el Parque Nacional de Yellowstone, la frecuencia de cópulas no fue significativamente mayor para los osos dominantes, estos autores sugirieron que los dominantes podían ser capaces de monopolizar a las hembras en los momentos de mayor fertilidad, asegurándose así mayores probabilidades de éxito reproductivo. En esta línea, encontramos que, también en Yellowstone, Hornocker (1962) relató cómo el macho dominante utilizaba la defensa de una hembra frente a otros machos durante largos periodos de tiempo.

El oso pardo está típicamente considerado como un animal solitario y no territorial (Steyaert et al., 2012), en el que las asociaciones intraespecíficas entre individuos adultos se limitan casi exclusivamente a aquellas de carácter sexual durante la época reproductiva. Sin embargo, un importante número de estudios sugieren que podría ser una especie más social de lo generalmente asumido. Es el caso de la descripción por parte de Stenhouse et al. (2005) de elevadas frecuencias de interacciones entre individuos del mismo sexo, o de la demostración en osos escandinavos tanto de formas de supresión sexual entre osas como de la influencia de aspectos familiares en la dispersión juvenil (Ordiz et al., 2008; Støen et al., 2006). Recientemente, se ha prestado una especial atención a formas de comunicación intraespecífica distintas del contacto directo, demostrándose que la comunicación química y visual a través del

marcaje en árboles es dependiente del sexo y la edad, y que el patrón de marcaje de los machos adultos apoya la hipótesis del uso de señales químicas para comunicar su estatus de dominancia (Clapham et al., 2012; Penteriani et al., 2023). Además, existen casos de asociaciones de hembras con crías (Craighead et al., 1995a) o de eventos de caza en grupo (Colmenares & Rivero, 1983). La existencia de cicatrices habituales en machos durante la época de celo (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962; Pulliainen et al., 1984) sugiere un elevado número de interacciones agonísticas intraespecíficas. Asimismo, son frecuentes las asociaciones de más de dos individuos en época de celo (Steyaert et al., 2012) e incluso se ha descrito la existencia de zonas de apareamiento interanuales en la Cordillera Cantábrica, con agrupaciones de distintos individuos en ellas (Fernández-Gil et al., 2006). Finalmente, en situaciones de abundancia de recursos alimenticios, en los que los osos pueden congregarse, se ha observado el establecimiento de ciertas formas de jerarquía social. Esto está ampliamente descrito en el oso pardo y en el oso negro americano. Para el oso pardo, dichas estructuras sociales han sido estudiadas tanto en lugares de abundancia de alimento artificiales por la formación de vertederos (Craighead et al., 1995a; Hornocker, 1962; Peirce & Daele, 2006), como naturales (Egbert et al., 1976; Gende & Quinn, 2004; Marshall, 2008; Pulliainen et al., 1984; Stonorov & Stokes, 1972), así como en grupos de osos mantenidos en cautividad (Koene et al., 2002; Koene & Ipema, 2014). Ante las cada vez mayores evidencias de la complejidad de las relaciones intraespecíficas del oso pardo, la existencia de formaciones jerárquicas claras en lugares donde es posible la observación de un elevado número de individuos plantea irremediamente la posibilidad de que cada población de osos pueda estructurarse en base a sistemas de establecimiento y mantenimiento de jerarquías de dominancia adaptadas a cada situación concreta. El funcionamiento de las relaciones intraespecíficas del oso pardo en escenarios con elevada densidad de animales puede por tanto ofrecernos las claves para la comprensión de dichas situaciones en relación a numerosos aspectos sociales e incluso reproductivos.

En estos lugares de agrupación de osos pardos, los estudios existentes coinciden en describir una estructura social por estratos según sexo y edad, y en las hembras también según estatus reproductivo. Similares resultados se han obtenido para el oso negro (Herrero, 1983). Aunque con excepciones de individuos concretos, en términos generales los osos jóvenes y subadultos ocuparon el estrato inferior, y los machos adultos el superior o cúspide de la pirámide jerárquica. Las hembras acompañadas de crías dependientes, por su parte, a menudo son situadas en una posición dominante con respecto a la mayoría de los machos adultos (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962; Peirce & Daele, 2006; Stonorov & Stokes, 1972). La estabilidad de la estructura social en el tiempo es un tema aún controvertido, ya que existen autores que sugieren

estabilidad en dos poblaciones de oso grizzly distintas durante 3 años, aunque sin una demostración objetiva (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962), mientras que Craighead et al. (1995a) hablan de un reajuste social anual al menos en las posiciones más altas de la cumbre jerárquica de la población de oso pardo de Yellowstone.

Establecimiento de la estructura social

Para determinar el sentido de la relación de dominancia existente entre dos individuos, estudios previos han recurrido a ciertos parámetros comportamentales exhibidos durante los encuentros entre ellos que los autores interpretan como indicativos de superioridad jerárquica, y que son distintos en cada estudio. En general, en el oso pardo se ha coincidido en usar como indicador de subordinación el abandono o desplazamiento activo del lugar del encuentro (Egbert et al., 1976; Gende & Quinn, 2004; Koene et al., 2002; Peirce & Daele, 2006; Stonorov & Stokes, 1972). Además, algunos estudios han considerado otros comportamientos como propios de los animales subordinados: el mantenimiento de una distancia mínima con un segundo animal (Gende & Quinn, 2004), la alteración de la dirección de un desplazamiento causada por la presencia de otro individuo (Egbert et al., 1976), o el mantenimiento de una orientación lateral hacia otro oso (Koene et al., 2002). Por el contrario, Hornocker (1962) consideró la agresividad de un individuo como el principal rasgo de rango jerárquico, el cual determinó en función de la agresividad, edad, tamaño o una combinación de estos. En cuanto a la frecuencia con la que es posible establecer la relación de dominancia entre los individuos durante un encuentro, encontramos que tanto Stonorov & Stokes (1972) como Koene et al. (2002) afirmaron que la distinción entre individuo dominante y subordinado pudo realizarse en la mayoría de encuentros. Por el contrario, Egbert et al. (1976) afirmaron que no todas las interacciones agonísticas dieron una indicación clara del estatus social relativo entre osos.

Por otra parte, se han descrito distintos niveles de agresividad o participación en interacciones agresivas en función del estatus de dominancia de los individuos o la edad. Egbert et al. (1976) observaron que los machos inferiores en la escala jerárquica se mostraron menos agresivos entre ellos. Marshall (2008) señaló que el oso más dominante participó en más del 70 % de las interacciones agresivas. De manera similar, Hornocker (1962) encontró que, lo que él denominó machos adultos “defensivos” (en la base de la jerarquía), sólo participaban en luchas ocasionalmente, mientras que la dominancia se encontraba más manifestada en la cúspide jerárquica. En cuanto a la edad, Egbert et al. (1976) describieron mayores índices de encuentros agonísticos con elevada agresividad, caracterizados por cargas o contacto físico, en los machos

adultos en comparación con los “adolescentes”, considerando como tal entre los 4,5 y 8,5 años. Según Peirce & Daele (2006), también existe una influencia de la densidad poblacional, de manera que el número de interacciones agresivas se incrementó a medida que aumentaba el número de osos en el lugar de estudio.

La expresión a nivel de población de las relaciones de dominancia utiliza también distinta metodología para cada población estudiada. Algunos autores se han limitado a expresar el número o porcentaje de encuentros ganados por grupos de sexo y edad (Egbert et al., 1976; Peirce & Daele, 2006), y/o describieron como "Dominante" a un individuo concreto que nunca perdió un encuentro agresivo (Egbert et al., 1976; Gende & Quinn, 2004). Gende & Quinn (2004), además, utilizaron el razonamiento contrario para denominar como “subordinados” a aquellos osos que, habiendo tenido al menos cuatro interacciones con otros osos, siempre habían resultado vencidos; el resto de individuos quedarían así en una categoría intermedia. Los estudios realizados en Yellowstone por Hornocker (1962) y más tarde por Craighead et al. (1995a) fueron más allá y describieron clases de dominancia dentro de los grupos de sexo y edad, con distinta denominación según cada autor. Mientras que Hornocker (1962) no especifica criterios objetivos diferenciales entre clases, Craighead et al. (1995a) utilizaron un sistema propio de puntuación para la clasificación de los individuos en el que resulta ser, hasta la fecha, el estudio más completo sobre jerarquía social en el oso pardo, el cual analizó el comportamiento del oso grizzly de Yellowstone en el vertedero “Tout Creek”. Sus resultados concluyeron que, durante los años 1959 a 1964, existía un estrato superior en la jerarquía, denominado “contenders”, que estuvo compuesto por entre 2 y 6 individuos, incluyendo al macho alfa, en una población con un máximo de 30 machos. Anualmente, este estrato supuso entre el 8 % y el 36 % de los machos de la población, con una media del 23 %. Sin embargo, la metodología utilizada por Craighead et al. (1995a) resulta incompleta en varios puntos: en primer lugar, distinguió entre los dos principales estratos de la población utilizando como única premisa qué individuo inició los encuentros agresivos; por otra parte, no indicó los patrones de comportamiento utilizados para identificar al animal dominante en una interacción agresiva; y, por último, no expuso los resultados de las interacciones agonísticas registradas en el estrato de población subordinado.

Finalmente, tan sólo Koene et al. (2002), Marshall (2008), y Stonorov & Stokes (1972) especificaron las relaciones relativas de dominancia entre cada par de individuos de todos los osos de las poblaciones que han estudiado, utilizando matrices de interacción diádica en las que aparecen todas las combinaciones de individuos de la población. Estas matrices de dominancia muestran el número de encuentros agonísticos ganados, perdidos, empatados o las relaciones

sin interacciones entre cada posible par de individuos, permitiendo así determinar el orden más adecuado en la organización social del oso pardo. Los citados autores describieron la relación entre 6, 4 y 7 machos respectivamente, y las matrices generadas contenían pares de individuos sin relación determinada entre ellos, con encuentros ganados en ambos sentidos, y/o cuya relación de dominancia era contraria al orden poblacional establecido. Sus estudios etológicos duraron un máximo de 3 meses, lo cual no permitió evaluar la estabilidad de las clasificaciones descritas.

A priori, las matrices de dominancia a las que nos referimos buscan la ordenación de los individuos para demostrar una jerarquía lo más cercana posible a la linealidad. En una jerarquía lineal perfecta el oso "A" sería dominante sobre todos los demás, "B" dominaría a todos excepto a "A", "C" a todos excepto a "A" y a "B", y así sucesivamente. Se han propuesto diversos métodos para la ordenación de una población en un orden cercano a la linealidad usando interacciones de dominancia-subordinación (de Vries, 1998). Sin embargo, en la práctica, las características de las poblaciones en libertad y la falta de conocimiento de todas las relaciones diádicas posibles excluyen algunos de ellos. Schmid & de Vries (2013) perfeccionaron el método I & SI descrito por De Vries (1998) y desarrollaron el software "Domicalc". En este método se evalúan los órdenes alternativos que cumplan la premisa de mínimo número de "inconsistencias" ("I") y "fuerza de las inconsistencias" ("IS"), es decir, el menor número posible de díadas cuya relación de dominancia sea contraria al orden jerárquico global (inconsistencias), y cuya diferencia de rangos entre los participantes de dichas díadas sea menor (fuerza de las inconsistencias). Domicalc presenta una desventaja fundamental ya que, a pesar de considerar relaciones empatadas o desconocidas, no permite relaciones de igualdad de dominancia, y el ranking se expresa siempre como una estructura totalmente lineal. Los resultados obtenidos en estudios de dominancia en el oso pardo apuntan a la dificultad de obtener la relación de dominancia con una frecuencia suficiente en los pares de individuos que componen la población. Gende & Quinn (2004), estudiando la jerarquía de dos poblaciones que no contaban con machos adultos, en su primer año encontraron un 28 y un 33 % de díadas en las que fue posible valorar el estatus, mientras que el segundo año decidieron no establecer un orden social debido al aumento de díadas con relación de dominancia desconocida. Unos años más tarde, Marshall (2008) registró interacciones entre la mitad de los posibles pares de individuos de su población, y además afirmó que no había suficiente evidencia de una estructura jerárquica lineal, la cual podría no existir especialmente entre los individuos de dominancia intermedia. La falta de linealidad se expresó en el estudio de Egbert et al. (1976) en forma de inconsistencias y relaciones triangulares habituales.

A la vista de la complejidad de los datos obtenidos en estudios etológicos en oso pardo, los cuales a menudo no fueron capaces de revelar la relación de un importante número de diadas, y de la posibilidad fundada de que las relaciones de dominancia en osos pardos puedan no ser puramente lineales, surge la necesidad de perfeccionar los métodos existentes de modo que permitan considerar relaciones no establecidas o demostradas a todos los niveles.

Factores asociados al estatus social

Conocer los factores determinantes de la posición jerárquica de los machos de oso pardo resulta fundamental para evaluar la dinámica social y posiblemente el flujo genético en la especie. Las características biológicas asociadas al estatus social descritas para distintas especies incluyen edad, sexo, tamaño corporal, familiaridad con el área, agresividad, superioridad en cuanto a partes del cuerpo usadas en la lucha, o en cuanto a habilidades sociales, entre otros factores. Además, el conocimiento del papel de las hormonas en la regulación de los patrones de comportamiento implicados en el establecimiento de la jerarquía es aún primitivo, pero resulta de esencial importancia para la comprensión de la agresividad y la probabilidad de resultar vencedor en interacciones agonísticas.

En el oso pardo, aún existe un vacío importante a este respecto, ya que los diversos autores que describen jerarquías sociales en la especie sugieren distintos aspectos que podrían influir sobre ella, pero sin presentar datos cuantificables en su mayoría. Algunos de los determinantes del estatus social del oso pardo propuestos son un mayor tamaño corporal (Craighead et al., 1995a; Egbert et al., 1976), superiores habilidades en la lucha (Craighead et al., 1995a) y una mayor agresividad (Hornocker, 1962). Las habilidades en la lucha constituyen un concepto ambiguo, en el cual podrían influir parámetros morfométricos como el tamaño de las partes del cuerpo utilizadas en la lucha; así como la experiencia, la cual estaría presumiblemente asociada a la edad; o incluso el grado de agresividad. Por su parte, la agresividad se relaciona habitualmente con el nivel de testosterona circulante en los machos.

El único análisis objetivo sobre determinantes de estatus social en el oso pardo fue realizado por Craighead et al. (1995a), quienes encontraron una tendencia en los machos del estrato de dominancia superior a un mayor peso y tamaño corporal, pero sin diferencias estadísticas asociadas debido presumiblemente al pequeño tamaño muestral. Respecto al peso, éste es un parámetro con fuertes oscilaciones anuales derivadas de los marcados cambios en el apetito y la actividad que caracterizan al ritmo biológico anual del oso pardo. Tradicionalmente, se ha relacionado a los machos más grandes de diversas especies de úrsidos con ventajas sociales y

reproductivas, como: mejores resultados en enfrentamientos en el oso panda (Nie et al., 2012), mayores índices de éxito reproductivo en el oso negro (Kovach & Powell, 2003) y mayor producción de oseznos en el oso pardo (Zedrosser et al., 2007). Como indicadores del tamaño corporal, estos autores han usado el peso (Kovach & Powell, 2003), la circunferencia de la cabeza (Zedrosser et al., 2007) e incluso una estimación visual de la condición corporal (Nie et al., 2012). A pesar de que pueden ser indicadores de tamaño corporal y de superioridad en las luchas con contacto físico, no conocemos referencias de estudios similares que utilicen medidas de extremidades o colmillos en el oso pardo. En mandriles, existe evidencia de que, tras una corrección asociada a la edad debido al desgaste, entre los individuos de mayor rango jerárquico la longitud de los colmillos se asocia a un mayor estatus de dominancia (Galbany et al., 2015). Por tanto, ante la falta de datos al respecto en ninguna especie de oso, sería interesante evaluar la hipótesis de que mayores tamaños de colmillos, manos y/o pies estuviesen relacionados con un estatus social superior en los machos.

Por otra parte, diversos aspectos del perfil endocrino individual han sido relacionados con la posición dentro de la jerarquía de dominancia en numerosas especies. Sin embargo, de nuevo tampoco existen referencias al respecto en el oso pardo. Este resulta un campo de investigación con numerosas posibilidades ante el reciente desarrollo de las técnicas no invasivas de análisis hormonal. No obstante, se debe tener presente que las hormonas son metabolitos sometidos a una compleja cascada de regulación que las hace susceptibles de variar ante la influencia de numerosos factores como la edad, momento del año, momento del día o de la captura, método de muestreo, estado nutricional, contexto social o factores estresantes, entre otros. Sus funciones son también intrincadas: mientras que la testosterona está reconocida como factor regulador del comportamiento reproductivo y agresivo (Giammanco et al., 2004), la concentración de glucocorticoides es considerada una respuesta a eventos estresantes entre los que se pueden considerar la reproducción o eventos agonísticos (Creel, 2001). Además, la testosterona no sólo es capaz de regular el nivel de agresividad, sino que, a su vez, según la teoría denominada “challenge hypothesis”, los niveles de testosterona aumentarían como consecuencia de interacciones agresivas entre machos (Wingfield et al., 1990). A su vez, elevados niveles de glucocorticoides pueden inhibir la reproducción (Creel, 2001). Se ha demostrado una relación positiva entre los niveles de testosterona y el rango de dominancia o comportamientos asociados a la misma en una gran variedad de especies. Algunos autores, no obstante, han encontrado resultados contrarios, y la literatura sugiere que la relación entre testosterona y dominancia es más fuerte en situaciones de inestabilidad social (Mehta et al., 2008). Por su parte, la relación entre concentraciones de glucocorticoides y dominancia es muy

variable (Creel, 2001). Aunque tradicionalmente se ha pensado que el mayor coste metabólico del conflicto social al que se encuentran sometidos los individuos subordinados conllevaría mayores concentraciones basales de glucocorticoides (Goymann & Wingfield, 2004), numerosos estudios han encontrado resultados contrarios en un amplio rango de especies, y muy especialmente en aquellas que utilizan la crianza cooperativa como sistema social (Creel, 2001). La explicación a tal fenómeno podría pasar por considerar que las diferencias o similitudes entre los niveles de glucocorticoides circulantes no sean un resultado del estatus social, sino de otros factores o rasgos inherentes al mismo, que difieren en cada especie y contexto social. En cualquier caso, ya sea causado por una relación directa o por las ventajas y desventajas del estatus social, no puede negarse que existe una interacción entre el ambiente social y la función endocrina dependiente del contexto social concreto. Una interacción entre las hormonas testosterona y cortisol en la regulación del comportamiento de dominancia también ha sido propuesta recientemente (Mehta & Josephs, 2010). Estas interacciones, aún desconocidas para el oso pardo, podrán ayudarnos a definir y comprender la dinámica social de la especie.

Finalmente, podemos concluir que existe un vacío generalizado en la definición de los factores determinantes de la estructura social del oso pardo. Se necesitan nuevos estudios que presenten, para una misma población, una evaluación simultánea de la estructura social a partir de variables etológicas objetivas y de los distintos parámetros propuestos a influir sobre ella. Sólo en base al pertinente análisis estadístico podremos llegar a comprender la expresión de la estructura social de los machos sobre sus capacidades reproductivas y, por tanto, sobre su potencial como donantes en la creación de un banco de recursos genéticos para la especie.

3.2.2. Ritmo biológico anual

El oso pardo es una especie con amplios rangos de distribución en todo el hemisferio norte, a muy distintas altitudes y latitudes, de forma que las características físicas y climáticas de sus hábitats modulan unos ritmos biológicos de duración e intensidad variables pero que poseen una estructura común en todas las poblaciones de oso estudiadas. A lo largo de la historia evolutiva del oso pardo, las variaciones anuales mostradas tanto a nivel comportamental como fisiológico han significado un componente de importante valor adaptativo en condiciones de cambio, como por ejemplo durante cambios climáticos (Spady et al., 2007).

En el reino animal, el ejemplo más extremo de adaptación estacional por excelencia es el fenómeno de la hibernación. En los meses más fríos, y tras una fase de hiperfagia previa, el oso pardo disminuye su temperatura corporal, su frecuencia cardiaca, y su tasa metabólica. Pueden

mantener este estado fisiológico hasta siete meses sin comer, beber, orinar o defecar (Schwartz et al., 2003). Esta conducta resulta excepcional para un animal de su tamaño corporal. Algunos autores sin embargo no están de acuerdo con el uso del término hibernación para el estado de torpor invernal del oso pardo, principalmente debido a que difiere de la hibernación descrita en otros mamíferos de menor tamaño en una manifiesta menor disminución de la temperatura corporal con respecto a la que experimentan los pequeños mamíferos utilizados como modelo. Sin embargo, esta diferencia podría ser causada debido a la disparidad en el ratio superficie/volumen corporal. La duración de este aletargamiento invernal varía enormemente entre los distintos hábitats y poblaciones de osos, siendo la latitud uno de los factores fundamentales de variación (González-Bernardo et al., 2020). Del mismo modo, dentro de una misma población varía entre animales de distinta edad, sexo y estatus reproductivo (González-Bernardo et al., 2020). Existen incluso evidencias de que algunos animales no experimentan dicho estado de torpor invernal, como es el caso de grupos familiares en la Cordillera Cantábrica (Nores et al., 2010; Palomero et al., 2011). Aquellos que sí experimentan torpor invernal pueden no cesar por completo su actividad, como el caso descrito por Clevenger et al. (1990) de un macho de la Cordillera Cantábrica que mostró movimientos ocasionales entre la osera y sus inmediaciones. Se han descrito asimismo variaciones interanuales en la cronología del letargo invernal de una misma población. En la Cordillera Cantábrica, los osos están activos una media de 9 a 10 meses, en contraste con los 6 a 8 meses típicos de algunas poblaciones escandinavas o americanas (Purroy, 2008). En el Parque de Cabárceno, debido a la presencia de oseras naturales y al régimen de manejo en semilibertad que permite la gran extensión del recinto, no es posible monitorizar mediante observación directa la actividad de todos los individuos durante los meses más fríos. El uso de dispositivos electrónicos intraabdominales podría resultar una alternativa interesante para determinar cambios en la temperatura corporal. Todo apunta a que, en Cabárceno, hay animales que sí experimentan letargo invernal ya que no son visualizados durante periodos extensos; otros individuos son observados fuera de las oseras pero exhibiendo niveles de actividad disminuidos, siendo difícil clarificar su estado fisiológico debido a la posibilidad de movimientos ocasionales alrededor de la osera durante el letargo (Clevenger et al., 1990); y finalmente, existen osos que no exhiben letargo invernal en Cabárceno (datos propios no publicados), especialmente las osas con crías, tal y como sucede en la Cordillera Cantábrica (Nores et al., 2010; Palomero et al., 2011).

Duración e intensidad de la actividad reproductiva

La actividad reproductiva es el otro gran evento anual que modula el ritmo biológico del oso pardo. En los machos, la presencia de espermatozoides en epidídimo y túbulos seminíferos está descrita tanto varios meses antes del comienzo de la actividad sexual como tras su finalización (Tsubota & Kanagawa, 1989; White et al., 1998).

Aunque en términos generales las cópulas suceden en primavera y verano, las distintas poblaciones estudiadas presentan una acusada diversidad en su cronología, existiendo registros de montas entre marzo y noviembre, con el máximo de duración de una misma época reproductiva de 138 días (Blanco et al., 2022; García-Rodríguez et al., 2020). García-Rodríguez et al. (2020) analizaron las diferencias en el ritmo anual de la actividad sexual existentes según el rango de distribución, concluyendo que el comienzo de la misma está relacionado con la latitud, pero no con la altitud, y que la duración de la época reproductiva no se encuentra influida por ninguna de las dos. Los mismos autores, tras realizar una revisión de los datos existentes, manifiestan la necesidad de una monitorización sistemática y a largo plazo del comportamiento sexual en el oso pardo. Aunque varios autores han sugerido el fotoperiodo como principal determinante de la actividad sexual en el oso pardo, aún existe un desconocimiento manifiesto sobre los factores que establecen su inicio y su duración. Diversos factores ambientales, sociales y nutricionales podrían estar implicados.

La población de osos de la Cordillera Cantábrica ostenta el récord de observación de comportamiento reproductivo más temprano, tanto si éste es entendido como asociación entre macho y hembra, la cual fue registrada el 15 de marzo, como si se refiere a cópulas, ya que la monta más temprana data del 28 de marzo (Blanco et al., 2022). En cualquier caso, en la Cordillera Cantábrica, y aunque unas primeras aproximaciones señalaban una actividad sexual limitada a dos meses entre la segunda quincena de abril y la primera de junio (Fernández-Gil et al., 2006), recientes datos han aportado información sobre montas en marzo, agosto y septiembre, siendo la más tardía el día 6 de septiembre (Blanco et al., 2022). En la literatura publicada sobre la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno, las primeras aproximaciones proponían una época reproductiva que abarcaba mayo y junio (García-Macías et al., 2006), mientras que las últimas estimaciones han sugerido una época reproductiva más amplia, comprendida entre los meses de abril y julio (Álvarez-Rodríguez et al., 2013a; Álvarez-Rodríguez et al., 2016; López-Urueña et al., 2014a; López-Urueña et al., 2016).

Delimitación del ciclo anual

Ambos eventos, letargo y época reproductiva, son los principales marcadores que se han venido utilizando para definir el ciclo anual del oso pardo. En ocasiones, se han descrito además etapas intermedias inmediatamente anteriores (González-Bernardo et al., 2020; Nelson & Robbins, 2010) o posteriores (Nelson et al., 1983) al letargo invernal, caracterizadas por estados disminuidos de actividad (González-Bernardo et al., 2020), o por anorexia y adiposidad (Nelson et al., 1983), entre otros. En este sentido, para la fase activa también se han diferenciado etapas concretas: separando el periodo de hiperfagia (Nelson et al., 1983), nombrando como pre-reproductivo y post-reproductivo los periodos previo y posterior a la época reproductiva (Cattet et al., 2017; García-Macías et al., 2006; Gomes-Alves et al., 2011; Tomiyasu et al., 2018), delimitando una etapa transicional previa a la reproducción (Tomiyasu et al., 2018) o señalando una etapa de mayor intensidad de actividad reproductiva (Craighead et al., 1995a; Fernández-Gil et al., 2006; Hornocker, 1962). En la población de oso grizzly de Yellowstone, Craighead et al. (1995a) y Hornocker (1962) observaron una mayor intensidad en la actividad reproductiva a finales de junio, mientras que en la Cordillera Cantábrica, ésta tuvo lugar en el mes de mayo, con el máximo en su segunda quincena (Fernández-Gil et al., 2006). De la misma forma, Palomero et al. (2011) también describen una mayor intensidad de comportamiento de cortejo en la Cordillera Cantábrica en mayo (75 % de las observaciones).

La definición de etapas dentro de la época reproductiva del oso pardo es, no obstante, escasa en la literatura, debido principalmente a la dificultad de la observación de este tipo de eventos en libertad. A pesar de que tanto Craighead et al. (1995a) como Fernández-Gil et al. (2006) y Spady et al. (2007) cuantificaron el número de montas observadas en sus estudios, ninguno de ellos realizó una compartimentación de la época de actividad sexual. Para el oso panda, no obstante, existe ya una definición de tres periodos distinguibles dentro de la época reproductiva, definidos en base al comportamiento sexual y niveles de estrógenos en las hembras, y que están marcados por un pico de actividad sexual central (“peak”), un periodo de actividad sexual temprana (“early”) y otro de actividad sexual tardía (“late”) (Aitken-Palmer et al., 2012). En condiciones de cautividad, Ishikawa et al. (2003) presentó datos de frecuencia de comportamiento reproductivo en dos parejas de oso pardo de Hokkaido (*Ursus arctos yesoensis*) y niveles hormonales en las hembras, concluyendo que las frecuencias de comportamiento sexual, por sí solas, no se correlacionaron con los niveles de 17β -estradiol ni progesterona en las osas. Si bien las características de la época reproductiva de una población se entienden condicionadas por la receptividad de las hembras, la cual podría presentar distinciones a nivel individual, los machos también pueden exhibir variaciones dentro del periodo en el que

muestran comportamiento reproductivo. El estudio de estas variaciones en machos de oso pardo ha sido a menudo orientado hacia los cambios endocrinos (Anel-López et al., 2017b; Tsubota & Kanagawa, 1989; White et al., 2005), mientras que otro tipo de cambios comportamentales o fisiológicos asociados a las diferentes etapas de la época reproductiva se encuentran mucho menos estudiados.

La definición de la ciclicidad y tendencias de distintas etapas en la época reproductiva en el oso pardo necesitaría un elevado volumen de datos de actividad sexual recogidos de una misma población debido a las fuertes diferencias en la estacionalidad reproductiva entre poblaciones, y que además estuviesen recogidos bajo un diseño experimental sistemático y, preferiblemente, interanual. Una vez definidos los límites de cada periodo, sería posible concretar los perfiles temporales de ciclicidad anual en diversos parámetros etológicos, morfológicos y fisiológicos en el oso pardo, los cuales serían extrapolables a cualquier población siempre que se tengan en cuenta las posibles variaciones en la extensión y la cronología de la actividad sexual de las distintas poblaciones.

Variaciones anuales en el comportamiento

Siguiendo esta línea lógica, sería posible afirmar que la influencia de la estacionalidad reproductiva en el oso pardo podría extenderse a cualquier rango de su comportamiento. A las diferencias en el comportamiento sexual ya comentadas podemos sin duda añadir aquellas en el nivel de actividad general, en el comportamiento maternofilial y en el comportamiento de ingesta, pero también merece la pena explorar las diferencias intraanuales en otros aspectos sociales del comportamiento de los osos, tanto a nivel agonístico como afiliativo.

Variaciones anuales en el nivel de actividad

El nivel de actividad en el oso pardo, a menudo evaluado a través de su actividad locomotora mediante telemetría, puede verse modificado por numerosos factores entre los que se incluyen la época del año, el acceso a recursos alimenticios, edad y estatus social o influencias antropogénicas, entre muchos otros. En general, los machos exhiben mayores rangos de distribución. De hecho, los mayores rangos descritos se atribuyen típicamente a machos en dispersión o machos adultos en época de celo, siendo esto último frecuentemente justificado por las características propias de su comportamiento reproductivo (Steyaert et al., 2020). Datos de un oso radiomarcado en la Cordillera Cantábrica revelaron grandes aumentos del rango de distribución durante la época de celo (1272 km²), con respecto al momento “pos-hibernación” de ese mismo año (tan sólo 69 km²) (Purroy, 2008).

Los niveles de actividad de osos europeos de poblaciones con latitudes similares a las de la Cordillera Cantábrica mostraron que los osos croatas e italianos se encontraron activos entre un 45 % - 60 % del tiempo durante el verano y otoño (Roth, 1983; Roth & Huber, 1986). Según Roth & Huber (1986), dicho grado de actividad descendió durante noviembre y diciembre (40 %), antes de entrar en la osera. Friebe et al. (2001) también registraron, en este caso para hembras escandinavas, niveles de actividad del 60 % en otoño. En la Cordillera Cantábrica, únicamente disponemos de los datos de un macho adulto radiomarcado, el cual mostró su máximo de actividad durante el verano (43 %), pero sin mostrar diferencias significativas con los niveles de actividad del otoño (39 %) y sí con los del periodo posterior al letargo invernal (31 %) (Clevenger et al., 1990). Es importante recordar que existe una descripción de estados disminuidos de actividad en las semanas anteriores y posteriores al estado de torpor invernal, que hacen pensar en adaptaciones progresivas entre los estados de actividad e inactividad, tanto a nivel locomotor como metabólico y fisiológico. Este carácter progresivo, para el caso de la disminución de la actividad en la época anterior a la entrada a las oseras, ha sido descrito por Friebe et al. (2001) y Sahlén et al. (2015) en osos escandinavos. En concreto, Friebe et al. (2001) encontró disminuciones semanales de un 5 % de la actividad en hembras desde la semana sexta antes de la entrada a la osera hasta la semana previa al letargo. En esa última semana, el descenso de su actividad fue mucho más brusco, señalándose en torno al 40 %. Finalmente, no debemos olvidar que las demandas energéticas del letargo invernal exigen un periodo de hiperfagia previo en el que se produce un marcado aumento del peso corporal en el oso pardo. La necesidad de incrementar las calorías ingeridas en esa época del año se describe asimismo como un importante factor regulador en el nivel de desplazamientos y actividad, cuyo grado de influencia será distinto para cada población en función de los alimentos disponibles y su aporte calórico, y para cada individuo en función de su grupo de edad, sexo, y estatus social en términos de dominancia, ya que éstos podrían determinar el acceso prioritario a los recursos. En lugares de abundancia estacional de alimentos como los salmones en época de desove, se ha demostrado una mayor actividad de los osos en dicho entorno coincidiendo con la época en la que aumentan los recursos (Quinn et al., 2014).

Variaciones anuales en el comportamiento agonístico

El comportamiento social entre adultos de oso pardo es sin duda el menos estudiado en cuanto a aspectos relacionados con su ciclicidad anual. Además de mediante interacciones que no implican contacto visual, los osos adultos también se relacionan por medio de eventos de naturaleza agresiva y amistosa.

El tipo de comportamiento agresivo que ha despertado mayor interés en la comunidad científica son los infanticidios. Las muertes de osos pardos llevadas a cabo por machos adultos son relativamente frecuentes, siendo las víctimas más habituales oseznos en época reproductiva, pero también individuos de cualquier edad y sexo (Schwartz et al., 2003). Sin embargo, este tipo de situaciones de extrema agresividad son sólo uno de los registros observados, de manera que se han descrito también enfrentamientos con y sin contacto físico (Egbert et al., 1976; Gende & Quinn, 2004; Hornocker, 1962; Koene et al., 2002; Montaudouin & Pape, 2005). La dificultad de observación de todas las formas de comportamiento agonístico que exhibe el oso pardo complica su estudio y la descripción de sus implicaciones y determinantes, pero esto no impide que el comportamiento agresivo en su sentido más amplio sea aceptado como uno de los pilares para el establecimiento y mantenimiento de la organización social y por tanto del acceso prioritario a recursos.

Sin atender a diferencias individuales, se han señalado varios determinantes de la frecuencia y/o intensidad del comportamiento agresivo en osos, principalmente la densidad de animales (Peirce & Daele, 2006), de recursos alimenticios (Egbert et al., 1976; Gende & Quinn, 2004), la existencia de dominancias pre-establecidas (Marshall, 2008) y la época del año (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962; Pulliainen et al., 1984). Además, en la mayoría de especies de mamíferos el comportamiento agresivo es dependiente del sexo (Bouissou, 1983), lo cual también cabría esperar en una especie con un dimorfismo sexual tan marcado como es el oso pardo. En cuanto a las influencias de la época del año, es importante puntualizar que la mayoría de referencias directas a comportamientos agresivos se corresponden con observaciones realizadas en lugares de agregación de osos debido a una abundancia de alimento limitada en el tiempo. Por esta razón, en su mayoría se trata de estudios cuyo esfuerzo de observación se corresponde en el tiempo con la presencia de salmón en los ríos, descrita entre junio y octubre, pero con variaciones notables en cada localización, limitándose por tanto a unas semanas concretas del año. Además, pueden encontrarse algunas referencias ligeramente más tempranas en el año en estudios que también se llevaron a cabo en torno a otro tipo de lugares con abundancia de alimento (Peirce & Daele, 2006; Pulliainen et al., 1984), pero no está en nuestro conocimiento la existencia de ningún estudio acerca del comportamiento agonístico en una única población de oso pardo que englobe todo un año natural.

Varios autores han sugerido un incremento de actividad con componente agresivo en machos de oso pardo relacionada con la reproducción (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962). Del mismo modo, la presencia de un importante número de cicatrices recientes coincidiendo con dicho periodo ha sido descrita en numerosas ocasiones (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962;

Pulliainen et al., 1984), lo cual indicaría participación en peleas con un elevado nivel de agresividad. Otras formas de comunicación social por parte de los machos, como el marcaje en elementos del medio, también se ven incrementados durante la época reproductiva (Tomiyasu et al., 2018). La influencia de las hormonas sexuales en estos comportamientos parece bastante clara para el caso del marcaje mediante glándulas sebáceas, ya que éstas aumentan de tamaño sólo cuando existe actividad gonadal (Tomiyasu et al., 2018). Si nos centramos en el comportamiento agresivo, también cabría esperar una fuerte influencia de las hormonas sexuales debido a la extensa literatura científica que describe la relación entre agresividad y testosterona en numerosas especies (Bouissou, 1983). Sin embargo, es necesaria más investigación al respecto en el oso pardo para poder determinar su papel en la expresión de dicho comportamiento debido al carácter multifactorial del mismo. Stonorov & Stokes (1972), por su parte, realizaron un análisis exhaustivo de los patrones de comportamiento mostrados en interacciones agonísticas durante aproximadamente un mes, llegando a la conclusión de que éstos variaban a medida que avanzaba el verano, de forma que disminuían las cargas y aumentaban los comportamientos de menor nivel de agresividad. Esta apreciación, realizada en un grupo de oso grizzly alimentándose en un arroyo durante la época de desove del salmón, podría estar relacionada con disminuciones en el nivel de testosterona, pero también con cambios en la disponibilidad de alimento, en la densidad de osos en la zona o con la habituación de los individuos entre ellos tras la formación de dominancias. El estudio paralelo del comportamiento agonístico y los niveles de testosterona en la misma población de osos sería necesario para abordar esta hipótesis. Las referencias a eventos de naturaleza agresiva entre octubre y mayo son muy escasas en el oso pardo, pero Palmer et al. (1988) han señalado, en oso polar, una reducción de los niveles de agresiones en esta especie de úrsido coincidente con bajas concentraciones de testosterona circulante durante la época de deshielo. La comprensión de los modulantes del comportamiento agresivo en machos de oso pardo, más allá de la consideración típica del mismo como estrategia reproductiva y alimenticia, debe partir por tanto del estudio de la influencia real de factores temporales y endocrinos cíclicos, lo cual permitirá interpretar, en las situaciones concretas de las distintas poblaciones e individuos, aquellos cambios asociados a la competición por alimento o derechos reproductivos.

Variaciones anuales en el comportamiento de juego

Por último, las interacciones directas entre individuos adultos sin componente sexual ni agresivo asociados constituyen el aspecto del comportamiento del oso pardo menos conocido. El comportamiento de juego en determinada especie puede ser considerado multifuncional, y puede verse influenciado por factores como la edad, sexo, factores ambientales y estatus social

(Clapham & Kitchin, 2016). Aunque los osos pueden jugar a cualquier edad (Fagen & Fagen, 1990), las interacciones amistosas, también denominadas juego social, han sido tradicionalmente atribuidas a oseznos u osos subadultos y muy especialmente a individuos de la misma camada. Una mayor actividad de juego en los individuos jóvenes es una constante general en todas las especies en las que se ha demostrado dicho comportamiento (Bekoff & Bekoff, 1984), lo cual coincide con los hallazgos de Egbert et al. (1976) en una agrupación de osos pardos producida por la abundancia temporal de salmón. Los resultados de Fagen & Fagen (2009), por su parte, pusieron de manifiesto frecuencias de juego sin diferencias significativas según la edad hasta al menos los 3 años de vida, pero estudios más exhaustivos similares al suyo deberían evaluar probables cambios al respecto en edades más tardías. En general, el juego social entre adultos suele presentarse en especies muy sociales, y por tanto no sería de esperar en los úrsidos; sin embargo, encontramos que los machos adultos de oso polar forman grupos durante la época de deshielo en los cuales el juego es frecuente (Latour, 1981a). Las escasas referencias al juego social entre osos pardos no emparentados en libertad o bien describen nulas interacciones amistosas entre machos adultos (Egbert et al., 1976), o bien derivan de estudios que no incluyen machos en edad reproductiva (Clapham & Kitchin, 2016; Stelmock & Frederick, 1980), o de estudios que no especifican si existían machos en la población (Fagen & Fagen, 1990). Respecto a osos mantenidos en cautividad, encontramos una referencia a juego entre dos machos adultos, uno de ellos ciego y castrado, en el estudio de Koene (1998), así como la descripción por parte de Colmenares & Rivero (1983) de una relación de tolerancia y comportamiento cooperativo entre dos machos adultos caracterizada por episodios frecuentes de juego.

Como ya comentábamos anteriormente, también el sexo juega un importante papel en el desarrollo de patrones comportamentales de naturaleza amistosa. Diferencias en el juego atendiendo al sexo han sido demostradas en varias especies, incluyendo el oso panda (Wilson, 2005). En otras especies de osos como el oso negro americano y el oso polar también se ha sugerido que los machos son más sociables que las hembras (Latour, 1981b; Ottewell, 2016). Además, Latour (1981b) describió cómo, en el oso polar, los machos adultos interactuaban con otros machos adultos con una mayor frecuencia que con el resto de rangos de sexo y edad.

El juego, en su sentido más amplio, está reconocido como un reflejo del bienestar animal ya que generalmente ocurre en contextos libres de estrés (Fagen & Fagen, 2004), e incluso se ha llegado a afirmar que su expresión sólo es posible bajo la premisa de la cobertura previa de las necesidades básicas vitales (Latour, 1981a). Esto coincidiría con la apreciación de Fagen & Fagen (1990), que relacionaban aumentos en la frecuencia de juego en osos inmaduros coincidiendo

con una mayor abundancia de alimentos. Existen numerosas hipótesis y controversia acerca de las funciones del juego *per se* en el reino animal, pero en general se le presuponen beneficios futuros que son más obvios para individuos inmaduros y para especies gregarias. Entre sus posibles beneficios destacan: el desarrollo de la fuerza y otras habilidades físicas, el desarrollo cognitivo, la adquisición de tácticas usadas en la competencia intraespecífica, o el establecimiento o estrechamiento de lazos y cohesión sociales (Bekoff & Bekoff, 1984). Las implicaciones ecológicas y evolutivas de su desempeño son aún inciertas, pero ha sido precisamente el oso pardo la especie en la que primero se ha demostrado una relación positiva entre el juego a edades tempranas y la supervivencia, tanto durante el primer año de vida (Fagen & Fagen, 2004) como en el momento de su independencia post-destete (Fagen & Fagen, 2009). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos que la desencadenan. Centrándonos en animales adultos, es necesario destacar la hipótesis de Latour (1981a), desarrollada en osos polares, que indica la posibilidad de que el juego en épocas del año con bajo nivel de competencia por recursos constituyese una táctica para valorar las habilidades físicas y de lucha de otros osos, de cara a utilizar esta información en momentos del año en los que sí se produce una intensa competencia intraespecífica. La creación de lazos sociales podría de esta manera reducir el nivel de interacciones agonísticas futuras. En el estudio llevado a cabo por Koene (1998) encontraríamos un caso similar, ya que en él se describe la adaptación de osos ciegos a un nuevo recinto, caracterizada por interacciones agonísticas decrecientes complementadas con niveles crecientes de interacciones de juego. Para estos individuos, tras una respuesta inicial agresiva a un ambiente social desconocido bajo condiciones de estrés, se habría desencadenado una cohesión y estabilidad social que permitió mayores frecuencias de patrones de comportamiento de juego, de forma que de nuevo el juego se relacionaría con la disminución del nivel de agresión en las relaciones entre osos convivientes. Montaudouin & Pape (2004) estudiaron otros factores ambientales con posibilidades de ejercer una influencia en el comportamiento de juego de osos cautivos, concluyendo que las interacciones sociales no parecían estar influenciadas por diferencias en el manejo, y que no existía relación entre estereotipias y juego.

El estudio del efecto de la estacionalidad reproductiva sobre el comportamiento de juego en el oso pardo debe por tanto tener en consideración las posibles variaciones entre cada grupo de sexo y edad. Existen varias referencias sobre cambios en la frecuencia de interacciones amistosas a lo largo del año en el oso pardo, pero sólo una incluye machos adultos. Stelmock & Frederick (1980) constataron una disminución del tiempo empleado en jugar en osos jóvenes de todas las edades en libertad al final del verano y durante el invierno, mientras que Palomero et

al. (2011) señalaron una tendencia a la disminución del mismo entre mayo y agosto, para recuperarse ligeramente en septiembre, en osos nacidos ese año. Por último, durante el estudio de Colmenares & Rivero (1983) acerca de las relaciones sociales en un grupo de osos pardos en cautividad que incluyeron 3 machos adultos y 2 machos jóvenes, se registraron juegos sociales asociados a cortejos, pero el comportamiento de juego desapareció durante el pico de actividad reproductiva (F. Colmenares, comunicación personal, 2023).

Variaciones anuales en los parámetros morfológicos y fisiológicos

El ritmo biológico anual del oso pardo se manifiesta no sólo a través de cambios en el comportamiento, sino en un amplio rango de aspectos morfológicos y fisiológicos, reflejo de cambios cíclicos en el metabolismo y de las influencias ambientales. Por ejemplo, nuevas tecnologías basadas en el uso de collares GPS, dispositivos intraabdominales e implantes subcutáneos han permitido recientemente evidenciar cambios en los ritmos biológicos de parámetros como la actividad, temperatura corporal y ritmo cardiaco en el oso pardo en función del momento del año (Thiel et al., 2022). Los parámetros sanguíneos del hemograma y bioquímica, así como algunas hormonas, también constituyen excelentes marcadores cuyas variaciones anuales han sido demostradas no sólo en osos y otras especies de mamíferos, sino también en aves, reptiles o peces.

En úrsidos, existe una extensa bibliografía al respecto, especialmente en oso pardo y oso negro americano. En ella, la atención se ha centrado tradicionalmente en la caracterización de la fisiología del letargo invernal y en demostrar diferencias entre los valores invernales y aquellos exhibidos en la fase activa de su ciclo anual. Sin embargo, aún son reducidas las referencias hacia las variaciones mostradas durante la fase activa. Durante el letargo invernal, los osos experimentan una reducción de su temperatura corporal de tan sólo de 2-5 °C, sin embargo, el nivel de disminución en el metabolismo general es similar al exhibido por especies hibernantes de menor tamaño. En los machos, la función testicular se encuentra quiescente al comienzo de la hibernación, pero se ha descrito espermatogénesis activa a partir del mes de febrero en el oso pardo (Tsubota & Kanagawa, 1989). Durante el tiempo en el que existe privación de alimentos y desaparición o reducción de gran parte de sus funciones fisiológicas los osos experimentan un metabolismo basado en la obtención de energía a partir de las grasas y deben adaptarse para equilibrar los niveles de lípidos y proteínas, así como para impedir la degeneración muscular y ósea o diversas patologías endocrinas y cardiovasculares. Los mecanismos biológicos que permiten tal nivel de adaptación son complejos y aún no se encuentran totalmente estudiados,

existiendo un campo de investigación amplio al respecto con interesantes aplicaciones en medicina humana. Tales mecanismos se manifiestan con cambios en diversos parámetros bioquímicos sanguíneos, que González-Bernardo et al. (2020) recogen en una reciente revisión bibliográfica, en la que se expone que durante el letargo invernal existen: una disminución en el peso corporal; elevados niveles de lípidos, colesterol, proteínas totales, creatinina y glucosa; y concentraciones disminuidas de urea. Asimismo, el número de plaquetas y la capacidad de agregación plaquetaria son menores que en el verano (Arinell et al., 2018). Encontramos menos datos referentes a las concentraciones de células sanguíneas que de parámetros bioquímicos en el oso pardo, pero diversos autores (Arinell et al., 2018; Græsli et al., 2015; Hissa et al., 1994) coinciden en señalar disminuciones, a veces expresada sólo como una tendencia, de los glóbulos blancos y aumentos de hematocrito, hemoglobina y contaje de eritrocitos durante los meses del invierno en oso pardo europeo. Aunque estos resultados coinciden con lo descrito para oso negro americano (Erickson & Youatt, 1961; Hellgren et al., 1989), deben ser tomados con precaución ya que, a excepción de un único oso en el estudio de Hissa et al. (1994), sólo incluyeron muestras tomadas en osos subadultos.

Las variaciones en los parámetros sanguíneos tienen un carácter multifactorial y la edad del animal, junto con la época del año en que se toma la muestra, son unos de los factores con mayor capacidad de modularlos. Además de la edad y el momento del año, en el oso pardo, algunos de los factores que deberían tenerse en cuenta a la hora de interpretar niveles de metabolitos en sangre son: el sexo y momento reproductivo (Huber et al., 1997; Jamnicky et al., 1987), el origen de los animales, bien sea cautividad o libertad, o incluso región geográfica (Huber et al., 1997); su estado nutritivo y peso (Schroeder, 1987); el método de captura (Kusak et al., 2005); el uso de medicamentos y drogas anestésicas (Schroeder, 1987); el nivel de estrés (Kusak et al., 2005); o incluso el momento del día en el que se realiza la toma de la muestra (Owen et al., 2005). En general, la mayoría de estudios que han abordado la hematología en úrsidos se han realizado con unidades de análisis a las que afectaban un elevado número de estos factores. El uso de individuos de distinto sexo, edad, origen, época del año, etc., en ocasiones combinado con pequeños tamaños muestrales, dificulta muy a menudo la interpretación de los resultados. Idealmente, cada posible factor de variación debería estudiarse por separado utilizando poblaciones homogéneas en cuanto al resto de posibles modulantes. Hasta la fecha, el análisis de hematología de oso pardo que tiene en cuenta variaciones anuales y más se acerca a ese abordaje es el expuesto por Græsli et al. (2015), cuyos resultados ya fueron comentados anteriormente, y el cual utilizó 40 osos subadultos que habitaban en libertad en Suecia. La comprensión de la influencia de esta gran variedad de elementos con capacidad para

modular los parámetros sanguíneos en el oso pardo es por tanto fundamental para el establecimiento de unos valores de referencia adecuados para la especie. Sólo así será posible demostrar desviaciones de origen patológico, nutricional o ambiental, o identificar marcadores sanguíneos de importancia en la actividad reproductiva. En este sentido, por ejemplo, en oso negro americano se ha descrito una relación entre la concentración de distintos compuestos en sangre de las osas e índices de crecimiento en sus oseznos (Noyce & Garshelis, 1994). Por su parte, en machos, esta vez de oso negro asiático, parece existir una relación entre los niveles de testosterona y el estado nutricional (Tomiyasu et al., 2021). Por tanto, en el marco de otros programas que impliquen el manejo anestésico de osos, como los orientados al uso de técnicas de reproducción asistida, la correcta interpretación de los parámetros fisiológicos posee capacidad de orientar sobre el estado, tanto de salud como reproductivo de los individuos, y por tanto evaluar la idoneidad como donantes o receptores en metodologías de biotecnología de la reproducción, así como la posibilidad de, incluso, predecir su futuro éxito reproductivo.

Variaciones anuales en el peso corporal

El cronograma biológico del oso pardo conlleva periodos de anorexia e hiperfagia y, por ende, grandes oscilaciones en la condición corporal. Para González-Bernardo et al. (2020), estas oscilaciones se dividen en tres fases: ganancia de masa muscular durante la primavera, acumulación de grasa durante la hiperfagia, y pérdida de peso durante la hibernación. Esta pérdida de peso invernal, atribuida principalmente al consumo de reservas grasas, varía entre 250 y 517 gramos al día (Hissa et al., 1998a; Watts & Jonkel, 1988), y en cómputo puede suponer alrededor del 30 - 40 % del peso corporal (Hellgren, 1995; Hilderbrand et al., 2000; Pearson & Halloran, 1972). Valores similares han sido encontrados por Hellgren (1995) para úrsidos silvestres, pero en osos cautivos encontró disminuciones menos drásticas, con un máximo del 27 %. Kingsley et al. (1983), sin embargo, diferencian entre las variaciones de peso sufridas por machos y hembras, concluyendo que las de los machos son menores, y son alrededor de un 22 % del peso corporal a cualquier edad. Por su parte, en otoño se describen aumentos de la ingesta hasta valores dobles y los reportes de ganancia de peso en el otoño también rondan el 30 – 40 % del peso corporal (Evans et al., 2012; Hissa et al., 1998a), o valores ligeramente menores (28 %) cuando se han estudiado por separado machos adultos (Kingsley et al., 1983). Encontramos también que Ligot (2019) no halló diferencias significativas en el peso corporal de osos mayores de tres años entre primavera, con mayoría de muestras entre marzo y abril, y otoño.

Existen además referencias a cambios en la actividad de alimentación en osos durante la estación reproductiva. En la Cordillera Cantábrica, se ha demostrado que los osos en celo muestran una importante disminución del tiempo dedicado a la alimentación (Fernández-Gil et

al., 2006). Esto coincide con las apreciaciones de Hornocker (1962), el cual apuntó que es raro observar alimentándose a los machos dominantes que se encuentran monopolizando una hembra. En oso polar, los machos y especialmente los que muestran actividad sexual son también más propensos a mostrar comportamiento de ayuno (Cherry et al., 2009). Este patrón no es ni mucho menos exclusivo de animales que hibernan, así por ejemplo en el reno, especie también promiscua y de comportamiento sexual estacional, se observan pérdidas de más del 30 % de la masa corporal en los machos durante el celo, y los niveles mínimos de insulina y máximos de cortisol y testosterona son coincidentes y se describen poco después del pico de máximo peso corporal (Barboza et al., 2004).

Variaciones anuales en el volumen testicular

De la misma forma que para el tamaño corporal, también existen numerosas referencias a cambios en el tamaño de los testículos en el oso pardo a lo largo del año (Erickson et al., 1968; Gomes-Alves et al., 2011; Pearson, 1975; Tsubota & Kanagawa, 1989; White et al., 2005). Todo parece señalar que los cambios experimentados en la función testicular a lo largo del año se acompañan de un ritmo cíclico en el volumen, histología, esteroidogénesis y espermatogénesis (Spady et al., 2007). En los cuatro estadios del ciclo testicular descritos por Spady et al. (2007), sólo el estadio III o “pico de función testicular” corresponde con la existencia de actividad reproductiva, en sincronización con el estro de las hembras.

Los valores máximos de tamaño o peso testicular han sido descritos para adultos de oso grizzly americano en mayo (Pearson, 1975) o en mayo y junio (Erickson et al., 1968), aunque sin especificar la realización de un análisis estadístico al respecto. Las diferencias fueron de hasta el doble del volumen testicular con respecto al exhibido en el momento máximo de regresión testicular en el invierno (Erickson et al., 1968). En oso pardo de Hokkaido, en un estudio con tan sólo cuatro animales jóvenes cautivos, se señaló un mayor tamaño testicular entre marzo y agosto en comparación con el resto del año (Tsubota & Kanagawa, 1989). De nuevo en oso grizzly, White et al. (2005) describieron valores máximos en el mes de junio, sin hacer referencia a diferencias significativas, aunque en un estudio anterior con un menor tamaño muestral no habían encontrado diferencias entre los periodos comprendidos entre mayo y mediados de julio en comparación con el periodo entre mediados de julio y noviembre (White et al., 1998). En oso pardo europeo, el tamaño y masa testiculares fueron significativamente mayores en primavera que en otoño (Ligot, 2019). La idea generalizada es que existe un ciclo que incluye recrudescencia y regresión, con máximos de tamaño y función testicular durante la época reproductiva. Si nos centramos en la evolución de la morfología testicular dentro de la época reproductiva, en los osos del Parque de Cabárceno, un estudio preliminar ya señaló variaciones

entre febrero y agosto a pesar de su muy reducido tamaño muestral ($N = 6$) (Gomes-Alves et al., 2011). Existen también antecedentes en otras especies de úrsidos, concretamente en oso negro asiático (Okano et al., 2009) y oso panda (Aitken-Palmer et al., 2012). En ambas especies, la época reproductiva fue dividida en dos o tres partes, respectivamente, y no se encontraron diferencias en el volumen testicular entre ellas. Se debe tener en cuenta, además, que otros factores como la edad o tamaño corporal han sido correlacionados positivamente con la masa testicular en el oso pardo (White et al., 1998). Del mismo modo, se ha descrito previamente una relación entre el volumen testicular y la hormona testosterona en oso pardo (Gomes-Alves et al., 2011) y en oso negro americano (Horan et al., 1993). También en oso negro americano, Garshelis & Hellgren (1994) encontraron diferencias en la evolución del tamaño testicular entre dos poblaciones geográficamente separadas con distintas latitudes. Ya que la latitud ha demostrado ser un factor modulante en la cronología del comportamiento reproductivo en el oso pardo (González-Bernardo et al., 2020), podría sugerirse la duración o intensidad de la época reproductiva como determinante en la evolución del volumen testicular. Para demostrar tal hipótesis, sería necesaria la delimitación de la época reproductiva y sus características en relación a la evolución del tamaño testicular en una misma población de oso pardo.

Variaciones anuales en la testosterona

La caracterización del ritmo endógeno de las hormonas esteroideas, como los esteroides sexuales y los corticoides, es fundamental para poder comprender los cambios asociados a la función reproductiva en los machos.

La testosterona es el principal esteroide sexual en los machos, y como tal, en el oso pardo experimenta cambios cíclicos que acompañan al ritmo anual en el comportamiento reproductivo y el desarrollo testicular. La testosterona tiene el potencial de desempeñar un papel clave no sólo en la reproducción, sino también en la regulación de aspectos sociales y fisiológicos muy variados. En otras especies, es capaz de modular el comportamiento agresivo e incluso la estructura social (Giammanco et al., 2004), así como muy diversos aspectos de la fisiología y homeostasis corporal, habiéndose demostrado en el ser humano su influencia en procesos tan dispares como la eritropoyesis o los niveles de otras hormonas no reproductivas como la insulina y la leptina (Lee et al., 2022; Simon et al., 2001). En úrsidos, se ha sugerido que aumentos de la testosterona detectados durante la hibernación podrían tener funciones no relacionadas con la reproducción (Hellgren, 1995) y que el marcaje de los machos de oso pardo podría ser un comportamiento mediado por la testosterona (Tomiyasu et al., 2018). El fotoperiodo es el factor más frecuentemente sugerido como determinante de los cambios anuales en la testosterona en el oso pardo, aunque también existe la teoría de que, en cualquier

especie, los niveles de testosterona se pueden ver incrementados cuando se exhibe comportamiento de defensa de hembras con fines reproductivos como resultado de la competición entre machos (Goymann et al., 2003). El papel de la exposición a las hembras no debe ser menospreciado en una especie que muestra ocasionalmente comportamiento de monta fuera de su época reproductiva tradicional, especialmente si tenemos en cuenta que en oso panda el acceso a hembras en celo fuera de la época reproductiva se correlaciona con aumentos de la testosterona en orina (Gocinski et al., 2018). La edad también puede influir en las concentraciones de hormonas, hasta el punto de que en el oso pardo la edad ha podido ser estimada a partir de las concentraciones de cuatro hormonas distintas entre las que se encontraba la testosterona utilizando muestras de pelo (Cattet et al., 2018). Sin embargo, en oso negro asiático, Tomiyasu et al. (2021) estudiaron una posible relación de la testosterona plasmática con el momento del año, el momento de muestreo, el índice de condición corporal, la circunferencia de la cabeza y la edad, concluyendo que sólo existía una asociación, positiva, con la condición corporal. Por su parte, Bryan et al. (2014) encontraron una asociación negativa de la disponibilidad de alimento y los niveles de testosterona en pelo, la cual posiblemente sea reflejo de cambios sociales asociados.

Numerosos estudios previos avalan una ciclicidad anual de la testosterona en el oso pardo con niveles basales durante gran parte de su fase activa y un pico de concentración de la hormona que sucede más frecuentemente en los meses de primavera. En oso grizzly, este máximo de testosterona sanguínea se ha descrito en mayo y junio en un estudio en el que sólo se incluyeron muestras a partir de mayo (White et al., 2005), mientras que la testosterona medida en pelo fue mayor entre finales de marzo y abril (Cattet et al., 2017). En oso pardo de Hokkaido, un estudio con 4 osos adultos mostró valores máximos en abril y mayo (Tsubota & Kanagawa, 1989), pero posteriormente Tomiyasu et al. (2018) describieron aumentos significativos en el periodo delimitado entre abril y junio en la misma subespecie. Finalmente, en la población de osos pardos de Cabárceno existen experiencias previas que han aportado información sobre la evolución de la concentración de testosterona sérica (T) en los machos. Tras un análisis preliminar (Gomes-Alves et al., 2011) con tamaño muestral muy bajo (N = 6), un posterior estudio de Anel-López et al. (2017b) incluyeron un tamaño muestral mucho mayor y un análisis por quincenas. Los machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno mostraron mayores niveles de testosterona en los meses de abril y mayo.

Variaciones anuales en el cortisol

Por otro lado, el cortisol se constituye habitualmente como el principal glucocorticoide mediador en la respuesta del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal en mamíferos. La función del

eje hipotálamo-hipofisario-adrenal es activarse ante la presencia de un estímulo estresante para el animal, iniciando una cascada neuroendocrina que culmina con la liberación de glucocorticoides por parte de la corteza adrenal, los cuales proporcionan al animal los recursos necesarios para generar una respuesta adaptativa a dicho agente estresante. Se trata de una respuesta evolutiva fundamental para hacer frente a cambios en el ambiente; sin embargo, la extensión en el tiempo de elevados niveles de glucocorticoides circulantes puede suponer importantes efectos perjudiciales a nivel fisiológico caracterizados por disminuciones en el crecimiento, en la función reproductiva e inmunosupresión. Por ello, el análisis de los niveles de cortisol ha sido tradicionalmente usado como uno de los métodos para evaluar el nivel de estrés y bienestar animal. Las muestras biológicas utilizadas para tal fin en mamíferos han sido más frecuentemente los componentes sanguíneos suero y plasma, la orina, heces o saliva, pero en los últimos años comienza a cobrar importancia el uso del pelo como sustrato indicador de los niveles del cortisol ya que constituye un medio *a priori* no influenciado por variaciones agudas en los niveles de estrés. Además de los niveles de estrés, otros factores han sido demostrados como modulantes de las concentraciones del cortisol en el oso pardo en diferentes muestras biológicas, tales como: el momento del día (Ware et al., 2013), el método de captura (Lindsjö, 2010; Macbeth et al., 2010), el método de muestreo (Macbeth et al., 2010) o factores nutricionales (Bryan et al., 2013; Bryan et al., 2014). En guepardos, incluso, se ha observado un aumento de cortisol asociado al uso de técnicas de electroeyaculación (Wildt et al., 1984). Una posible relación del cortisol con la región geográfica, la densidad poblacional, edad o sexo han sido rechazadas en el oso pardo (Bryan et al., 2013; Graesli et al., 2014; Lindsjö, 2010; Macbeth et al., 2010). Sin embargo, se ha descrito una correlación del cortisol con las hormonas esteroideas testosterona, progesterona y estradiol medidas en pelo (Cattet et al., 2017). La época del año es un factor para el que se han obtenido distintos resultados. Inicialmente, como especie hibernante cabría esperar un aumento de los glucocorticoides previo al letargo invernal (Hissa et al., 1998a). Sin embargo, Lindsjö (2010) no encontró diferencias entre marzo y noviembre, de la misma forma que Græsli et al. (2015) tampoco lo hicieron entre febrero y junio en osos subadultos. Ware et al. (2013), por su parte, no identificaron ningún efecto de la estacionalidad en machos, pero sí en hembras. Finalmente, Von Der Ohe et al. (2004) señalaron diferencias entre junio y septiembre en la concentración de cortisol dependientes del tipo de dieta. En otros úrsidos, no obstante, es más común que se identifiquen patrones de variaciones anuales en el cortisol (Harlow et al., 1990; Hellgren et al., 1993; Kersey et al., 2010; MacDonald et al., 2006; Owen et al., 2005; Palumbo et al., 1983). La mayoría de ellos coincide en señalar bajos niveles durante el verano, tanto en oso negro americano (Harlow et al., 1990; Hellgren et al., 1993; Palumbo et al., 1983) como en oso panda (MacDonald et al., 2006; Owen et al., 2005).

Variaciones anuales en el hemograma

Las variaciones de la composición celular de la sangre durante el periodo activo se encuentran mucho menos estudiadas que aquellas que comparan entre osos pardos activos y durante su letargo invernal. No obstante, se han descrito significativamente mayores valores de hematocrito (Græsli et al., 2015; Pearson & Halloran, 1972), hemoglobina (Græsli et al., 2015) y concentración de eritrocitos (Pearson & Halloran, 1972) durante la primavera en comparación con el verano. En el otoño, cuando la viscosidad de la sangre parece ser mayor que en primavera (Halikas & Bowers, 1972), el hematocrito (Hissa et al., 1994), concentración de glóbulos rojos (Hissa et al., 1994; Pearson & Halloran, 1972) y hemoglobina (Pearson & Halloran, 1972) tienden a aumentar en un pequeño número de animales muestreados, pero estudios con un mayor tamaño muestral serían necesarios para corroborarlo. Hellgren et al. (1989) realizaron un análisis más extenso en oso negro americano, en el que, dividiendo el año natural en 6 periodos diferentes, se encontraron variaciones para los tres parámetros, con los valores mínimos para machos entre junio y el 19 de agosto, y los mayores entre mediados de noviembre y mediados de enero. En cuanto a la concentración plaquetas en sangre, existen escasas referencias al respecto: Hissa et al. (1994) afirmaron no encontrar tendencias marcadas estudiando 6 osos subadultos y un adulto, y Arinell et al. (2018), también en subadultos, analizaron sólo diferencias con el periodo hibernatorio, en el cual se describió una trombocitopenia estadísticamente significativa.

Durante la fase activa del ciclo anual, la concentración en sangre de células sanguíneas de la serie blanca también experimenta variaciones en los úrsidos. Existe evidencia de mayores recuentos totales de glóbulos blancos desde la primavera al otoño en oso pardo americano (Pearson & Halloran, 1972) y oso negro americano (Seal et al., 1967). Mientras que Seal et al. (1967) sólo compararon datos de abril y de noviembre, Pearson & Halloran (1972) incluyeron muestras desde abril hasta octubre, describiendo además una leucocitosis de tipo neutrofílico con desviación a la izquierda durante el verano. Karjalainen et al. (1995), por su parte, se centraron en describir posibles cambios en los glóbulos blancos mononucleares, de forma que no se encontraron variaciones anuales en los linfocitos ni en los monocitos durante la fase activa en el oso pardo. Sin embargo, Kusak et al. (2005), utilizando un tamaño muestral mucho mayor, describieron recuentos de linfocitos mayores durante el verano y otoño en comparación con la primavera y verano.

Variaciones anuales en la bioquímica sanguínea

El metabolismo proteico, lipídico y de los hidratos de carbono refleja también las variaciones anuales en las funciones biológicas del oso pardo. Esto reviste una especial importancia en una

especie con reproducción estacional como el oso pardo ya que se ha demostrado que, en los machos, diversos parámetros bioquímicos juegan un papel potencialmente crucial para la reproducción, participando en la producción de hormonas sexuales o en diversos aspectos de la espermatogénesis (Akpovi et al., 2015).

Históricamente, la fisiología de los compuestos nitrogenados durante la hibernación, especialmente la urea y la creatinina, ha despertado un gran interés científico orientado a la comprensión, en ausencia de expulsión de orina ni heces, del mantenimiento de la masa muscular y el equilibrio de los productos nitrogenados generados catabólicamente durante el letargo invernal. Varios autores han detectado también cambios intraanuales en otros compuestos como la haptoglobina (Mominoki et al., 2005) o distintos aminoácidos (Hissa et al., 1998b; Stenvinkel et al., 2013). Las diferencias en el nivel de proteínas totales, como marcador del metabolismo proteico, han sido estudiadas también durante la fase activa, con distintos resultados. Por un lado, Græsli et al. (2015) encontraron niveles estadísticamente mayores durante febrero y marzo comparados con los obtenidos entre abril y junio, y Schroeder (1987) encontró que, en oso negro, existían diferencias anuales con máximos en primavera. Sin embargo, otros estudios no detectaron diferencias (Halloran & Pearson, 1972; Hissa et al., 1994). Algunos de los factores que se pueden relacionar con cambios séricos en el nivel de proteínas son la deshidratación, el ayuno prolongado o la condición corporal. A este respecto, en oso polar se ha descrito que los valores sanguíneos de proteínas totales son mayores en individuos obesos (Tryland et al., 2002).

Los compuestos lipídicos también han sido objeto de una especial atención por su papel en el metabolismo energético y mantenimiento de la homeostasis durante el invierno. Está generalmente aceptado que existen aumentos de lípidos y de colesterol durante la hibernación tanto en oso pardo como negro americano (Arinell et al., 2012; Chauhan et al., 2002; Græsli et al., 2015; Hellgren, 1995; Sommer et al., 2016; Stenvinkel et al., 2013). Incluso en el oso bezudo, que no experimenta torpor invernal, los valores de colesterol son mayores en invierno (Shanmugam et al., 2011). Las referencias a diferencias en los niveles de colesterol durante la fase activa son muy escasas, a pesar de ser necesario en los machos para la espermatogénesis por su participación en la producción de testosterona y en el desarrollo de los espermatozoides. En oso pardo, tan sólo encontramos que Græsli et al. (2015) compararon el colesterol sanguíneo entre la primavera y el verano, sin encontrar diferencias significativas. En la ardilla terrestre, especie hibernante en la que los niveles de colesterol también se incrementan durante el invierno, el colesterol sanguíneo ha resultado ser del mismo modo similar en primavera y verano, mostrando una tendencia a aumentar durante el otoño (Otis et al., 2011).

La glucosa también ha demostrado previamente ser un elemento con gran variabilidad anual en la sangre del oso pardo, al menos cuando se comparan valores de osos activos y en fase de hibernación (Evans et al., 2012; Stenvinkel et al., 2013). Se trata de un parámetro que potencialmente puede verse afectado por numerosos factores, entre los que se encuentran, además del momento del año: la edad, la dieta, las condiciones ambientales y el manejo, los ritmos circadianos, el estrés, el nivel de actividad física o incluso el momento de la anestesia. El efecto de este último factor se encuentra bien documentado en oso pardo europeo, donde se ha demostrado que los niveles de glucosa son menores al comienzo del evento anestésico en anestésias en las que se utilizan tiletamina, zolacepam y medetomidina como agentes inductores (Evans et al., 2012; Fahlman et al., 2011). En oso negro, los niveles de glucosa han sido correlacionados positivamente con el peso corporal (Schroeder, 1987). La influencia de la reproducción en los niveles de glucosa en sangre no se encuentra bien documentada y podría variar entre especies, en función de numerosos factores intrínsecos, así como de los cambios en el metabolismo y en la homeostasis endocrina asociados a la actividad reproductiva. De esta forma, sería posible que se viese incrementada durante la época reproductiva, al corresponder con un momento de elevada demanda metabólica y actividad física. En el oso pardo, las referencias a variaciones en los niveles de glucosa durante la fase activa son muy limitadas. Encontramos únicamente la descripción de un aumento significativo de glucosa en el verano con respecto a la primavera en oso pardo americano (Halloran & Pearson, 1972), pero, por el contrario, Græsli et al. (2015) refirieron valores mayores durante el invierno y la primavera con respecto al verano en subadultos de la subespecie europea. Insulina y glucagón, principales hormonas responsables del metabolismo glucídico, no tuvieron diferencias estacionales en osos negros muestreados en el verano, el otoño y la hibernación, aunque los valores máximos sucedieron en el otoño (Palumbo et al., 1983).

En resumen, los conocimientos acerca de la repercusión del ritmo biológico anual del oso pardo en su fisiología son hasta ahora dispersos y fundamentalmente concentrados en la comparación de la hibernación con la fase activa. Sin embargo, la influencia de la función reproductiva también conlleva importantes variaciones en numerosos aspectos etológicos, físicos y metabólicos. Su identificación es clave para describir la estacionalidad reproductiva en la especie desde un punto de vista integrado y aplicado al diseño de estrategias de conservación y utilización de gametos gracias al desarrollo de bancos de germoplasma. Para hacer frente a este reto, es necesaria la realización de futuros estudios por sexo y edad, ya que tales factores han demostrado ser una fuente de variación en una importante parte de los parámetros estudiados hasta el momento.

3.2.3. Calidad seminal

Un banco de recursos genéticos para el oso pardo

Los bancos de germoplasma suponen una herramienta de incalculable valor ante la pérdida de diversidad genética que experimentan especies como el oso pardo, pero existen dificultades metodológicas para su creación y para el uso de sus recursos en técnicas de reproducción asistida derivados principalmente de la necesidad de protocolos adaptados a las particularidades de cada especie (Fickel et al., 2007). La inseminación artificial en el oso pardo, en concreto, necesita la comprensión previa de la fisiología sexual en el macho, la calidad espermática, los métodos de preservación seminal, así como otros aspectos del ciclo sexual en la hembra y de los protocolos de inseminación (Anel et al., 2008). Respecto a las características seminales, en los últimos años se han dedicado grandes esfuerzos a la optimización de la criopreservación espermática en el oso pardo, sin embargo, aún hoy son muy escasos los conocimientos acerca de los factores que determinan la calidad de su producción seminal. Su comprensión, además de arrojar luz acerca de los factores que afectan al éxito reproductivo de la monta natural, servirá para elegir, siempre que sea posible, candidatos y momentos apropiados para la obtención de material seminal con destino a ser preservado en bancos de recursos genéticos y, cuando esta elección no sea factible, permitirá predecir la calidad de los gametos obtenidos de osos anestesiados por diferentes causas.

El primer paso a la hora de almacenar células germinales masculinas es su obtención. Existen dos fuentes principales de gametos masculinos para la creación de bancos de recursos genéticos: espermatozoides de origen epididimario y eyaculados. La posibilidad de obtener espermatozoides del epidídimo resulta una opción de inestimable valor debido a su aplicación post-mortem y por tanto a que significa poder tener acceso a la genética de individuos de especial interés cuya vida reproductiva ha llegado a su fin (muerte, discapacidad física, etc..). Por ello, se han realizado varios ensayos sobre congelación de espermatozoides de origen epididimario obtenidos post-mortem de un oso pardo autóctono de la población cantábrica (Anel et al., 1999; Anel et al., 2011). La técnica de elección para la obtención de espermatozoides en animales silvestres *in vivo* es la electroeyaculación. Tras unas primeras experiencias utilizando la electroeyaculación en oso pardo de la subespecie Hokkaido (*Ursus arctos yesoensis*) (Ishikawa et al., 1998; Ishikawa et al., 2002) y el caso anecdótico de una única extracción seminal en un zoo europeo (Knauf et al., 2002), el grupo de investigación Itra-ULE de la Universidad de León ha liderado un extenso proyecto de investigación utilizando osos pardos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno y espermatozoides epididimarios procedentes de la población autóctona de la Cordillera Cantábrica. La numerosa información generada al respecto configura

al oso pardo como modelo para otras especies de osos o incluso carnívoros en la preservación de gametos masculinos. Inicialmente, los principales problemas identificados respecto a muestras en fresco obtenidas mediante electroeyaculación fueron aspectos relacionados con la anestesia, la urospermia, la espermaglutinación y la estacionalidad (Anel et al., 2008). El elevado valor biológico de las células a obtener demandaba la optimización de los protocolos con el fin de mejorar las características de las muestras en estos aspectos, y en consecuencia mejorar también las características del semen posteriormente descongelado. En primer lugar, se llevó a cabo la adaptación del protocolo anestésico y de electroeyaculación, incluyendo una cateterización vesical y la recolección fraccionada de los eyaculados para minimizar la contaminación con orina, así como el uso de diluyentes que redujeron el fenómeno de aglutinación espermática (Anel et al., 2008). El efecto de la estacionalidad, por su parte, fue controlado en posteriores estudios con la restricción del momento de muestreo a la época en la que los osos exhiben comportamiento sexual; sin embargo, hasta la fecha son escasos los estudios relativos a los posibles cambios en las características seminales dentro de dicha época reproductiva.

El protocolo de criopreservación para los eyaculados de oso pardo procedentes de electroeyaculación, ha experimentado numerosas mejoras que incluyen la optimización:

- de la composición del diluyente, mediante el uso de distintos medios de congelación (Anel et al., 2010; Gomes-Alves et al., 2014a; Nicolás et al., 2011), mediante el uso de aditivos, como antioxidantes (Álvarez-Rodríguez et al., 2013b) y proteínas de estrés térmico (Álvarez-Rodríguez et al., 2013a); o de la optimización del protocolo de adición del crioprotector glicerol (Álvarez-Rodríguez et al., 2011; de Paz et al., 2012)
- del protocolo de centrifugación (Álvarez-Rodríguez et al., 2016; Anel-López et al., 2017a; Nicolás et al., 2012a; Nicolás et al., 2012b)
- de los protocolos térmicos de congelación (López-Urueña et al., 2014a; López-Urueña et al., 2014b)
- del uso de técnicas para la recuperación de espermatozoides en muestras urospermicas (Gomes-Alves et al., 2014b), y
- del método de criopreservación para adaptarlo a la aplicación diferida en el tiempo de técnicas de mejora espermática (por ejemplo sex-sorting), mediante la utilización de la recongelación (Álvarez-Rodríguez et al., 2013c) o de almacenamiento precongelación a largo plazo de los eyaculados (López-Urueña et al., 2016; López-Urueña et al., 2015).

Las mejoras obtenidas se centran en preservar gametos masculinos en las condiciones más favorables para su conservación y posterior utilización, desde la perspectiva del elevado valor biológico de las muestras. Sin embargo, se han publicado escasos datos sobre las características del semen en fresco y sus factores de variación, los cuales son la base para realizar de forma precisa el diseño experimental de donaciones programadas que permita obtener la materia prima de mayor calidad para los bancos de recursos genéticos.

Los datos inicialmente aportados para oso pardo de Hokkaido sobre eyaculados frescos de oso pardo procedentes de electroeyaculación indicaban los siguientes valores (media \pm SEM): volumen ($2,7 \pm 2,6$ ml), concentración espermática ($471,6 \pm 429,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL), pH ($7,4 \pm 0,3$), porcentaje de espermatozoides móviles ($80,2 \pm 23,6$ %), porcentaje de espermatozoides vivos ($89,7 \pm 5,3$ %), y porcentaje de formas pleomórficas ($21,8 \pm 11,7$ %) (Ishikawa et al., 1998). Sin embargo, en este estudio preliminar ya se apuntaba a una considerable variación individual en las características seminales que merecía ser objeto de estudio. En trabajos realizados en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno, se han completado los análisis realizados en semen fresco de oso pardo con técnicas avanzadas como la citometría de flujo y el análisis computerizado de la movilidad espermática, ofreciendo de esta manera una información más precisa sobre la fisiología espermática y el potencial de los eyaculados para la fecundación. De entre estos estudios, Álvarez et al. (2012) presentaron, sobre un mayor tamaño muestral ($N = 131$), valores en el eyaculado para, entre otros, los siguientes parámetros: volumen ($2,1 \pm 0,1$ mL), concentración ($228,9 \pm 24,9$ espermatozoides $\times 10^6$ /mL), pH ($8,2 \pm 0,3$), osmolalidad ($294,4 \pm 2,6$ mOsm/kg), espermatozoides móviles totales (MI) ($74,1 \pm 1,7$ %), espermatozoides con movimiento progresivo (MP) ($42,7 \pm 1,8$ %), velocidad media (VAP) ($99,8 \pm 2,7$ μ m/s), espermatozoides con cromosomas dañados (dACRO (PNA+)) ($3,7 \pm 0,5$ %), y espermatozoides viables (VIAB) ($74 \pm 13,7$ %). También han sido objeto de análisis en el semen fresco la morfología de la cabeza de los espermatozoides de oso pardo (Álvarez et al., 2008), la condensación de su cromatina (Álvarez et al., 2008; García-Macías et al., 2006), y la composición de su plasma seminal (Álvarez et al., 2012; Anel-López et al., 2017b).

No obstante, no existen estudios sobre el análisis de los factores determinantes de las diferencias individuales en las características del semen, aspecto clave para comprender el éxito reproductivo de cada individuo y por tanto su aportación a la dinámica evolutiva de la especie, así como para estandarizar los protocolos de actuación (por ejemplo, la planificación de la recogida de eyaculados) en el ámbito de los bancos de recursos genéticos.

Calidad seminal y éxito reproductivo

Aunque su papel en la posibilidad de que se produzca la fecundación es innegable, las características del semen, que en última instancia modularán la calidad espermática y seminal, no son el único factor determinante del éxito reproductivo. En términos generales, en la reproducción sexual el éxito reproductivo implica tres niveles de selección sexual (Birkhead & Pizzari, 2002): una selección sexual anterior a la cópula (fundamentalmente competición entre machos y elección de pareja sexual por parte de la hembra), una selección sexual posterior a la cópula y anterior a la fertilización (competición espermática) y una selección sexual posterior a la fecundación (aspectos relacionados con la respuesta de la hembra e infanticidio dirigido sexualmente).

En el oso pardo, especie caracterizada por ser polígama para ambos sexos, no haber sido objeto de estudios de fertilidad *in vivo*, y mostrar comportamiento de infanticidio y complejos mecanismos fisiológicos en las hembras, el peso específico de cada uno de los tres niveles de selección sexual en el éxito reproductivo de los machos resulta difícil de determinar y aún debe ser intensamente analizado. Sin embargo, aunque no comprendemos totalmente sus determinantes, sí disponemos de datos sobre los resultados de éxito reproductivo de machos en forma de numerosos estudios de parentesco (Bellemain et al., 2006b; Craighead et al., 1995b; Cronin et al., 2005; De Barba et al., 2010; Kuduk et al., 2014; Morehouse et al., 2021; Palazón et al., 2012; Shimozuru et al., 2020; Zedrosser et al., 2007). Podemos, por tanto, usar en este caso el éxito reproductivo individual como medida global de la selección sexual a todos sus niveles. Para los machos de oso pardo, al contrario que en especies con sistemas reproductivos monógamos, las diferencias entre el número de crías engendradas pueden ser muy elevadas de un individuo a otro y mayores que para las hembras. La evaluación de la aportación de cada macho a la genética de las poblaciones futuras es de vital importancia para la dinámica poblacional e incluso para orientar futuros proyectos de reintroducción en poblaciones gravemente amenazadas. Un éxito reproductivo individual sesgado hacia ciertos individuos ha sido descrito con relativa frecuencia pero generalmente en poblaciones con un bajo número de machos (Cronin et al., 2005; De Barba et al., 2010; Palazón et al., 2012; Zedrosser et al., 2007), mientras que otros autores describen que el número de oseznos por individuo se distribuye de forma más o menos equitativa (Craighead et al., 1995b; Shimozuru et al., 2020). Estos reportes existentes acerca de ciertas formas de monopolio sexual cobran una especial relevancia ya que afectan a poblaciones amenazadas como la de los Pirineos (Palazón et al., 2012), los Alpes (De Barba et al., 2010), o la región de Prudhoe Bay en Alaska (Cronin et al., 2005). Cronin et al. (2005) asignaron paternidad de 40 machos a 13 oseznos, siendo un único macho el padre de 8 de los

oseznos (62 %). En el norte de Italia, un único macho fue el padre de todos los oseznos nacidos durante 4 años, aunque debe puntualizarse que sólo existía otro macho en el área cuya edad fue entre 3 y 6 años durante ese periodo (De Barba et al., 2010). En los Pirineos, el 75 % de los oseznos producidos en 15 años fueron engendrados por el mismo macho, a pesar de la presencia de, como mínimo, otros dos machos adultos (Palazón et al., 2012). Aunque las características demográficas de tales poblaciones deben ser tenidas en consideración, las causas del elevado éxito reproductivo de individuos concretos merecen ser estudiadas en profundidad debido a sus implicaciones ecológicas a nivel poblacional.

La edad es un factor habitualmente analizado en relación al éxito reproductivo de los machos, siendo osos de edad intermedia (9-18 años para Craighead et al. (1995b) y 10-14 años para Shimozuru et al. (2020)) los que más probabilidades tienen de ser padres. Incluso, en osos escandinavos se ha podido demostrar que los individuos que consiguen reproducirse tienen mayor edad que aquellos que no lo consiguen (Bellemain et al., 2006b; Zedrosser et al., 2007). Para osos polares, un rango similar de edad parece ser indicativo de superioridad reproductiva en machos, concretamente entre 11 y 17 años (Richardson et al., 2020). Al igual que sucede en oso polar, un mayor tamaño corporal también se asocia al éxito reproductivo en oso pardo escandinavo (Bellemain et al., 2006b; Zedrosser et al., 2007), población en la cual a su vez edad y tamaño corporal se encuentran fuertemente correlacionados (Bellemain et al., 2006b). Otros factores que han demostrado una relación positiva con el éxito reproductivo en el oso pardo macho han sido la frecuencia del comportamiento de marcaje (Morehouse et al., 2021) o la densidad poblacional (Zedrosser et al., 2007). La existencia de una relación de parentesco entre el macho y la hembra no parece relacionarse con mayor o menor éxito reproductivo, mientras que la distancia entre sus rangos de distribución ejerce una influencia negativa (Bellemain et al., 2006b). Diferentes resultados han sido obtenidos al estudiar distintas características genéticas del macho (Bellemain et al., 2006b; Kuduk et al., 2014; Zedrosser et al., 2007).

Factores pre-copulatorios del éxito reproductivo

Centrándonos en la selección sexual anterior a la cópula o pre-copulatoria, varios puntos de vista deben ser tenidos en cuenta, comenzando por la competición entre machos, y siguiendo por la elección de pareja sexual, tanto por parte del macho como de la hembra.

La intensidad de la competencia entre machos desde el punto de vista pre-copulatorio, apoyada por el manifiesto dimorfismo sexual propio de la especie, se ve reflejada en la existencia de heridas frecuentes en los machos causadas por interacciones agresivas intraespecíficas durante la época reproductiva. Esta competición se encuentra íntimamente ligada a la estructura social y a las relaciones de dominancia establecidas entre los machos. Hipotéticamente, el estatus

social no sólo tendría la capacidad de influir en el acceso a un mayor número de hembras, sino que podría dar lugar a diferentes estrategias sexuales en función de la presencia de otros machos y de la situación concreta de cada individuo en el orden social en cuanto al acceso a las hembras. En general, se asume un acceso preferente a las hembras por parte de los machos dominantes de la población. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha establecido una relación positiva entre el grado de dominancia individual, demostrada objetivamente, con el acceso a las hembras en oso pardo. Las únicas referencias al respecto corresponden con estudios llevados a cabo en Yellowstone y en ellos no se encontró una relación positiva lineal entre la frecuencia de monta y el estatus de dominancia (Craighead et al., 1995a; Hornocker, 1962). Craighead et al. (1995a) compararon el comportamiento reproductivo en los 4 estratos sociales definidos en su estudio para los machos, de manera que el éxito en el comportamiento de monta resultó ser menor para el último estrato jerárquico, es decir, los individuos del nivel más subordinado, mientras que éste alcanzó su máxima expresión en el tercer estrato, con frecuencias de monta por encima de las exhibidas por los machos situados en la cúspide de la pirámide jerárquica. De la misma manera, Hornocker (1962) encontró que los individuos dominantes no dominaron la reproducción, ya que existieron ratios de monta menores en los dos machos más dominantes con respecto al siguiente estrato jerárquico de la población.

La falta de evidencia científica en la relación entre superioridad en los machos y número de montas no excluye que estos individuos puedan tener un mayor éxito en otros aspectos precopulatorios con posibilidad de influir en el éxito reproductivo. Las especiales características del celo de las hembras hacen que el momento del ciclo en el que se producen las montas pueda tener una gran influencia sobre la probabilidad de fecundación y por tanto de que un macho produzca un mayor número de crías. Así, el acceso preferente de los machos a las hembras en sus momentos más fértiles podría ser un factor incluso más importante que el número de montas. En este sentido, encontramos la posibilidad de que los machos pudiesen monopolizar a una hembra durante todo su ciclo o incluso detectar la cercanía del momento de la ovulación de la osa y elegir el momento de copula en base a él. La defensa de hembras en celo durante largos periodos de tiempo, en detrimento de la búsqueda de otras compañeras sexuales, ha sido mencionada en la literatura y avalaría esta teoría (Craighead et al., 1995a; Hamer & Herrero, 1990; Hornocker, 1962). De hecho, Hornocker (1962) afirmó que sólo los dos machos más dominantes de su población exhibieron este tipo de comportamiento, y que además el macho dominante, durante dos años consecutivos, sólo se vio interesado sexualmente por una hembra en cada época reproductiva. En consecuencia, los machos subordinados se verían obligados a adaptar sus estrategias sexuales, de manera que obtendrían montas en momentos en los que

otros individuos de escala jerárquica superior no se encontrasen defendiendo a las hembras, como por ejemplo cuando estuviesen ocupados en interacciones agresivas o al final del ciclo estral (Craighead et al., 1995a). Otros factores que pueden contribuir a que un macho dominante tenga acceso a un mayor número de hembras receptivas serían la densidad y características demográficas poblacionales, o la sincronía de los estros (Craighead et al., 1995a). La elección de pareja sexual en cada momento de la época reproductiva podría asimismo ser una estrategia reproductiva no sólo para los machos sino también para las hembras en el oso pardo. En el Reino Animal, las preferencias de las hembras no tienen por qué coincidir con el resultado de la competición entre machos, e incluso pueden ser contrarios (Qvarnström & Forsgren, 1998). En nuestro caso, el hecho de que las hembras pudiesen evitar o facilitar el comportamiento de cópula con ciertos machos en cada momento del ciclo, especialmente en una especie con ovulación inducida, significaría que las hembras tendrían control sobre la paternidad de sus camadas y por tanto esto implicaría cambios en la probabilidad de éxito reproductivo en los machos. De hecho, el estudio llevado a cabo por Bellemain et al. (2006b) aborda la importancia de la selección de pareja sexual desde este punto de vista, ya que interpreta los resultados de paternidad como un efecto de la selección pre-copulatoria por parte de las hembras. Aunque la selección de pareja sexual en ambos sexos es uno de los aspectos de la biología reproductiva del oso pardo más desconocidos, resulta evidente que la superioridad genética del padre de la camada implica ventajas en la supervivencia de los oseznos. La compatibilidad genética entre ambos progenitores también ha sido debatida como factor determinante a la hora de elegir pareja sexual en el oso pardo (Kuduk et al., 2014).

Factores post-copulatorios del éxito reproductivo

Una vez se produce la cópula, otros factores entran en juego a la hora de determinar el rendimiento reproductivo que tendrá cada macho, reflejo del número de descendientes que acumulará a lo largo de su vida y por tanto de su contribución al futuro de la especie. En este sentido, Bellemain et al. (2006b) ya describieron cómo, incluso en machos probados como sementales, la participación en una monta no siempre garantiza la producción de uno o varios oseznos. En especies en las que las hembras son promiscuas, como el oso pardo, esta fase adquiere implicaciones biológicas significativas. Aunque el papel post-copulatorio de la hembra puede una vez más ser significativo, manifestado por la posibilidad tanto de influenciar el éxito en la fertilización como de la existencia de selección sexual posterior a la fecundación, estas estrategias resultan complejas y de difícil estudio (Birkhead & Pizzari, 2002). Si nos centramos nuevamente en la aportación del sexo masculino, la competencia entre machos tras la monta comprende principalmente la competición espermática y el infanticidio dirigido sexualmente

(Steyaert et al., 2012). La competición espermática adquiere una especial trascendencia debido a las características del sistema reproductivo del oso pardo, especie caracterizada por su promiscuidad, por una ovulación inducida y por presentar significativos índices de paternidad múltiple. Ante la posibilidad de una intensa selección sexual pre-copulatoria en ambos sexos, unas características seminales que confiriesen superioridad en la competición espermática significarían ventajas evidentes para los machos con menos oportunidades de acceso a las hembras.

En especies como el oso pardo, en las que la inseminación artificial no se encuentra debidamente desarrollada y estandarizada, el análisis de las características seminales constituye la alternativa para la evaluación de la fertilidad masculina debido a la imposibilidad de realizar estudios de fertilidad *in vivo*. No obstante, hasta la fecha no existe un único parámetro seminal marcador de fertilidad, y la mayoría de métodos de análisis no han demostrado una fuerte correlación con la capacidad de fertilización (Gillan et al., 2005). Es por ello que, para poder aproximarnos a comprender la fisiología y funcionalidad de los gametos masculinos, necesitamos el uso conjunto de biomarcadores seminales variados, no sólo en forma de parámetros más tradicionales relacionados con la cuantificación seminal y espermática o con la movilidad, sino también recurriendo a parámetros que necesitan el uso de técnicas de citometría de flujo las cuales se valen de marcadores fluorescentes para determinar aspectos como la viabilidad, el estado acrosomal o la actividad mitocondrial (Martínez-Pastor et al., 2010).

Factores que influyen sobre las características seminales

Actualmente, el concepto de calidad seminal se refiere a una serie de características seminales que se consideran indicadoras de una funcionalidad espermática superior, como son mayores índices de: ausencia de formas anormales, movilidad progresiva, viabilidad, funcionalidad de la membrana, o capacidad de llevar a cabo una adecuada capacitación y reacción acrosomal (Sabés-Alsina, 2016). En este sentido, también una mayor producción seminal y/o espermática se asocia con una mayor probabilidad de fecundación. Aunque los espermatozoides libres de fluido seminal siguen siendo funcionales, el componente no celular del semen también participa en diversos aspectos de los eventos previos a la fertilización a través de su influencia en la fisiología espermática y en la interacción con el tracto genital femenino, y por tanto debe considerarse como fuente de biomarcadores útiles en el estudio de la calidad seminal (Álvarez-Rodríguez & Martínez-Pastor, 2021; Rodríguez-Martínez et al., 2021).

La determinación de los factores, tanto ambientales como endógenos, con capacidad para modular la calidad seminal es básica para comprender el éxito reproductivo, así como para conocer las condiciones más favorables para la toma de muestras seminales. Dada la marcada estacionalidad reproductiva del oso pardo, ésta podría ser considerada el factor exógeno de mayor importancia en relación a la calidad seminal. Otros factores dependientes del individuo que habitualmente se relacionan con cambios en las características seminales son: la edad, factores morfológicos como el tamaño testicular, el perfil hormonal y el estatus social.

Calidad seminal y estacionalidad reproductiva

Como ya comentábamos anteriormente, la estacionalidad reproductiva de los machos de oso pardo se ve reflejada a través de cambios etológicos y fisiológicos intensos, entre los que encontramos variaciones cíclicas en el perfil de hormonas sexuales esteroideas y variaciones en el patrón histológico de las gónadas. Estas variaciones histológicas han sido estudiadas en oso grizzly y en oso pardo de Hokkaido, y resultan de gran utilidad ya que gracias a ellas ha sido posible analizar la presencia de espermatozoides en testículos y epidídimos, y por tanto caracterizar la evolución de la espermatogénesis en distintos momentos del año (Erickson et al., 1968; Tsubota et al., 1997; Tsubota & Kanagawa, 1989; White et al., 2005). Tsubota et al. (1997) también detectaron cambios en la localización de algunas enzimas esteroideogénicas testiculares. Se ha descrito la existencia de espermatogénesis activa en tejido testicular de oso pardo varios meses antes y varios meses después del inicio y final del comportamiento sexual, en concreto desde febrero a septiembre en oso de Hokkaido (Tsubota & Kanagawa, 1989), así como una época de quiescencia durante los meses más fríos en la cual no se produce espermatogénesis (Spady et al., 2007). Erickson et al. (1968), describieron espermatozoides en epidídimo y conducto deferente en oso Kodiak entre el 2 de abril y el 10 de noviembre, y Ligot (2019) encontró espermatozoides en los túbulos seminíferos de machos de oso pardo europeo el 13 de noviembre. En Cabárceno, además, el uso de la electroeyaculación ha permitido obtener espermatozoides *in vivo* también fuera de la época reproductiva en el oso pardo entre febrero y octubre (Manrique-Revuelta et al., 2023).

Resulta razonable pensar por tanto que, además de la azoospermia propia de la época en la que existe supresión de la espermatogénesis, los ciclos de regresión y recrudescencia del tejido testicular también conllevasen cambios en las características del semen. El estudio de estas variaciones en otras especies de carnívoros silvestres asociadas a la estacionalidad reproductiva ha arrojado resultados variados: por ejemplo, no se ha encontrado efecto de la estacionalidad en tigre siberiano (Byers et al., 1990), pero sí en el coyote (Minter & DeLiberto, 2008) y en el guepardo (Crosier et al., 2007). En el oso pardo, las variaciones estacionales han sido

demostradas para la condensación de la cromatina espermática: los espermatozoides con la cromatina decondensada son más frecuentes entre marzo y junio con respecto al resto del año (García-Macías et al., 2006). Un efecto estacional puede considerarse también para la composición del plasma seminal, ya que existe un estudio que relaciona cambios en esta composición asociados a mayores niveles de T, los cuales fueron mayores en abril y mayo (Anel-López et al., 2017b). Sin embargo, los conocimientos acerca del efecto de la estacionalidad reproductiva en otras características del semen del oso pardo, especialmente dentro de la época reproductiva, se encuentran aún muy escasamente estudiados, a pesar de sus importantes implicaciones en la recogida de muestras seminales. Además, no debemos olvidar que, ante el contexto de cambio climático en el que nos encontramos, el estudio del efecto de las variaciones intraanuales en el semen supone una herramienta de gran valor ante posibles alteraciones en la función reproductiva debidas a cambios en las condiciones atmosféricas, alteraciones que ya han podido ser demostradas en otro gran mamífero con el que comparte hábitat, como es el ciervo ibérico (Millán et al., 2022).

En otras especies de úrsidos, disponemos de algunas referencias de interés al respecto. En el trabajo de Okano et al. (2009) sobre el oso negro asiático, por ejemplo, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros seminales estudiados al dividir la época reproductiva en dos periodos diferentes. Sin embargo, sí describieron mayores índices de motilidad y viabilidad, así como menores porcentajes de cabezas sueltas en comparación con el periodo posterior a la época reproductiva. En oso panda, los primeros trabajos sugerían una mejor calidad seminal en primavera (Moore et al., 1984). Aitken-Palmer et al. (2012) demostraron esta relación estudiando el efecto de la estacionalidad en 5 periodos distintos: época no reproductiva, “pre-mating” y la época reproductiva dividida en 3 periodos. La época del año no influyó en el pH o indicadores de motilidad de los espermatozoides del oso panda, pero sí en el volumen del eyaculado, la concentración y producción espermática, los cuales fueron mayores durante los tres periodos de la época reproductiva. Por su parte, el porcentaje de acrosomas normales en el oso panda disminuyó desde el pico de actividad sexual al periodo siguiente, es decir la época reproductiva tardía.

Calidad seminal y edad

La edad es otro de los factores que indiscutiblemente afecta a las características seminales, ya que los osos pardos generalmente son prepúberes hasta como mínimo su tercer año de edad (White et al., 1998; Zedrosser et al., 2007) pero no todos los individuos comienzan la producción de espermatozoides al mismo tiempo. La edad más frecuente de madurez sexual en machos descrita para el oso grizzly es de 4,5 o 5,5 años (Erickson et al., 1968; White et al., 1998).

Centrándonos en individuos adultos, no se ha caracterizado una posible influencia de la edad en las características seminales de osos pardos reproductivamente funcionales y hasta la fecha no existe evidencia de que exista una interrupción de la espermatogénesis asociada a la edad, de manera que los machos pueden tener descendencia a edades tan avanzadas como los 34 años (Shimozuru et al., 2020). Sin embargo, este reporte de casos de osos seniles con capacidad para tener éxito reproductivo no descarta una merma en la calidad seminal asociada, que hasta la fecha no ha sido evaluada.

Ante la falta de bibliografía en el oso pardo sobre diferencias en calidad de los eyaculados en base a la edad, debemos recordar que existen estudios de parentesco que aportan información sobre el éxito reproductivo de los machos y por tanto pueden resultar una fuente valiosa de información, siempre en base a una discusión sobre la influencia en los resultados de otros niveles de selección sexual distintos a la competición espermática. Estos estudios de parentesco hablan de una correlación entre edad y éxito reproductivo (Zedrosser et al., 2007), pero también de mayores frecuencias de éxito reproductivo a edades intermedias, concretamente entre los 9 y 18 años para Craighead et al. (1995b) y entre los 10 y 14 años para Shimozuru et al. (2020). Los resultados en osos jóvenes son dispares, ya que mientras Craighead et al. (1995b) no encontraron osos menores de 9 años que hubieran tenido descendencia, Zedrosser et al. (2007) describieron frecuentes camadas engendradas por machos de entre 3 y 8 años en dos poblaciones en la que los rangos de edad se encontraban desviadas hacia individuos jóvenes. Es importante puntualizar que los machos de oso pardo tienen un crecimiento lento y alcanzan un mayor tamaño corporal, a menudo considerado como una ventaja en la competencia entre machos previa a la cópula, a edades cercanas a los 14 años de edad (Shimozuru et al., 2020). El tamaño testicular también se encuentra correlacionado con la edad y el peso corporal y sus valores máximos suceden a edades intermedias, concretamente a los 8 - 10 años (White et al., 1998). En cualquier caso, es necesaria una investigación al respecto para poder discernir cuál es el efecto relativo de la edad o de otros factores relacionados con ella en las diferencias en el éxito reproductivo atribuibles a variaciones en la calidad seminal.

Los efectos de la edad en la calidad seminal han sido estudiados en el hombre (Eskenazi et al., 2003; Kidd et al., 2001) y en especies domésticas (Almquist et al., 1976; Corte Pause et al., 2022; Dowsett & Knott, 1996; Martins-Bessa et al., 2021), pero aún existe una escasez importante de información al respecto para los animales silvestres. En la mayoría de especies se describen aumentos de la producción seminal inmediatamente posteriores a la pubertad y descensos asociados a la senescencia (Berndtson, 2014). En el ser humano, por ejemplo, incrementos en la edad se asocian con disminuciones en el volumen seminal, la movilidad espermática y las formas

espermáticas normales, pero no en la concentración de espermatozoides del eyaculado (Eskenazi et al., 2003; Kidd et al., 2001). En toros jóvenes existen aumentos significativos asociados a la edad en el volumen del eyaculado, la concentración, producción y movilidad espermáticas (Almqvist et al., 1976; Corte Pause et al., 2022), mientras que en équidos se sabe que la concentración y producción espermática del semen fresco disminuyen con la edad (Dowsett & Knott, 1996; Martins-Bessa et al., 2021). En carnívoros silvestres, por su parte, encontramos que, en muestras procedentes de electroeyaculación, Curren et al. (2013) no detectaron diferencias significativas en la calidad los eyaculados de machos de hiena inmigrantes, mientras que, por el contrario, Crosier et al. (2007) sí identificaron ligeras variaciones en las características de los eyaculados en guepardos. En el guepardo, existen aumentos en el volumen seminal y movilidad espermática entre individuos juveniles e individuos mayores de dos años, pero si descartamos a los individuos juveniles y comparamos sólo individuos de entre 2 - 10 años con aquellos de más de 10 años de edad sólo existen diferencias en la concentración de espermatozoides morfológicamente normales (Crosier et al., 2007). En otros úrsidos, estudios similares han tenido como protagonista al oso panda. Aitken-Palmer (2010) afirmó que no se detectaron diferencias asociadas a la edad en la concentración, producción ni movilidad espermática, ni en la integridad acrosomal o en la concentración de espermatozoides con morfología normal. En su lugar, tan sólo describieron diferencias para algunos tipos de anomalías morfológicas en los espermatozoides, así como para el pH.

Calidad seminal y tamaño testicular

Como mencionábamos anteriormente, la edad se encuentra en íntima relación con algunas características morfológicas como el tamaño corporal (Shimozuru et al., 2020; White et al., 1998) o testicular (White et al., 1998). La expresión de estos parámetros a su vez puede ser reflejo de una superioridad genética, pero también de la influencia de factores ambientales como la época del año o el estado sanitario y hormonal de cada individuo. Una posible relación entre indicadores morfométricos y la calidad seminal no ha sido aún estudiada en el oso pardo.

Los estudios de parentesco realizados en oso pardo han encontrado una asociación entre éxito reproductivo y tamaño corporal en los machos (Zedrosser et al., 2007), pero no existen referencias similares en cuanto al tamaño testicular. No obstante, indicios de una correlación positiva entre ambos indicadores morfológicos (Erickson et al., 1968) hacen sospechar de que mayores medidas testiculares pudiesen indicar también una mayor probabilidad de tener descendencia. Debemos tener en cuenta sin embargo que el tamaño corporal es considerado una ventaja en los enfrentamientos entre machos y por tanto en la competición por las hembras, por lo cual los resultados de mayor éxito reproductivo asociados a mayor tamaño corporal

podrían ser explicados en mayor medida por factores pre-copulatorios en detrimento de una posible superior calidad seminal. El tamaño testicular, sin embargo, es una característica de influencia desconocida en la selección sexual de tipo pre-copulatorio, pero que por su función de producción de gametos y hormonas podría estar relacionado con distintos aspectos de la producción seminal.

Una relación del volumen testicular con la calidad seminal ha sido descrita en un importante número de especies. En el caballo, la edad es una de las causas de disminución de fertilidad en sementales, y ésta conlleva disminuciones en el volumen testicular y en parámetros relacionados con la calidad seminal como la producción de espermatozoides morfológicamente normales o la motilidad progresiva. Estos cambios pueden resultar pronunciados antes de que la integridad del ADN resulte severamente comprometida (Blanchard et al., 2013). La correlación entre aumentos de masa testicular y de producción de espermatozoides ha recibido una especial atención en especies domésticas (Berndtson, 2014). También ha sido demostrada en roedores, donde comparando distintas especies del género *Mus* spp. se ha descrito que aquellas con mayores índices de masa testicular tienen una mayor producción espermática en relación a su tamaño corporal (Gomendio et al., 2006). Estudios en ungulados silvestres van más allá y describen cómo el número de espermatozoides producidos no sólo aumenta con el tamaño de los testículos de forma generalizada, sino también en relación a los gametos producidos por cada gramo de tejido testicular (Almeida et al., 2006; Blottner et al., 1996). En carnívoros silvestres, por su parte, encontramos que en hienas existe una relación positiva estadísticamente significativa entre el volumen testicular y el volumen total del eyaculado, pero no con el número total de espermatozoides producidos (Curren et al., 2013). Finalmente, el estudio de la fertilidad en un único individuo de oso panda determinó que la falta de éxito en la obtención de muestra seminal mediante electroeyaculación se encontraba asociada a un descenso estacional del tamaño testicular pero, en los casos en los que se recogía un eyaculado, Moore et al. (1984) no analizaron una posible influencia del volumen testicular en la calidad seminal. También en oso panda, Aitken-Palmer et al. (2012) ofrecieron datos de volumen testicular y de parámetros seminales en los mismos individuos en función de la estacionalidad reproductiva, pero de nuevo no realizaron un análisis acerca de la influencia del volumen testicular en la calidad seminal. Sus datos no mostraron diferencias en el volumen testicular ni en parámetros de producción seminal ni de movilidad espermática durante la época reproductiva pero sí al comparar las épocas reproductiva y no reproductiva.

Calidad seminal y testosterona

Por otro lado, debe prestarse también especial atención al estatus endocrino del individuo productor de semen. De hecho, la importancia del estatus hormonal para la producción seminal ya fue subrayada en los inicios del estudio de la espermatología en el oso pardo, donde Ishikawa et al. (1998) reclamaban estudios adicionales sobre el perfil endocrino debido a su potencial para explicar las variaciones de las características seminales. En concreto, los andrógenos ejercen una acción indispensable para el inicio de la espermatogénesis en la pubertad, así como para la liberación de los espermatozoides y la producción del plasma seminal (Mann & Lutwak-Mann, 1981; Walker, 2009), y por tanto también cabe esperar una profunda influencia de sus niveles en la producción de espermatozoides y otros componentes seminales en machos reproductivamente funcionales. Sin embargo, en otras especies, la administración exógena de dosis elevadas de testosterona puede tener fuertes efectos depresores de la capacidad sexual, asociados en caballos a disminuciones reversibles de las medidas testiculares, de la producción de espermatozoides, o de los porcentajes de espermatozoides de morfología normal y de espermatozoides móviles (Squires et al., 1981). La concentración de testosterona necesaria o incluso óptima para la espermatogénesis en el oso pardo aún se desconoce, y la coexistencia de producción espermática con bajos niveles de testosterona por debajo de 1ng/mL en el oso pardo de Hokkaido sugiere una regulación neuroendocrina compleja en la que pueden estar implicadas otras hormonas (Tsubota & Kanagawa, 1989).

En el oso pardo, el papel de indicadores de la función endocrina como la testosterona en los estudios de parentesco aún está pendiente de estudio. En su lugar, sí se ha encontrado una correlación positiva, para ambos sexos, del éxito de monta y reproductivo con el comportamiento de marcaje mediante frotamiento en árboles y otros objetos (Morehouse et al., 2021). En los machos, a su vez, este comportamiento de marcaje parece estar influido por la testosterona ya que las glándulas sebáceas implicadas poseen una regulación androgénica (Tomiya et al., 2018). Aunque no se tiene constancia de referencias en cuanto a una posible influencia directa de la concentración de testosterona y el éxito reproductivo en la especie, sí existe evidencia de su relación con ciertas características del eyaculado. Anel-López et al. (2017b) caracterizaron la composición bioquímica del plasma seminal durante la época reproductiva en la población de osos de Cabárceno, encontrando diferencias significativas entre las muestras de eyaculado tomadas de animales con bajos niveles de T y aquellas procedentes de animales con T por encima de 5 ng/mL. Utilizando 48 muestras procedentes de 30 osos sexualmente funcionales, este estudio demostró que el plasma seminal de los individuos con elevada T tenía mayores niveles de: lactato, de ión magnesio (Mg⁺) y de dos proteínas no

identificadas, así como menores concentraciones de la proteína “BSP1” y de la enzima lactato deshidrogenasa en comparación con el plasma seminal de los eyaculados procedentes de animales con baja T. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la osmolalidad, el pH del plasma seminal, la motilidad espermática total o progresiva, ni en el número de espermatozoides entre las muestras de osos con baja y alta testosterona, y la concentración de testosterona sérica no presentó correlación con la motilidad espermática.

En otras especies encontramos que existe una relación positiva entre testosterona y producción espermática (ungulados silvestres como el corzo o el ciervo ibérico: Blottner et al., 1996; Malo et al., 2012). En el ciervo ibérico, la concentración de testosterona tuvo un efecto positivo sobre el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y con acrosomas intactos, pero no en su velocidad (VSL) (Malo et al., 2012). En el coyote, el porcentaje de espermatozoides móviles, viables y morfológicamente normales estuvo positivamente correlacionado con la testosterona sérica (Minter & DeLiberto, 2008).

Calidad seminal y estatus social

Por último, debemos considerar que los aspectos genéticos, neuroendocrinos y comportamentales implicados en las relaciones de dominancia conllevan un potencial efecto sobre las características seminales. De esta manera, el estatus social se ha visto traducido en una producción seminal de calidad superior o inferior según la especie implicada (Montrose et al., 2008). La dificultad de estudio de las relaciones sociales del oso pardo en su habitat ha propiciado una falta total de información al respecto, ya que hasta la fecha no existe ningún trabajo en la especie que combine el estudio objetivo del estatus social y de las características seminales en los mismos individuos. La combinación de diferentes factores en una situación social concreta puede derivar en ventajas o desventajas en el acceso a las hembras, que aún no se han demostrado en el oso pardo, pero que podrían derivar en el uso de distintas estrategias pre-copulatorias, y/o post-copulatorias asociadas. Así, la influencia de una hipotética situación preferente o desventajosa para las montas tendría la capacidad de alterar las características seminales a través de modificaciones en aspectos anteriores o posteriores a la cópula: por un lado, mayores frecuencias de eyaculación han demostrado tener efectos sobre la calidad seminal en otros mamíferos como en el carnero y en el cerdo (Ibrahim, 1997; Montes-Garrido et al., 2022; Palacín-Martínez et al., 2022; Preston et al., 2001; Strzežek et al., 1995) y, por el otro, individuos que sufren un efecto desventajoso de la presión selectiva precopulatoria son capaces de desarrollar estrategias alternativas orientadas hacia la mejora de sus opciones durante la competición espermática (Montrose et al., 2008).

Una vez más, los estudios de parentesco nos proporcionan una valiosa información acerca del potencial reproductivo de los machos de oso pardo ante la ausencia de estudios espermatológicos que describan los factores individuales y ambientales modulantes de la calidad seminal. Éstos muestran, por ejemplo, cómo la interacción de las hembras con machos con elevado ratio de oseznos engendrados no siempre resulta en la producción de descendencia (Bellemain et al., 2006b). El efecto negativo de la competición espermática debería tenerse en cuenta como posible explicación a dicho fenómeno. Por otro lado, en el oso pardo encontramos que el éxito reproductivo se asocia a características indicadoras de superioridad física como un mayor tamaño corporal (Bellemain et al., 2006b; Zedrosser et al., 2007), así como a mayores frecuencias de comportamiento de marcaje contra árboles u otros objetos, considerado habitualmente como un método para comunicar estatus social (Morehouse et al., 2021). Se trata de datos que sugieren una asociación entre éxito reproductivo y dominancia, la cual tendría implicaciones de gran relevancia en la demografía poblacional, pero la evidencia de tal relación sólo quedará demostrada a través de futuros estudios de paternidad en poblaciones con una estructura social conocida a nivel de individuo. Una prolífica literatura al respecto demuestra que la mayoría de estudios en todos los grupos de especies del Reino Animal, incluyendo los mamíferos, apoyan la hipótesis de una relación positiva entre dominancia y éxito reproductivo (Ellis, 1995). Existen no obstante excepciones, como por ejemplo el caso de las hienas, especie con una estructura social inusual, matriarcal y con baja frecuencia de agresiones entre machos, donde ésto no ha podido ser demostrado (Engh et al., 2002).

Lo observado en otras especies demuestra gran variabilidad en la relación de la posición jerárquica no sólo con el éxito reproductivo sino también con la calidad seminal. Ambas posibilidades, es decir, tanto una relación positiva como negativa, han podido ser demostradas. Una relación positiva entre dominancia y calidad seminal se ha evidenciado en peces y en roedores, mientras que las especies con una relación negativa incluyen tanto mamíferos como aves, peces e insectos (Montrose et al., 2008; Thomas & Simmons, 2009). La adaptación de las características del eyaculado en respuesta a cambios en su estatus social pueden ser rápidas, como sucede en la trucha alpina (Rudolfson et al., 2006), y otros aspectos sociales además de la posición jerárquica tienen la capacidad de ejercer una acción en este sentido. Así, en *Dermogenys collettei*, un pez que vive en grupo, los animales dominantes se caracterizan por características seminales superiores sólo en condiciones en las que suceden frecuentes interacciones entre machos (Reuland et al., 2021). Finalmente, Curren et al. (2013) describieron los determinantes de algunas características seminales en los machos de hiena, un carnívoro que vive en grupos que aceptan machos no emparentados a los que se denomina “inmigrantes”.

Los individuos inmigrantes mostraron una calidad superior en el eyaculado obtenido mediante electroeyaculación, pero esto no pudo ser demostrado para el rango social. Como ya comentábamos, se trata de una especie en la que tampoco existe una relación clara entre dominancia y éxito reproductivo.

En resumen, aspectos elementales de la biología reproductiva del oso pardo aún necesitan ser objeto de un estudio exhaustivo. En los machos se ha producido un importante esfuerzo investigador orientado hacia la criopreservación de gametos, pero, hasta la fecha, no se han publicado estudios sobre factores de variación en los eyaculados frescos. Su estudio nos permitiría optimizar la materia prima inicial destinada a la creación de bancos de recursos genéticos, bien a través de la elección de la época de muestreo y de los machos donantes, o bien a través de la evaluación predictiva de la calidad de la muestra. Incluso, sería de gran utilidad en la elección de machos objeto de traslocación entre poblaciones con fines reproductivos. Se trata de una tarea compleja ya que implica la definición previa, para la misma población de estudio, de su jerarquía social y estacionalidad reproductiva e, idealmente, una misma población debería ser objeto de análisis integral en los objetivos planteados. Sin embargo, como ya comentábamos anteriormente, la toma de datos en el oso pardo, tanto de manera no invasiva como invasiva, conlleva múltiples dificultades en el medio natural, muy difícilmente asumibles en el tipo de diseño experimental necesario para la consecución de los objetivos planteados.

Ante esta encrucijada, la población de osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno se presenta como una alternativa ideal. Se trata de un grupo de osos en un ambiente controlado, en un recinto cuya gran extensión y características permiten un modo de vida y comportamiento lo más cercano a la vida libre, siempre considerando las diferencias asociadas a la mayor densidad de animales, a la suplementación en la alimentación, y a la existencia de contacto con el ser humano en un área restringida del recinto. En el apéndice B pueden observarse varias imágenes al respecto. La cautividad facilita el control sobre los osos, de manera que es posible la observación y anestesia para toma de muestras de un número suficiente de individuos y con una frecuencia adecuada, incluso cuando se realiza bajo un sesgo por sexo y edad. De esta manera, podemos limitar el estudio experimental a machos adultos bajo un mismo sistema de manejo, reduciendo los factores de variación con posibilidad de modular los parámetros objeto de análisis. Así, el Parque de la Naturaleza de Cabárceno, como lugar de estudio, se erige como una opción con potencial para llegar a conclusiones inéditas acerca de las adaptaciones morfológicas, etológicas y fisiológicas que caracterizan a los machos de oso pardo, de incalculable valor para definir aspectos aún desconocidos de la biología reproductiva de la especie e incluso, quizás, servir como modelo para otras especies de úrsidos.

4. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene como principal objetivo contribuir en la conservación del oso pardo de la Cordillera Cantábrica a través del conocimiento de su biología reproductiva con el fin de optimizar la aplicación de las técnicas de reproducción asistida en el oso pardo y en consecuencia incrementar la efectividad del banco de recursos genéticos de esta especie.

Para su desarrollo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la organización social de los machos de oso pardo de una población en semilibertad y los posibles determinantes biológicos del estatus social en los machos.
2. Estudiar la ciclicidad anual de diversos aspectos etológicos (comportamiento reproductivo, agonístico y de juego), morfológicos (medidas morfométricas) y fisiológicos (perfiles hematológico y endocrino) de machos de oso pardo de una población en semilibertad.
3. Estudiar los factores de variación de tipo ambiental (estacionalidad) e individual (edad, volumen testicular, niveles de testosterona y estatus social) que influyen en las características espermáticas de oso pardo.

5. OBJECTIVES

The main aim of this PhD dissertation is to contribute to the conservation of the Cantabrian brown bear through the understanding of its reproductive biology, in order to optimize the assisted reproductive techniques in the brown bear and, thus, increase the efficiency of the genetic genome resource bank for the species.

The following specific goals have been established:

1. Studying the social organization of all the male brown bears in a population living under semi-free conditions and the possible biological determinants of social status in male bears.
2. Studying the annual cyclicity of several ethological (sexual, agonistic and play behaviour), morphological (morphometric measurements) and physiological (hematological and endocrinological profiles) aspects of male brown bears in a population living under semi-free conditions.
3. Studying the factors associated with environmental (seasonality) and individual-dependent (age, testicular volume, testosterone levels and social status) variations on brown bears' spermatic traits.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. ANIMALES Y ÁREA DE ESTUDIO

Para este estudio se ha utilizado la población de osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (43°21' N, 3°50' W; altitud 143 metros sobre el nivel del mar), situado en Cantabria, España. El manejo llevado a cabo ha estado en todo momento conforme a la legislación española (R.D. 223/1988, R.D. 1201/2005 y R.D. 53/2013) y de la Unión Europea (Directiva 86/609/CEE y Directiva 2003/65/EC) acerca de la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Todos los experimentos han sido aprobados por el Comité de Ética para Experimentación con Animales de la Universidad de León, España (Informes 03-02/2010 y #27-2013).

Los osos pardos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno habitan en régimen de semilibertad en un recinto de 24ha (ArcGIS^R) (Figura 1). La presencia de suelo vegetal, rocas, vegetación espontánea, cuevas y oseras cavadas por los mismos osos permiten un ambiente y un modo de vida lo más naturalizado posible. La orografía del recinto es en su mayoría abrupta y pueden encontrarse áreas de pasto, así como otras especies vegetales que también proporcionan alimento complementario a los osos (higueras, zarzamoras, robles, fresas silvestres, etc.).

La exposición de los animales a los visitantes del Parque está limitada a un mirador que ocupa 277 metros del perímetro del mismo (Figura 1). Durante el periodo de estudio, el contacto con los cuidadores estuvo restringido al momento de la administración de alimento (carne, pan, frutas y verduras variadas) y al lugar de administración del mismo. Ocasionalmente, se desarrollaron actuaciones veterinarias para las que siempre se llevó a cabo anestesia general y traslocación temporal del animal.

La diferenciación de los individuos se efectuó a través del uso de transponders electrónicos, crotales coloreados y diferencias morfológicas. La asignación de una edad a cada individuo se realizó bien a través de los registros clínicos proporcionados por el Parque de la Naturaleza de Cabárceno o, en caso de no contener edad de nacimiento, a través del estudio de la dentición. El estudio de la dentición para la estimación de la edad de nacimiento se llevó a cabo mediante análisis de imágenes fotográficas utilizando la puntuación otorgada por 11 evaluadores basándose en la evolución temporal de la dentadura descrita por Jonkel (1993). En este estudio, los evaluadores compararon varias imágenes de la dentición de cada individuo con las imágenes de referencia para cada edad proporcionadas por Jonkel (1993) y asignaron un rango de edad para cada individuo en la fecha de toma de las imágenes; luego, se realizó la media de las calificaciones obtenidas, tomándose ese valor como edad estimada de cada oso en la fecha correspondiente.

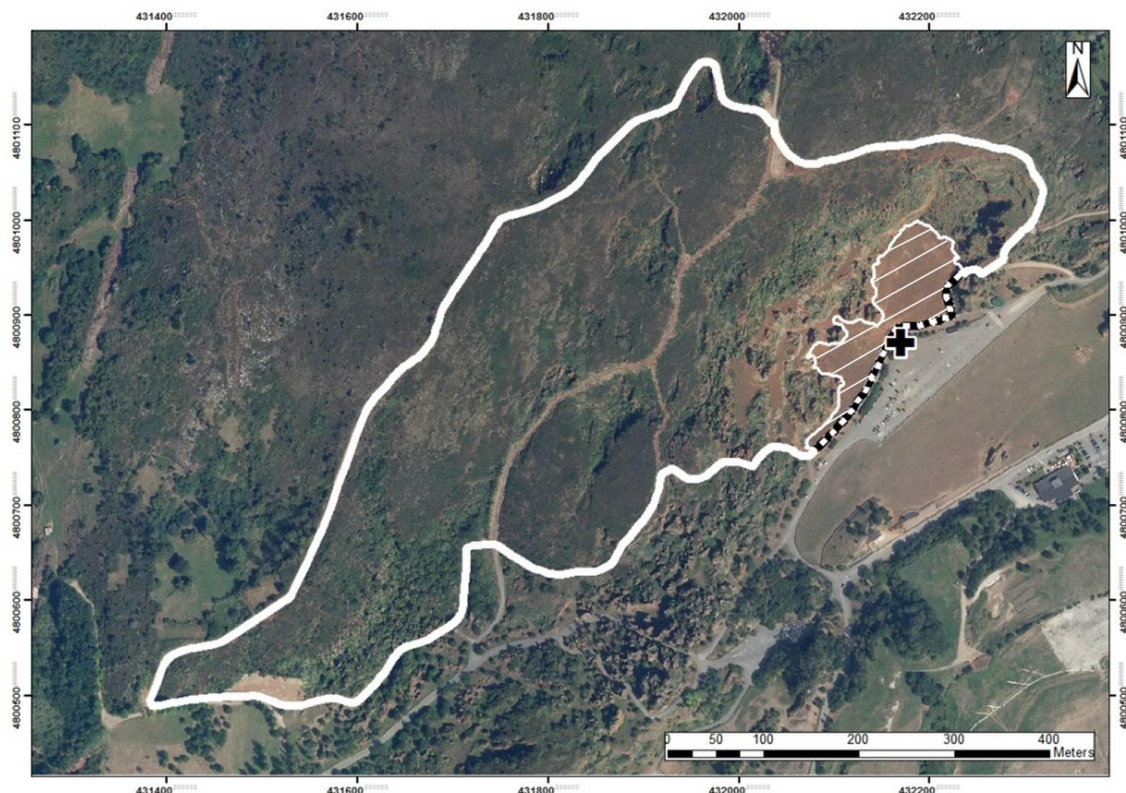


Figura 1. Vista aérea del recinto para osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. El recinto se encuentra delimitado por la línea blanca ancha y la línea punteada. La X señala el lugar de localización del observador, desde el que se tiene acceso visual completo al "área de observación", que se corresponde con la superficie rayada. Los visitantes del Parque sólo tienen acceso a la zona marcada como una línea punteada.

6.2. METODOLOGÍA

El diseño experimental se estructura en tres experiencias: I) estudio de la estructura social de los machos de oso pardo, II) estudio del ritmo reproductivo anual de los machos de oso pardo y III) estudio de los factores que influyen en la calidad de los eyaculados de oso pardo.

El desarrollo de dichas experiencias comprende dos tipos distintos de metodologías: un estudio etológico y/o un estudio de parámetros morfológicos y fisiológicos mediante la toma de medidas y muestras biológicas.

En este manuscrito, las 24 quincenas del año se nombrarán con la letra "Q" seguida de dos dígitos en orden de menor a mayor comenzando por "Q01", de manera que la primera quincena de cada mes comprende hasta el día 15 incluido, exceptuando el mes de febrero, en el cual su primera quincena incluye hasta el día 14.

6.2.1. Estudio etológico

Cronología y condiciones de observación

En esta parte del estudio, se llevó a cabo la recogida y registro de datos de comportamiento durante 5 años consecutivos (2010-2014), obteniéndose información en todos los meses del año. La metodología para la recolección de datos comportamentales consistió en un estudio observacional sistematizado en el que todas las observaciones fueron realizadas por el mismo observador desde un mismo punto de observación (Figura 1). Además, se llevó a cabo un periodo de observación previo a la toma de datos para asegurar la diferenciación a nivel individual de todos los osos de la población.

Los datos climatológicos presentados han sido elaborados utilizando la información suministrada por la Agencia Estatal de Meteorología (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) para la estación meteorológica más cercana al lugar de estudio, es decir, la estación de “Santander/Parayas” (3°49’02’’O 43°25’23’’N).

Animales

El número de individuos que componían la población al principio y final del estudio se puede observar en la Tabla 1. El ratio macho/hembra varió entre 0,73 y 0,94. El número total de individuos distintos mayores de 3 años observados en el estudio etológico durante los 5 años de estudio fue 74. Los osos mayores de seis años de edad serán categorizados como “adultos”. En los 5 años a los que nos referimos, se introdujeron en la población 6 nuevos animales de diferente origen, se trasladaron 7 individuos a otras instituciones zoológicas, y un total de 18 hembras distintas fueron observadas con oseznos del año, de las cuales siete tuvieron más de una camada. La subpoblación de machos adultos incluyó un animal castrado y otro vasectomizado. Ni el individuo castrado ni los individuos menores de tres años fueron tenidos en cuenta para ninguno de los resultados que se presentarán a partir de este momento en esta tesis doctoral.

Tabla 1. Composición de la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno por sexos entre el comienzo (15/04/2010) y final (28/09/2014) del estudio etológico. No se incluyen los individuos de menos de un año de edad.

	Comienzo del estudio	Final del estudio	Mínimo	Máximo
Número de machos	29	32	28	35
Número de hembras	36	36	32	41
Número total de osos	65	68	61	74

6.2.1.1. Estudio de la estructura social

Cronología y condiciones de observación

Para el estudio de la estructura social, se han utilizado datos referentes a los años 2011 y 2012, durante los cuales se obtuvo información de 130 y 152 días de observación respectivamente. La distribución mensual de los eventos de observación puede consultarse en la Tabla 2. Las observaciones se realizaron entre las 8 a.m. y las 13:30 p.m., con una media de 3 horas de observación por día (846 horas en total).

Tabla 2. Distribución mensual del número de días de observación realizados en el estudio de estructura social en osos pardos en régimen de semilibertad (periodo 2011-2012).

Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Días de observación	13	12	37	43	45	43	46	6	7	7	8	15

Animales

El número de machos mayores de 3 años de edad en la población fue de 29 el día 1 de enero de 2011 y de 27 el 31 de diciembre de 2012, incluyendo a dos individuos que no estuvieron presentes durante la totalidad del periodo de estudio para la estructura social y que no serán incluidos en ninguno de los resultados referentes a la estructura social a partir de este momento. Para la determinación de la estructura social se utilizaron todos los machos adultos enteros que formaron parte de la población durante los dos años completos, es decir, 27 individuos.

Cada individuo fue clasificado según su edad, de manera que las categorías de machos según la edad fueron las siguientes: los animales entre 3 y 6 años fueron categorizados como "subadultos" (N = 9) y aquellos de más de 6 años como "adultos" (N = 18). En este periodo de estudio ningún oso fue introducido en el recinto y al comenzar el mismo no existía ningún oso de uno, dos o seis años de edad.

Interacciones de interrupción de montas

Se registraron todas las interacciones intraespecíficas en las que la aproximación directa de un macho hacia un macho y una hembra que estaban mostrando comportamiento de monta dio como resultado la finalización del mismo.

Interacciones agonísticas

Se registraron todas las interacciones agonísticas, también denominadas agresivas, definidas como interacciones intraespecíficas con cierto nivel de agresividad entre machos, en las que tuvieron lugar sonidos, contacto físico o comportamiento de huida a la carrera. En cada una de ellas, se recogieron: la identidad de los individuos y el patrón de comportamientos mostrados.

No todas las interacciones agonísticas mostraron una relación asimétrica entre sus participantes. Por ello, se distinguió con la denominación "encuentros decisivos" aquellas interacciones agonísticas diádicas en las que fue posible determinar el estatus de vencedor y perdedor. Ocasionalmente, se observaron interacciones en las que participaron tres o más individuos, pero sólo los encuentros decisivos llevados a cabo por dos osos fueron considerados a la hora de establecer la organización social. Debido a que no existe en la literatura un criterio estandarizado consensuado sobre los patrones de comportamiento a utilizar para determinar el estatus de ganador y perdedor en un encuentro agresivo entre osos pardos, y a que los criterios descritos previamente por otros autores no son adecuados para la población de osos de Cabárceno debido a las razones que se expondrán en la discusión, en este trabajo se optó por utilizar un criterio propio. Así, en el presente estudio, se consideró como ganador de un encuentro agonístico al oso que mostró uno o varios de estos patrones de comportamiento durante la interacción: (1) "avance frontal": con una orientación corporal frontal, camina hacia delante a la vez que el individuo perdedor retrocede caminando hacia atrás; y (2) "persecución": persigue corriendo al individuo perdedor y éste no se gira para enfrentarse a él.

Análisis de la jerarquía de dominancia

La estructura social del grupo de machos ha sido evaluada a partir de los resultados de estos "encuentros decisivos". El sentido de la relación entre dos individuos de una "díada", es decir, entre cada par de individuos, será denominado "relación de dominancia", y se definirá por el sentido de la dominancia (vencedor y perdedor) en los encuentros decisivos entre esa pareja que se haya observado en un mayor número de ocasiones. Si ningún encuentro decisivo fue observado para una díada durante el periodo de estudio, ésta se asignará como "desconocida" (de Vries, 1995). Estos resultados son organizados en una matriz sobre la que aplica el método I&IS (Inconsistencies & Total Strength Inconsistencies) definido por Schmid and De Vries (2013) para evaluar las relaciones "unidireccionales" (todos los encuentros decisivos fueron ganados por uno de los dos individuos), y las relaciones de "doble sentido" (ambos individuos de la díada ganan al menos un encuentro; además, si cada miembro de la díada ganó el mismo número de encuentros, se considerará "empatada"). Este método consiste en buscar el orden más cercano a la linealidad con el mínimo de relaciones "intransitivas" (con un resultado contrario al orden jerárquico asumido ("inconsistencias")) y el mínimo de fuerza de esas inconsistencias (diferencia entre rangos de los individuos que constituyen una díada intransitiva) (de Vries, 1998). La "fuerza total" se refiere a la suma de las fuerzas de todas las inconsistencias presentes en una matriz de dominancia. Puede consultarse el glosario de términos asociados en la Tabla 3.

Tabla 3. Glosario de términos relacionados con la estructura social de la población de osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno.

Término	Definición	Tipos		Definición
Díada	Par de individuos de una población que interactúan			
Encuentro agonístico	Interacción entre machos con cierto nivel de agresividad en la que tuvieron lugar sonidos, contacto físico o comportamiento de huida a la carrera.	Decisivo		Aquel en el que fue posible determinar el sentido de la dominancia entre sus participantes (vencedor y perdedor)
		No decisivo		Aquel en el que no es posible determinar el sentido de la dominancia
Relación de dominancia	Sentido de la dominancia observado en un mayor número de ocasiones en los encuentros decisivos de una díada (dominante y subordinado)			
			Desconocida	No se registraron encuentros decisivos
			Unidireccional	Todos los encuentros decisivos fueron ganados por uno de los dos individuos
			De doble sentido	Los dos individuos de la díada ganaron al menos un encuentro decisivo. Si ambos ganaron el mismo número, se denominará empata .
			Transitiva	El sentido de la relación de dominancia coincide con el del orden jerárquico poblacional asumido
			Intransitiva o inconsistencia	El sentido de la relación de dominancia no coincide con el del orden jerárquico poblacional asumido

6.2.1.2. Estudio de los ritmos anuales en el comportamiento

Cronología y condiciones de observación

Para el estudio de las variaciones en el comportamiento del oso pardo asociadas a su estacionalidad reproductiva, se han utilizado exclusivamente observaciones de dos horas de duración ininterrumpidas ocurridas entre las 8:00 a.m. y las 10:00 a.m. Los únicos eventos antropológicamente mediados ocurridos durante las dos horas de observación fueron la presencia del observador y de visitantes en la zona delimitada en la Figura 1 (el Parque permite la entrada de público a partir de las 9:30 a.m.), de manera que no se han incluido en los resultados aquellos días de observación en que ocurrieron situaciones anormales dentro del recinto como trabajos de mantenimiento del recinto, entrada de vehículos, introducción de osos, etc. Un total de 314 observaciones ocurridas entre los años 2010 y 2014 fueron incluidas. La distribución mensual de los eventos de observación puede consultarse en la Tabla 4.

Tabla 4. Distribución mensual del número de días de observación para el estudio de las variaciones anuales en el comportamiento (2010-2014).

Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Días de observación	11	13	38	45	50	46	55	17	9	9	8	13

Las observaciones para el estudio de las variaciones anuales en el comportamiento quedaron acotadas a un "área de observación", que consistió en una zona de pradera de 1,2 Ha de superficie delimitada por barreras naturales (Figura 1). El área de observación para el estudio comportamental es el lugar donde se realiza la administración de alimento por parte de los cuidadores y también el lugar desde donde un mayor número de osos pueden ser observados.

Cada día de observación, se registraron: el número de osos (total y de machos) presentes en el área de estudio comportamental a las 8 a.m. y a las 10 a.m., así como el número de interacciones agonísticas, sexuales y de juego. En cada conducta fueron anotados: los individuos implicados, su sexo, la fecha, hora, y el patrón de comportamiento mostrado.

Interacciones intraespecíficas

En este estudio se definen tres tipos "interacciones" o "encuentros" intraespecíficos: agonístico o agresivo; sexual o monta; y de juego o amistoso.

Para el estudio de los ritmos anuales en el comportamiento, se considera como un encuentro de tipo "agonístico" o "agresivo" aquella interacción con un cierto nivel de agresividad en la que tuvieron lugar sonidos y/o contacto físico. Una "cópula", por su parte, se define como el evento durante el cual un macho situó su pecho en el dorso de una hembra adulta mientras ambas extremidades anteriores quedaban suspendidas sin tocar el suelo, a ambos lados de la hembra.

Dos cópulas separadas por menos de 10 minutos durante los que ninguno de los individuos implicados participó en otra cópula se consideraron como una única “monta”. El término “juego” indica aquel comportamiento con contacto físico y sin actitud agresiva por parte de ninguno de los dos participantes.

Se calcularon índices para los tres tipos de comportamiento con la intención de expresar la frecuencia de comportamientos teniendo en cuenta la presencia de osos en el área de estudio, es decir, buscando una aproximación de la intensidad de cada comportamiento con la menor influencia posible de las variaciones de actividad en la población. Los índices de comportamiento agresivo y de juego se calcularon dividiendo el número de interacciones registradas durante el intervalo de las 8 a.m. a las 10 a.m. entre el número de machos a las 10:00 a.m., es decir, al final de la observación. Para ambos tipos de comportamiento se tuvieron en cuenta por separado, mediante dos índices distintos, las interacciones en las que participa algún macho y aquellas en las que los dos participantes son machos. El índice de comportamiento sexual, por su parte, se calculó con una fórmula en la que también se tiene en cuenta el número de hembras, ya que ésta se considera una variable de importante sentido biológico para tal comportamiento.

Para cada día de observación se obtuvieron, por tanto, dos índices de comportamiento agresivo, un índice de comportamiento sexual y dos índices de comportamiento de juego en base a las siguientes fórmulas:

- $ICA_M = A_M / M$
- $ICA_{m-m} = A_{m-m} / M$
- $ICS = (S / (M+H)) / (M / H)$
- $ICJ_M = J_M / M$
- $ICJ_{m-m} = J_{m-m} / M$

Donde: ICA_M = Índice de comportamiento agresivo de machos; A_M = Número de interacciones agresivas en las que participa al menos un macho entre las 8 a.m. y las 10 a.m.; M = Número de machos a las 10 a.m.; ICA_{m-m} = Índice de comportamiento agresivo entre machos; A_{m-m} = Número de interacciones agresivas en las que los dos participantes son machos entre las 8 a.m. y las 10 a.m.; ICS = Índice de comportamiento sexual; S = Número de montas entre las 8 a.m. y las 10 a.m.; H = Número de hembras a las 10 a.m.; ICJ_M = Índice de comportamiento de juego de machos; J_M = Número de interacciones de juego en las que participa al menos un macho entre las 8 a.m. y las 10 a.m.; ICJ_{m-m} = Índice de comportamiento de juego entre machos; J_{m-m} = Número de interacciones de juego entre las 8 a.m. y las 10 a.m. en las que los dos participantes son machos.

6.2.2. Toma de medidas morfológicas y muestras biológicas

6.2.2.1. Manejo anestésico

Cronología y condiciones de las capturas

Se llevaron a cabo un total de 311 capturas de machos de oso pardo mediante teleanestesia entre 2002 y 2016 para la toma de datos y muestras biológicas, distribuidas entre los meses de febrero y noviembre según la Tabla 5. Un total de 39 machos sexualmente maduros diferentes fueron capturados. Quedaron excluidas de este estudio las anestесias de osos efectuadas por razones médicas o aquellas en las que los resultados de la hematología y/o bioquímica sanguíneas mostraron signos de enfermedad sistémica.

Tabla 5. Distribución mensual del número de capturas de machos de oso pardo bajo anestesia general (2002-2016).

Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Número de capturas	0	9	24	77	72	76	28	6	5	13	1	0

Para los resultados relacionados con la estructura social, sólo los datos obtenidos durante capturas realizadas en abril y junio de los años 2010, 2011, 2012 y 2013 fueron incluidos. Para la evaluación de factores que influyen en la calidad de los eyaculados, se utilizaron los datos procedentes de las electroeyaculaciones realizadas de 2004 a 2013.

Inmovilización y monitorización anestésica

La inmovilización química se realizó mediante teleanestesia con un rifle de CO₂ (Modelo IM, DANiNJECT, Dinamarca), desde un vehículo situado dentro del recinto. Se aplicó intramuscularmente una dosis de inducción de 250-750 mg de zolazepam HCl + tiletamina HCl (Zoletil 100[®], 50 + 50 mg/mL; Virbac, Carros, Francia) combinado con 6-12 mg de medetomidina (Zalopine[®], 10mg/mL; Orion Pharma Animal Health, Finlandia) mediante un dardo de 3 mL (DANiNJECT, Dinamarca) acoplado a una aguja con collar de 60mm de longitud (DANiNJECT, Dinamarca).

Una vez inmovilizado, el oso fue trasladado a un lugar habilitado situado a 1 km. La frecuencia cardíaca, respiratoria, y la saturación de oxígeno periférico fueron monitorizados durante la totalidad del evento anestésico (PM-8000Vet Patient Monitor, Shenzhen Mindray Bio Medical Electronics Co., Ltd., China). Los oídos y ojos del animal fueron tapados mediante torundas y una máscara con la finalidad de disminuir al máximo los estímulos sonoros y visuales durante la anestesia.

6.2.2.2. Peso corporal y morfometría

-Peso corporal (kg): calculado con un dinamómetro electrónico (MICRO-DIN; DINAKSA^R, España).

-Medidas de mano y pie (cm): longitud y anchura de la mano y del pie en las zonas más amplias usando una cinta métrica.

-Diente canino: altura (cm), longitud (cm) y anchura de la base (cm), mediante el uso de un calibre. Se utilizó el canino que presentase mayor grado de integridad debido a la elevada frecuencia de fracturas en caninos. El área de la base del colmillo se calculó según la fórmula del área de una elipse:

$$\text{Área de la base del colmillo (cm}^2\text{)} = \pi \times (\text{CL}/2) \times (\text{CW}/2)$$

Donde, CL: longitud de la base del canino (cm); y CW: anchura de la base del canino (cm).

-Testículos: medidas del eje mayor (cm; longitud) y eje menor (cm; anchura) utilizando un calibre. Solamente se utilizaron las medidas testiculares consideradas fisiológicas. El “volumen testicular” correspondió a la media del volumen de ambos testículos. El volumen de cada testículo se calculó según la fórmula del volumen de un elipsoide:

$$\text{Volumen testicular (cm}^3\text{)} = [(\text{LL} \times \text{LW}^2 \times \pi/6) + (\text{RL} \times \text{RW}^2 \times \pi/6)]/2$$

Donde, LL: eje mayor del testículo izquierdo; LW: eje menor del testículo izquierdo; RL: eje mayor del testículo derecho; y RW: eje menor del testículo derecho.

6.2.2.3. Análisis sanguíneos

Se obtuvieron muestras de sangre de los osos anestesiados para la determinación de hormonas circulantes (cortisol y testosterona) y parámetros hematológicos (eritrocitos ($10^6/\mu\text{l}$), hemoglobina (g/dL), hematocrito (%), plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$), leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$), neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$), linfocitos ($10^3/\mu\text{l}$), monocitos ($10^3/\mu\text{l}$), glucosa (mg/dL), colesterol (mg/dL) y proteínas totales (g/dL)). Los parámetros relacionados con el hemograma sólo se determinaron entre 2002 y 2005, mientras que glucosa, colesterol, proteínas totales, testosterona y cortisol, se analizaron en muestras de entre 2002 y 2010.

La extracción sanguínea se realizó mediante venopunción en la vena cefálica con un catéter 14G entre las 10:00 a.m. y las 11:30 p.m. La sangre fue inmediatamente dividida en tres tubos (Vacutainer^R) que se mantuvieron refrigerados hasta su análisis o congelación, conteniendo: uno de ellos ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); el segundo, heparina de litio; y el último no contenía anticoagulante. Se obtuvo plasma proveniente del tubo con heparina de litio tras

centrifugar (3500 revoluciones por minuto durante 15 minutos) en las siguientes dos horas después de la toma de la muestra. Por último, se obtuvo suero de la muestra sin anticoagulante una vez formado el coágulo y tras su centrifugación (3500 revoluciones por minuto durante 15 minutos).

El hemograma se realizó usando la muestra con EDTA refrigerada (SYSMEX F-820; Sysmex, Kobe, Japón) aproximadamente 24 horas después de la recolección. El análisis bioquímico se realizó utilizando plasma heparinizado (Cobas Integra 400; Roche Diagnostics). Los niveles de testosterona (ng/mL) (IMMULITE1 1000 Total Testosterone System commercial kit; Siemens, Glyn Rhonwy, United Kingdom) y cortisol ($\mu\text{g/dL}$) (IMMULITE1 1000 Cortisol commercial kit; Siemens, Glyn Rhonwy, United Kingdom) fueron determinados a partir de las muestras de suero. Se realizó una conversión logarítmica de los datos de cortisol y testosterona (Tes_Log) para su uso en el apartado de estructura social, así como para el estudio de las correlaciones con parámetros sanguíneos y morfométricos.

6.2.2.4. Recogida y valoración de eyaculados

Se obtuvieron muestras seminales mediante electroeyaculación (EE) de los osos anestesiados entre 2004 y 2013, distribuidas temporalmente según la Tabla 6. Todos los productos químicos utilizados fueron manufacturados por Sigma (Madrid, España) a no ser que se especifique lo contrario. Sólo las sesiones de recogida seminal llevadas a cabo en época reproductiva fueron incluidas en el análisis estadístico.

Tabla 6. Distribución mensual del número de capturas bajo anestesia general en las que se realizó electroeyaculación (2004-2013).

Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Número de capturas	0	7	22	64	58	58	12	4	2	9	0	0

Electroeyaculación y recogida seminal

Previamente al comienzo de cada sesión de EE, se lavó y rasuró la zona púbica, se lavó el pene con solución salina fisiológica estéril y el recto fue vaciado. Durante la electroestimulación, la vejiga permaneció sondada. La metodología consistió en la aplicación, mediante el uso de un electroeyaculador (PT Electronics¹; PT Electronics, Boring, OR, USA), de estímulos eléctricos de voltaje creciente a través de una sonda transrectal de 26cm de diámetro y 320cm de largo con tres electrodos orientados ventralmente. Se alternaron periodos de estimulación eléctrica (3 s) con periodos de descanso (3 s) hasta la eyaculación (10V y 150mA de media).

El eyaculado, tras su filtración, fue recogido de forma fraccionada en tubos de vidrio estériles de 15 mL provistos de un filtro. La recogida del eyaculado se realizó de forma fraccionada en función del cambio de aspecto para evitar posibles contaminaciones con orina y para intentar obtener aislada la fracción con mayor concentración de espermatozoides. Cada sesión constó de entre 1 y 4 recogidas, con una media de $1,98 \pm 0,46$, separados entre ellos por un mínimo de 15 minutos. En cada una de ellos se obtuvieron una o varias fracciones. Las fracciones urospérmicas (urea >80 mg/dL y/o pO <200 mOsm/kg) fueron desechadas. Se tomó la fracción más concentrada de cada captura, a la que se denominó “fracción rica” (FR), como representativa de la calidad seminal del macho en el momento de la recogida. Sólo las fracciones ricas recogidas durante la época reproductiva fueron utilizadas para su análisis cuantitativo y cualitativo.

Evaluación inicial de la calidad espermática

Inmediatamente tras la recolección de cada fracción, se registraron: el volumen, la osmolalidad, el pH, el contenido en urea y la concentración espermática según la siguiente metodología:

-Volumen (mL): según los indicadores de los tubos de vidrio recolectores.

-Osmolalidad (mOsm/kg): utilizando un osmómetro crioscópico (Osmomat-030, Gonotec®, Berlin, Alemania).

-pH: utilizando un pHmetro (CG 837-Schott; Schott, Alemania).

-Contenido en urea: utilizando un test rápido de urea (Urea test strips Ecoline®, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemania). Se depositaron 10 μ L de la muestra en la zona reactiva de la tira, la cual se encuentra colocada en un deslizador. A continuación, este deslizador se introdujo en una cubeta, y se realizó la lectura de cada tira tras 30 minutos según la escala graduada. Dicha escala está dividida longitudinalmente en 25 partes de 1 mm cada una, de manera la tinción de la tira hasta la división de 10 mm corresponde a una concentración de urea de 80 mg/dL.

-Concentración espermática (espermatozoides $\times 10^6$ /mL): se utilizó un hemocitómetro de Bürker (Marienfeld GmbH; Marienfeld, Alemania) según la metodología descrita por Anel et al. (2011). El número de espermatozoides (spz) totales producidos ($\text{spz} \times 10^6$) se obtuvo multiplicando el volumen de cada fracción por su concentración.

Evaluación espermática mediante CASA (Computer Assisted Semen Analysis)

Posteriormente, la motilidad y los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando el software CASA (Computer Assisted Semen Analysis) (ISAS, Integrated Semen Analyser System; Proiser, Valencia, España) y un microscopio de contraste de fases negativa, examinando la muestra a

100x (Nikon Labophot-2; Nikon, Tokyo, Japón). Para la valoración de la motilidad y otros parámetros cinéticos, se colocó una gota de 5 μl en una cámara de contaje Makler (10 μm de profundidad) (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) sobre una platina calefactada a 38 °C. El análisis fue realizado por el sistema CASA con ayuda de microscopía de contraste de fases. Los ajustes estándar utilizados fueron: 25 fotogramas/segundo; área de la cabeza 5 a 50 μm^2 ; y velocidad curvilínea >10 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ para clasificar un espermatozoide como móvil. Un mínimo de 5 campos o 200 espermatozoides fueron considerados para su análisis. Los parámetros registrados fueron: motilidad individual (MI, %; considerando un espermatozoide móvil cuando VCL >10 $\mu\text{m}/\text{seg}$), motilidad progresiva (MP, %; considerando progresivo un espermatozoide cuando velocidad de trayectoria curvilínea (VCL) >25 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y rectitud (STR) >80 %); velocidad media (VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidad de trayectoria recta (VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$), linealidad (LIN, %) y amplitud de movimiento lateral de la cabeza (ALH, μm).

Evaluación espermática mediante citometría de flujo

Las determinaciones de espermatozoides viables (VIAB, %), espermatozoides viables con acrosomas intactos (iACRO, %) y de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (MIT, %) se realizaron con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San Jose, USA), equipado con ópticas estándar y un láser de iones de argón, con funcionamiento a 488 nm y 200 mW. Este citómetro era calibrado periódicamente usando las normas estándar (Calibrites; Becton Dickinson). Se registraron los datos correspondientes a la fluorescencia roja (fotodetector FL3) y verde (fotodetector FL1). Para todos los análisis, se evaluaron 10000 spz por muestra con una velocidad de flujo de 200 células/segundo.

La viabilidad de los gametos se evaluó según el protocolo de García-Macías et al. (2006), utilizando una doble tinción de SYBR-14 (Molecular Probes, L-7011 LIVE/DEAD Sperm Viability Kit; Invitrogen, Barcelona, España) y de yoduro de propidio (PI). Por cada muestra, se tomó en un tubo de polipropileno una alícuota de 300 μL de muestra diluida a 5×10^6 espermatozoides/mL con PBS (tampón fosfato salino), y se añadieron en él 3 μL de PI (24mM) y 1,5 μL de SYBR-14 (100nM). Los tubos permanecieron 20 minutos a 37 °C en condiciones de oscuridad previamente al análisis en el citómetro de flujo. Los espermatozoides muertos se tiñen de rojo (SYBR14-/PI+), mientras que aquellos con membrana plasmática intacta lo hacen de verde (SYBR14+/PI-) y los “moribundos”, es decir, aquellos con la membrana recientemente dañada, se tiñen tanto de verde como de rojo (SYBR14+/PI+). Para este estudio, hemos utilizado los datos de la población de espermatozoides viables (VIAB; SYBR14+/PI-).

Por su parte, para la valoración del estado acrosomal se utilizó una doble tinción de lectina de *Arachis hypogaea* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (PNA) y de de ioduro de propidio (PI). Por cada muestra, se tomó en un tubo de polipropileno una alícuota de 300µL de muestra diluida a 5×10^6 espermatozoides/mL con PBS, y se añadieron 2,53µL de PI (1 mg/mL en agua) y 2,5 µL de PNA (0,2mg/mL en agua). Los espermatozoides se clasifican en no viables (PI+) o viables (PI-) dependiendo de si emiten o no fluorescencia roja, así como en gametos con acrosoma dañado (PNA+) o intacto (PNA-) en función de si se tiñen o no de verde. Para este estudio, hemos utilizado los datos de espermatozoides viables con acrosomas intactos (iACRO; PI-/PNA-).

Por último, el estudio de la actividad mitocondrial se realizó identificando las mitocondrias con alto potencial utilizando JC-1 (Invitrogen, Barcelona, Spain). Las muestras se diluyeron en 300 µL de PBS (5×10^6 espermatozoides/mL), añadiendo JC-1 a 6,8 µM. Tras 30 minutos a 37 °C, se obtuvieron el porcentaje de espermatozoides teñidos de naranja mediante citometría, los cuales corresponden a gametos con alto potencial de membrana mitocondrial (MIT; JC1+).

7. EXPERIENCIA I

ESTRUCTURA SOCIAL DE LOS MACHOS DE OSO PARDO
(Ursus arctos)

7.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental del estudio de la estructura social de los machos de oso pardo se presenta a continuación en la Tabla 7 y la Figura 2. Para su desarrollo, se han utilizado dos tipos de metodologías con distinta cronología, tanto en cuanto a número de años como a periodos designados para la toma de muestras, que corresponden a un estudio etológico o comportamental y a una toma de medidas y muestras biológicas bajo anestesia general.

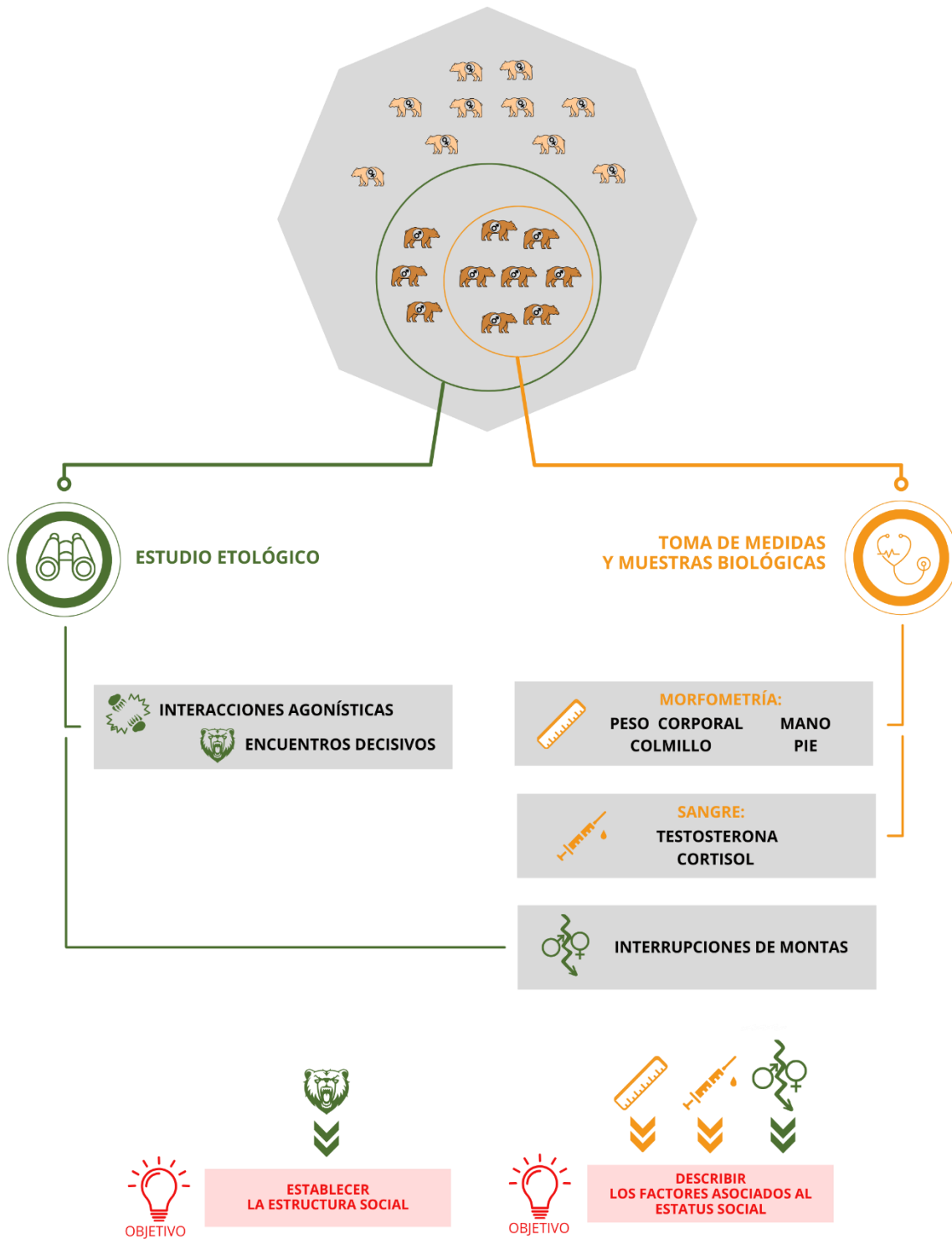
Tabla 7. Diseño experimental del estudio de la estructura social de los machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno.

METODOLOGÍA	CRONOLOGÍA	CONDICIONES DE MUESTREO	Nº INDIVIDUOS	PARÁMETROS EVALUADOS
ESTUDIO ETOLÓGICO	2 años (Enero a diciembre)	282 días de observación (8 a.m. - 13:30 p.m.)	27	Interacciones agonísticas entre machos: fecha, hora, individuos implicados y patrón de comportamiento. "Encuentros decisivos" de la relación de dominancia entre dos machos: fecha, hora, individuos implicados y patrón de comportamiento.
TOMA DE MEDIDAS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS	4 años (Abril a junio)	21 capturas	21	Interrupciones de montas: individuos implicados. Parámetros morfométricos: peso corporal (kg), altura del colmillo (cm), anchura de la base del colmillo (cm), longitud de la base del colmillo (cm), longitud de mano (cm), anchura de mano (cm), longitud de pie (cm), anchura de pie (cm). Hormonas en sangre: cortisol ($\mu\text{g/dL}$) y testosterona (ng/mL).

El estudio etológico de las interacciones agonísticas entre machos adultos, que permite identificar los encuentros decisivos y por tanto la relación de dominancia entre cada par de individuos, se llevó a cabo durante dos años (2011 y 2012) y tuvo como protagonistas a los 27 machos mayores de 3 años de la población. Estos datos permitieron definir el orden jerárquico o estructura social de los machos. La frecuencia de participación de los machos en interrupciones de monta fue también determinada dentro del estudio etológico.

Por otro lado, un total de 21 de esos machos fueron capturados bajo anestesia general durante la época reproductiva de esos dos años, así como el año inmediatamente anterior y el inmediatamente posterior a ellos (2010 a 2013). En cada anestesia (N = 21), se tomaron parámetros morfométricos y endocrinos de dichos individuos, con el objetivo de identificar los factores determinantes de la estructura social previamente descrita.

Figura 2. Diseño experimental del estudio de la estructura social de los machos de oso pardo en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno.



7.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los estudios estadísticos de este manuscrito fueron realizados con el programa SASTM v. 9 (SAS Institute, Cary, NC). Los resultados están expresados como promedio \pm error estándar de la media (SEM) y las diferencias han sido consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

La estructura social del grupo de machos fue evaluada a partir de los resultados de los “encuentros decisivos”, es decir aquellos en los que se puede establecer con claridad el estatus de vencedor y perdedor de las interacciones agonísticas. Estos resultados son organizados en una matriz sobre la que aplica el algoritmo I&IS (Inconsistencies & Total Strength Inconsistencies) definido por Schmid and De Vries (2013). Los citados autores implementaron el algoritmo I&IS sobre una macro del programa Microsoft Excel (paquete DomiCalc) que resulta poco operativa cuando el número de animales es elevado. Para superar esta limitación de cálculo se ha implementado el algoritmo I&IS en lenguaje Python (Figura A1). Asimismo, a fin de incrementar la potencia del resultado final, se ha elevado el número de iteraciones del algoritmo y se ha definido un nuevo resultado en la jerarquía entre individuos emparejando a aquellos individuos cuya posición fue intercambiable en las iteraciones realizadas, modificando el esquema clásico de un orden lineal estricto.

Para el estudio de los factores determinantes de la estructura social de los machos, en una primera evaluación exploratoria se aplicó un análisis de componentes principales (procedimiento PRINCOM) para valorar la relación lineal entre las distintas variables morfológicas y definir la varianza total explicada por dichos componentes. Este estudio puede permitir reducir el número de variables a manejar para discriminar de forma consistente los grupos definidos en el orden jerárquico. En una segunda etapa, la relación entre los distintos parámetros morfológicos previamente analizados, así como otros parámetros endocrinos (testosterona) y comportamentales (interrupciones de montas) con la estructura social previamente descrita se llevó a cabo mediante un análisis multivariante aplicando el procedimiento DISCRIM que permite obtener unas variables canónicas que recogen una alta proporción de la variabilidad del modelo y explican las clases de dominancia definidas.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Establecimiento de la estructura social

En términos generales, los osos se comportaron en base al mantenimiento de una distancia entre individuos de manera que una reacción se desencadenaba cuando esa distancia, diferente para cada par de individuos, no era respetada. La mayoría de las interacciones agresivas tuvieron lugar debido a la violación de esa distancia sin ninguna otra razón aparente. En algunas ocasiones, sin embargo, se pudo establecer una causa directa como la competencia por el alimento o por las hembras. Se observó con relativa frecuencia la finalización de montas coincidiendo con la aproximación de otro individuo (interrupción de montas), normalmente un macho, patrón que pudo ser o no seguido por interacciones agonísticas. No se registró la muerte por agresión intraespecífica de ningún animal mayor de un año de edad durante el periodo de estudio, aunque sí se observó canibalismo sobre cadáveres procedentes de osos de cualquier edad muertos por causas naturales o desconocidas.

Durante el estudio (2 años; Tabla 2), se registraron un total de 637 interacciones agresivas entre machos en 282 días de observación entre enero y diciembre, de las cuales sólo 200 resultaron ajustarse a la definición de encuentro decisivo (31,4 %). Por tanto, no fue posible diferenciar entre oso vencedor y perdedor en la mayoría (68,6 %) de las agresiones. Los encuentros decisivos definidos por el comportamiento “persecución” constituyeron 53 del total de encuentros decisivos (26,5 %). El individuo que resultó dominante fue el que se acercó al otro individuo a la hora de iniciar el encuentro agresivo en 177 de los encuentros decisivos (88,5 %), mientras que el individuo subordinado fue el que abandonó el lugar donde éste tuvo lugar en un total de 128 encuentros decisivos (63,9 %). Además, menos de un cuarto de los encuentros decisivos, concretamente 46 (23 %), incluyeron contacto físico.

La matriz de dominancia resultante para los 200 encuentros decisivos se adjunta como Tabla 8. En ella se presentan las 351 relaciones diádicas o díadas posibles de la subpoblación de machos, que resultan de enfrentar por parejas a los 27 machos diferentes estudiados. Los encuentros decisivos entre machos observados durante el estudio permitieron determinar la relación de dominancia de 114 relaciones diádicas (32,5 %), incluyendo dos relaciones empatadas (Ap-Mm; Bu-Ru), y por tanto 237 díadas tuvieron como resultado una relación de dominancia desconocida (67,5 %). Los datos mostraron 110 relaciones unidireccionales y 4 díadas de doble sentido, incluyendo dentro de estas últimas dos relaciones empatadas. De dichas 110 díadas cuyos encuentros decisivos fueron ganados únicamente por uno de los dos individuos, 38 fueron definidas por más de un encuentro decisivo. De las díadas en las que pudo determinarse el

sentido de su relación de dominancia (N = 112, divididas en 110 relaciones unidireccionales y 2 relaciones de doble sentido no empatadas), la determinación de la relación de dominancia existente entre dos individuos fue más frecuente entre adultos (45,8 % de las posibles relaciones diádicas entre adultos) y muy poco habitual entre subadultos (16,7 % de las posibles relaciones diádicas entre subadultos). El oso adulto fue el dominante en el 88,9 % de las relaciones establecidas para diadas formadas por un adulto y un subadulto.

Según los principios de ordenación de mínimas inconsistencias y fuerza de esas inconsistencias en los que se basa el método I & SI propuesto por de Vries (1998), las posibles ordenaciones de la población de osos macho por rango jerárquico con el mínimo de indonsistencias y fuerza de esas inconsistencias contuvieron sólo tres inconsistencias (G-Ru; Ru-Tm; D-Tm) con fuerza 5, 4 y 3 respectivamente, es decir, la fuerza total de las inconsistencias fue 12.

Tabla 8. Matriz de dominancia para los machos mayores de 3 años de la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno en 2011 y 2012. Las letras hacen referencia a códigos de identificación individuales para cada oso y los códigos subrayados pertenecen a individuos subadultos. Los números indican el número de encuentros ganados por parte del individuo de la fila frente al individuo de la columna en todas las diadas con encuentros decisivos registrados. El orden aquí presentado supone una de las posibles ordenaciones con un mínimo de inconsistencias y fuerza de esas inconsistencias.

Individuo	Da	Co	Tm	Bu	I	D	Ru	<u>Mn</u>	F	Cn	Z	G	B	<u>Ap</u>	T	<u>Jl</u>	K	Mm	Cz	<u>L</u>	<u>Ti</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>Su</u>	<u>Eg</u>	Cu	S	
Da	*	4	9	5	2	1				1				1	2	1				1							1	1
Co	0	*	2			6				1						1								1	1	6	1	
Tm	0	0	*	1	2	1	1		7	3	1	1			1	2	1	1		1	2			4	1	1	2	
Bu	0		0	*		3	1		2	1	1				3	3	2	1			1			2	2	1	2	
I	0		0		*	3	1										1			2			1			4	2	
D	0	0	3	0	0	*			1		1	1	1	1	3		3	2						2	2	1	1	5
Ru			2	1	0		*			1			0											1				
<u>Mn</u>								0		*		1	1														1	
F				0	0			0		*		1			2			1	1								1	
Cn	0	0	0	0	0	0		0		*		1	1						1	1	1		1		1	3		
Z				0	0	0		0	0		*	1	1													1	1	
G				0			1			0	0	*																
B							0				0		*		1					1					1		1	
<u>Ap</u>	0						0			0				*				1	1					2				
T	0		0	0		0		0							*	1												
<u>Jl</u>				0	0								0		0	*							2	3	1			
K	0	0	0	0	0	0											*	1			1							
Mm				0	0	0			0					1		0	*						1				1	
Cz					0				0	0				0					*						1			
<u>L</u>	0		0							0		0								*	1							
<u>Ti</u>				0	0					0						0	0				0	*	1					
<u>P</u>																						0	*					
<u>Y</u>						0	0	0			0				0		0						*					
<u>Su</u>			0	0	0	0								0	0									*				
<u>Eg</u>			0	0	0	0					0		0						0							*		
Cu	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0															*	1	
S	0	0	0	0	0	0					0	0						0							0	*		

Ante la necesidad de agilizar el método de análisis para su uso con un volumen de datos elevado como el nuestro y de añadir la posibilidad de ordenaciones jerárquicas equivalentes y basándonos en la modificación realizada por Schmid & de Vries (2013) del método I & SI originalmente desarrollado por de Vries (1998), en este trabajo proponemos una nueva actualización del método basado en uso del lenguaje Phyton para la aplicación del algoritmo I & SI en la ordenación jerárquica poblacional. Este algoritmo se encuentra disponible en la Figura A1 del apéndice A. En la Figura 3, puede observarse el resultado de la aplicación de este nuevo método sobre los datos obtenidos en el estudio etológico de los osos del Parque de Cabárceno, que constituye una ordenación jerárquica por grupos de individuos de manera que sus posiciones dentro del mismo grupo son intercambiables sin modificarse el número de las inconsistencias generadas y la fuerza de esas inconsistencias. Según este nuevo orden, se pueden establecer tres clases de dominancia: “Dm” o clase dominante, compuesta por 3 osos (Da, Co y Tm); “In” o clase de dominancia intermedia, con 8 individuos (Bu, I, D, Ru, Mn, F, Cn, Z); y “Sb” o clase subordinada se compone de los últimos 16 individuos (S, Cu, Fg, Y, Su, P, Tj, L, Cz, Mm, K, Jl, T, Ap, B y G). Por tanto, la clase dominante constituyó el 11 % de los individuos y la subordinada el 59 %. Un dato a destacar es que los 3 primeros machos de la jerarquía, es decir, los osos del grupo dominante, participaron en el 43 % de los encuentros decisivos y ganaron en el 40,5 % de los encuentros decisivos totales. Por el contrario, los osos de la clase subordinada, a pesar de resultar más de la mitad de los individuos de la población, sólo ganaron un 12,5 % de los encuentros registrados, debido fundamentalmente a la baja participación de los subordinados en encuentros sociales con otros osos del grupo subordinado.

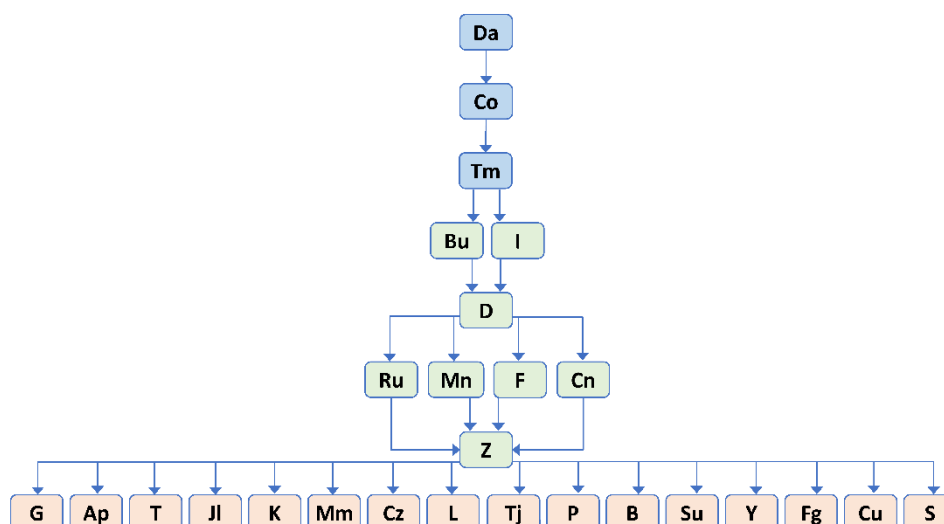


Figura 3. Diagrama de flujo de la ordenación jerárquica para los machos mayores de 3 años de la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno en 2011 y 2012. Las letras identifican a los individuos: en azul, individuos pertenecientes a la clase “Dm” (dominante); en verde, a la clase “In” (intermedia); y en rojo, a la clase “Sb” (subordinada). Dentro de cada clase, un mismo estrato horizontal implica posiciones intercambiables sin modificación del número de inconsistencias ni de su fuerza total.

7.3.2. Descripción de los factores asociados al estatus social

Una vez establecida la ordenación jerárquica de los 27 individuos que constituían la población de machos adultos y subadultos, 21 de ellos fueron utilizados para estudiar los factores relacionados con la estructura social descrita utilizando los datos obtenidos de la toma de medidas y muestras biológicas bajo anestesia general procedentes de una captura por individuo (N = 21), las cuales se realizaron entre 2010 y 2013.

La Figura 4 representa los resultados del análisis de componentes principales de los datos correspondientes a las variables morfométricas: área de la base del diente canino (colmillo), altura del canino, anchura de la mano, longitud de la mano, anchura del pie, longitud del pie y peso corporal. El 70 % de la varianza de los parámetros morfométricos quedó explicada por los componentes principales Prin1 y Prin2. Como puede apreciarse, el componente Prin1 se explica principalmente por las variables peso corporal y dimensiones de manos y pies, mientras que el componente Prin2 se relaciona positivamente con el área del canino y negativamente con su altura.

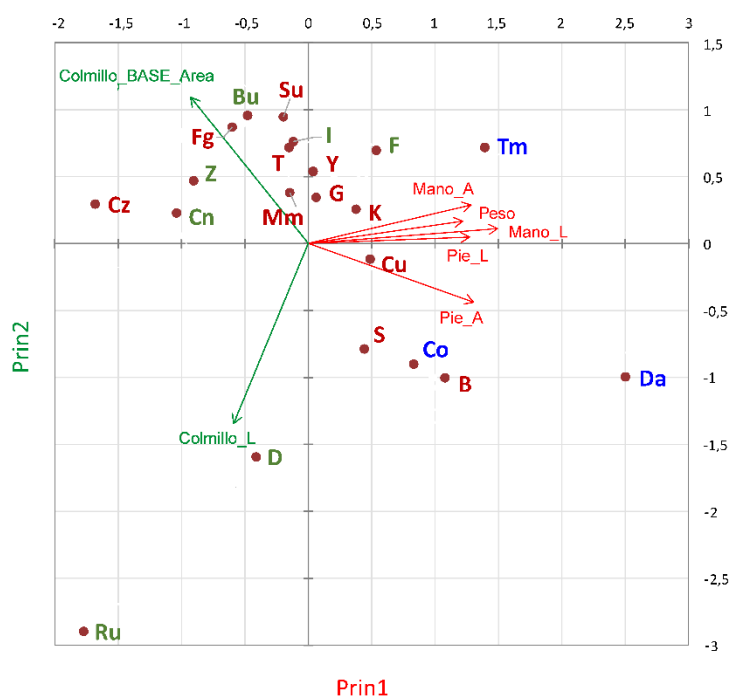


Figura 4. Posición de los machos según los componentes principales Prin1 y Prin2. Las letras identifican a los individuos: en azul, individuos pertenecientes al grupo “Dm” (dominante); en verde, individuos pertenecientes al grupo “In” (intermedio); y en rojo, individuos pertenecientes al grupo “Sb” (subordinado). Se representan los tensores de las variables que definen los componentes principales: Colmillo_BASE_Area = área de la base del canino (cm²); Colmillo_L = altura del canino (cm); Mano_A = anchura de la mano (cm); Mano_L = longitud de la mano (cm); Pie_A = anchura del pie (cm); Pie_L = longitud del pie (cm); Peso = peso corporal (kg).

Las concentraciones medias de cortisol sérico y testosterona sérica fueron de $1,6 \pm 1,1 \mu\text{g/dL}$ y $10,3 \pm 11,6 \text{ ng/mL}$ respectivamente. Las distintas determinaciones para cada macho capturado durante el periodo de estudio pueden observarse en la Figura 5 (Cor_Log y Tes_Log). Los datos revelaron una relación directa entre cortisol y testosterona ($r = 0,54$; $p = 0,01$). Los resultados mostraron también una fuerte influencia quincenal en los perfiles endocrinos, especialmente marcada a partir de mayo.

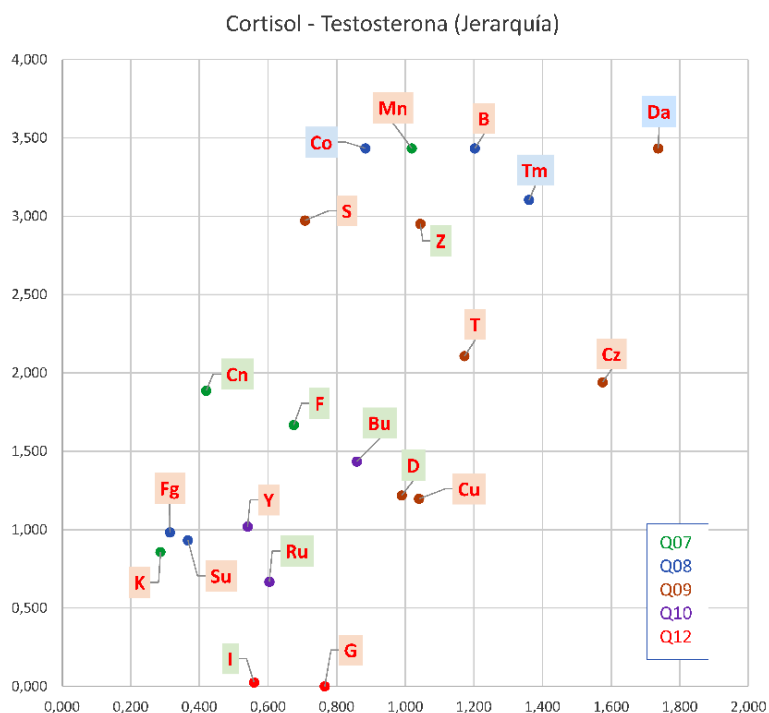


Figura 5. Relación de los valores de cortisol (Cor_Log; eje vertical) y testosterona (Tes_Log; eje horizontal) en 21 machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. Los resultados se expresan como la interacción entre ambas hormonas para cada individuo, identificado por las letras en rojo, las cuales se encuentran encuadradas en un color indicativo de su grupo de dominancia: en azul, individuos pertenecientes al grupo “Dm” (dominante); en verde, individuos pertenecientes al grupo “In” (intermedio); y en rojo, individuos pertenecientes al grupo “Sb” (subordinado). Cada dato ha sido coloreado en función de la quincena en que tuvo lugar la toma de muestra sanguínea. “Q” indica el número de quincena (Q07 a Q12 para las quincenas séptima a decimosegunda).

Por último, se aplicó un análisis canónico para el estudio integral de la organización social de machos de oso pardo en base a los parámetros morfométricos y endocrinos descritos incluyendo un nuevo factor expresado como frecuencia de participación en interrupciones de monta (Figura 6 y Tabla 9). La representación bidimensional de los individuos en los ejes canónicos permite concluir que las variables hormonales, morfológicas y comportamentales estudiadas explicaron claramente el estatus de dominancia de los osos pardos estudiados. En la Tabla 9 se aprecia que el primer eje canónico está definido principalmente por las variables

interrupciones de montas, peso corporal, longitud del pie y nivel de testosterona (Tes_Log); así como indirectamente con la longitud de la mano, la anchura del pie. El segundo eje se caracteriza por la longitud del pie y negativamente por el peso e interrupciones de montas. El análisis multivariante no reveló coeficientes destacables para ninguna de las dos variables asociadas al tamaño de los colmillos. Los valores promedio de cada variable según la clase de dominancia pueden observarse en la Tabla 10. En ella observamos que, en concordancia con lo encontrado en el primer eje canónico, los aspectos en los que los osos dominantes destacaron en mayor medida con respecto a los otros grupos de dominancia fueron principalmente mayores frecuencias de interrupción de montas y mayor peso corporal. En la comparación entre medias también destacan inferiores niveles de testosterona sérica (TesLog), pero con una elevada variabilidad (SEM), en las clases intermedia y subordinada.

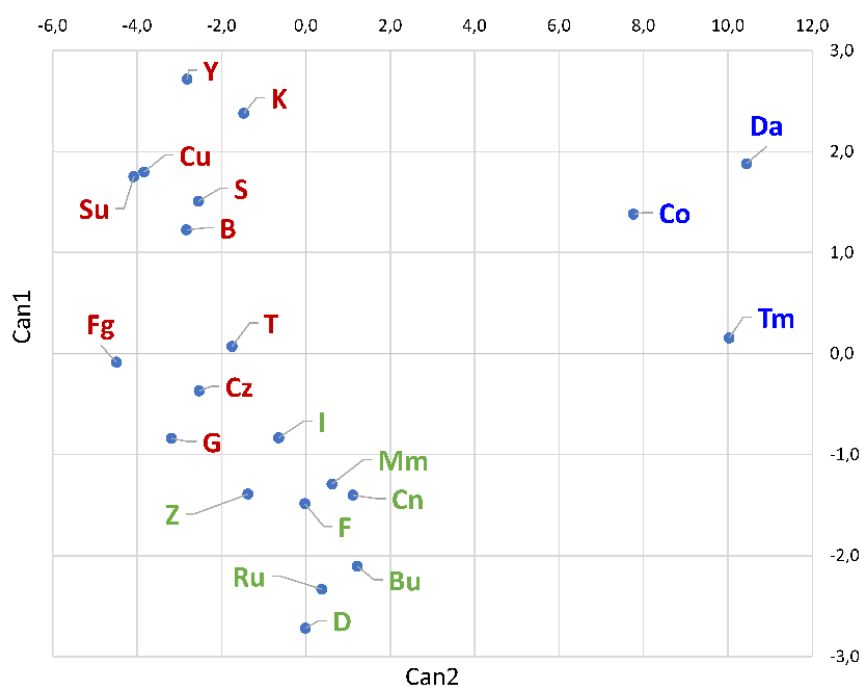


Figura 6. Clasificación del estatus de dominancia de 21 machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno según los componentes Can1 y Can2. Las letras identifican a los individuos: en azul, individuos pertenecientes al grupo "Dm" (dominante); en verde, individuos pertenecientes al grupo "In" (intermedio); y en rojo, individuos pertenecientes al grupo "Sb" (subordinado).

Tabla 9. Coeficientes canónicos estandarizados de la muestra total que indican el peso específico de las diferentes variables analizadas en la clasificación de los individuos en el espacio multidimensional. Colmillo_BASE_Area = área de la base del canino; Colmillo_L = altura del canino; Imonta = interrupción de montas; Mano_A = anchura de la mano; Mano_L = longitud de la mano; Peso = peso corporal; Pie_A = anchura del pie; Pie_L = longitud del pie; Test_Log = logaritmo de la Testosterona.

Coeficientes canónicos estandarizados de la muestra total		
Variable	Can1	Can2
Colmillo_Base_Area	0,292	-0,171
Colmillo_L	0,444	-0,138
Imonta_Da	2,803	-1,189
Mano_A	0,311	0,574
Mano_L	-1,135	0,160
Peso	1,802	-0,876
Pie_A	-1,162	0,629
Pie_L	0,814	1,285
Tes_Log	0,760	-0,036

Tabla 10. Valores medios de las distintas variables morfométricas, hormonales y etológicas empleadas en el estudio multivariante según los grupos de dominancia de los machos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno durante las capturas efectuadas entre 2010 y 2013 (media \pm SEM). Colmillo_BASE_Area = área de la base del canino (cm²); Colmillo_L = altura del canino (cm); Imonta = interrupción de montas (frecuencia); Mano_A = anchura de la mano (cm); Mano_L = longitud de la mano (cm); Peso = peso corporal (kg); Pie_A = anchura del pie (cm); Pie_L = Longitud del pie (cm); Test_Log = logaritmo de la testosterona (ng/mL). “Dm” = clase dominante; “In” = clase intermedia; “Sb” = clase subordinada.

Variable	TOTAL (N = 21)	Dm (N = 3)	In (N = 8)	Sb (N = 10)
Colmillo_Base_Area	2,8 \pm 0,5	2,5 \pm 0,4	3,0 \pm 0,7	2,7 \pm 0,4
Colmillo_L	3,2 \pm 0,8	2,7 \pm 0,8	3,3 \pm 0,9	3,4 \pm 0,8
Imonta_Da	10,4 \pm 22,7	54 \pm 35	6,9 \pm 12,2	0,2 \pm 0,4
Mano_A	17,2 \pm 1,2	19,3 \pm 1,5	16,6 \pm 0,5	17,1 \pm 0,7
Mano_L	15,7 \pm 0,9	16,7 \pm 1,2	15,3 \pm 0,7	15,7 \pm 0,8
Peso	261,1 \pm 31,4	298,7 \pm 22,8	258,3 \pm 33	252,1 \pm 25,8
Pie_A	16,5 \pm 1,0	17,3 \pm 1,2	16,1 \pm 1,2	16,7 \pm 0,7
Pie_L	26,6 \pm 1,9	29,7 \pm 0,6	25,1 \pm 0,8	26,8 \pm 1,4
Test_Log	1,8 \pm 1,2	3,3 \pm 0,2	1,7 \pm 1,1	1,5 \pm 1,1

7.4. DISCUSIÓN

El conocimiento de los determinantes del comportamiento social es esencial para el manejo de fauna silvestre y cautiva, con la finalidad de comprender no sólo el comportamiento y supervivencia individuales sino también tendencias demográficas y ecológicas.

La comprensión del orden jerárquico de una población precisa del reconocimiento de cada uno de sus individuos y de una recogida de datos exhaustiva y extensa, condiciones que limitan la disponibilidad de información para una especie con unas características biológicas como las que posee el oso pardo. Por ello, la mayoría de autores han optado por centrarse en describir la estructura general de la población y el establecimiento de estratos de dominancia por edad y sexo en sus poblaciones o, en su caso, la descripción de clases de dominancia dentro de algunos estratos sin una metodología contrastada (Craighead et al., 1995a; Egbert et al., 1976; Gende & Quinn, 2004; Hornocker, 1962; Peirce & Daele, 2006). Si nos centramos en los machos, los estudios que han ordenado jerárquicamente a todos los individuos de una misma población mediante métodos sistematizados de registro de interacciones agresivas han sido escasos e incluían un bajo número de machos adultos con un máximo de 7 individuos (Koene et al., 2002; Marshall, 2008; Stonorov & Stokes, 1972), lo cual limita el análisis de los determinantes de dominancia. Además, todos ellos derivaban de observaciones de corta duración, con un máximo de 3 meses, y por tanto no permitían determinar el grado de estabilidad de las jerarquías descritas a medio o largo plazo. El estudio más a largo plazo sobre la jerarquía social en un grupo de osos pardos es aquel expuesto por Craighead et al. (1995a), el cual analizó durante 12 años el comportamiento de osos grizzly en un vertedero. Sin embargo, sus resultados no permitieron una ordenación individual de todos los machos ya que, además de utilizar una metodología de dudosa justificación para determinar estratos y relaciones de dominancia, en él no se expusieron los resultados de las relaciones de dominancia diádicas de todos los individuos.

Aquí, se presenta la jerarquía social, determinada por medio de interacciones agonísticas, de 27 machos de una población de oso pardo mantenida en semilibertad durante dos años completos. Hasta donde sabemos, esta es la mayor población de oso en la que todos sus machos han sido ordenados jerárquicamente usando un método basado en la determinación de las relaciones de dominancia utilizando interacciones agresivas. El estudio realizado por Craighead et al. (1995a) también ordenó un elevado número de machos de forma anual, de hasta 30 individuos, pero su metodología no se limitó al resultado de las relaciones diádicas, sino que crearon un sistema de puntos basado en el inicio de las interacciones agonísticas, otorgando mayor situación social a los osos que iniciaban encuentros y en función de ciertas características de los mismos. Este

estudio se basó en patrones de comportamiento indicadores de una relación asimétrica, pero según nuestra experiencia el oso dominante no siempre es el que inicia los encuentros agonísticos por lo que esta metodología da resultados que no parecen óptimos. Las investigaciones realizadas en condiciones de libertad se han desarrollado generalmente en lugares en los que temporalmente existe una elevada concentración de animales debido a la abundancia de recursos alimenticios, lo cual favorece las condiciones para la observación directa de un número suficiente de animales. Sin embargo, allí el número de osos a menudo cambia debido a los movimientos naturales de animales y a la influencia del ser humano, complicando el reconocimiento y estudio de todos los individuos. El Parque de Cabárceno nos ofrece una población de oso pardo controlada y de un tamaño considerable, mantenida en un área naturalizada donde la mayoría de osos pueden ser observados con una frecuencia diaria. Aunque el acceso visual simultáneo a varios animales conlleva irrevocablemente densidades poblacionales elevadas para la especie, y por tanto las interacciones intraespecíficas podrían intensificarse, no existe evidencia de que este hecho pudiera significar la alteración de estructura social.

7.4.1. Establecimiento de la estructura social

La ausencia de un criterio estandarizado válido sobre los comportamientos indicadores de una situación de dominancia en el oso pardo ha hecho necesaria la elección de nuevos comportamientos indicadores para este estudio. La mayoría de autores han defendido como signo de subordinación que un animal abandone el lugar de la interacción (Egbert et al., 1976; Gende & Quinn, 2004; Koene et al., 2002; Peirce & Daele, 2006; Stonorov & Stokes, 1972), pero otros patrones han sido también considerados, por ejemplo: para Egbert et al. (1976), simplemente alterar la dirección del movimiento ante la presencia de otro animal indicaría subordinación; mientras que para Koene et al. (2002) la orientación corporal frente al otro individuo tiene también connotaciones decisivas, de forma que sólo los individuos dominantes mantienen una orientación frontal y sólo los subordinados una lateral. Sin embargo, en nuestro estudio, ninguno de los patrones comentados puede ser considerado, *per se*, signo inequívoco de la posición en la jerarquía social de un macho. Para comenzar, en el área de estudio de Cabárceno, la mayor densidad poblacional y las pequeñas distancias entre individuos a menudo exhibidas dificultan enormemente la determinación de si el movimiento de un oso es causado como reacción al comportamiento de otro individuo concreto. Además, la alteración de la dirección de un movimiento para evitar a otro animal es un indicativo de evitar un confrontamiento, pero lo que se ha observado en el grupo de machos estudiado es que no

necesariamente tiene que tratarse de un enfrentamiento con un animal dominante. Además, en un ambiente con elevada densidad poblacional como el que se describe en el área de observación sería impensable que todos los animales mantuviesen una dirección de movimiento en la que no se tuviese en cuenta la posición de otros individuos, y considerar dichas posiciones generaría un número inviable de interacciones. Del mismo modo, ambas orientaciones corporales, frontal y lateral, han sido observadas en ambos individuos durante un mismo enfrentamiento. Los dos patrones de comportamiento adoptados para indentificar los encuentros decisivos elegidos para este estudio fueron designados debido a que implican un desplazamiento simultáneo de ambos individuos de la díada en sentidos contrarios, y a que resultaron fáciles de identificar, asegurándonos así que todos los encuentros en los que se mostraba alguno de los dos comportamientos serían incluidos en el estudio como encuentros decisivos. El uso de comportamientos indicadores de dominancia distintos, junto con las características concretas de cada población, explicarían por qué algunos autores (Koene et al., 2002; Stonorov & Stokes, 1972) difieren de nuestros hallazgos en cuanto a la baja frecuencia con la que puede determinarse el sentido de la dominancia entre los individuos que participan en un enfrentamiento agonístico encontrada en Cabárceno. Además, la mayoría de autores usan patrones basados en el desplazamiento del animal subordinado ya que, en esos estudios, las interacciones intraespecíficas suelen estar motivadas por la posesión de un lugar preferente para la obtención de alimento. Sin embargo, en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno fue común que el oso dominante abandonase el sitio del enfrentamiento y por tanto las interacciones parecieron responder más a la exhibición de superioridad como parte de una estrategia de mantenimiento del estatus que al interés en un lugar físico concreto. La hipótesis de la señalización de estatus como principal motivo de enfrentamiento agonístico es en parte apoyada por el hecho de que los encuentros fueron más frecuentemente iniciados por machos dominantes que por subordinados. Egbert et al. (1976) y Stonorov & Stokes (1972) también encontraron el patrón de aproximación más común en el oso dominante de cada pareja, incluso considerando comportamientos distintos como indicadores de subordinación pero Craighead et al. (1995a) fueron más allá y directamente utilizaron este patrón de comportamiento para indicar dominancia de un individuo sobre otro, lo cual, como comentábamos, no sería apropiado en la población aquí estudiada.

Los tres machos situados en la cúspide de la jerarquía en Cabárceno ganaron el 40,5 % de los encuentros decisivos. Esto significa que los osos dominantes son más propensos a mostrar su estatus y posiblemente también a manifestar comportamientos agresivos. Aunque otros indicadores de agresividad individual deberían ser analizados para probar esta segunda

hipótesis, existen numerosas referencias a mayor agresividad en los machos de oso pardo que se sitúan en la cumbre de la jerarquía de dominancia (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962; Marshall, 2008). Por otra parte, es importante tener en cuenta que, aunque los comportamientos elegidos han demostrado ser indicadores exitosos del estatus de dominancia entre machos de oso pardo, otros patrones etológicos podrían ser considerados.

Del mismo modo, los machos adultos del Parque de Cabárceno tendieron a mostrar comportamientos que les señalan como dominantes más a menudo (89 % de las díadas en las que se registraron encuentros decisivos) que los machos subadultos, salvo algunas excepciones individuales. El carácter subordinado de los individuos más jóvenes es un hallazgo consistente en la mayoría de especies de mamíferos, incluyendo al oso pardo (Egbert et al., 1976; Peirce & Daele, 2006; Stonorov & Stokes, 1972). Varios parámetros relacionados con la edad, como mayor peso corporal y superiores habilidades en la lucha, han sido también frecuentemente señalados como importantes determinantes a la hora de decidir el estatus social. En este sentido ha de tenerse en cuenta que los osos pardos tiene un ritmo de crecimiento lento y los machos pueden tardar 14 años en alcanzar el 95 % de su peso máximo (Schwartz et al., 2003).

Los machos subadultos no estuvieron involucrados en encuentros decisivos tan a menudo como los adultos, y los encuentros decisivos entre dos subadultos fueron especialmente infrecuentes (5 %). Se necesitarían nuevos estudios para determinar si los osos jóvenes no exhiben comportamientos indicativos de dominancia o si lo hacen mediante medios distintos a los patrones aquí tomados como indicativos de relación unidireccional de dominancia o incluso mediante medios distintos a las agresiones. Las muestras de dominancia o agresividad infrecuentes en animales de menor edad coinciden con los hallazgos de Hornocker (1962b), que afirmó que la dominancia no fue activamente ejercida en las clases de edad más jóvenes, así como los de Egbert et al. (1976), que señalaba a los machos de entre cuarto y octavo año como los menos agresivos de todos los grupos de sexo y edad. Nuestra hipótesis consiste en la existencia de una relación de dominancia entre todas las díadas posibles de la población, es decir, que todos los individuos son subordinados o dominantes a cada uno del resto de los individuos de la población, pero que esta relación no ha podido ser determinada en base a los patrones de comportamiento utilizados como indicadores de dominancia (“avance frontal” y “persecución”). Las abundantes interacciones de juego social registradas podrían ser el medio por el cual esas relaciones se estableciesen y mantuviesen, sin necesidad de mostrar comportamiento agresivo. Tal teoría coincide con lo indicado por Colmenares & Rivero (1983), quienes describieron una relación de tolerancia entre los dos machos adultos más jóvenes de un grupo de oso pardo cautivo, los cuales participaban en juegos cuyo resultado determinaba

en gran medida las prioridades del orden de monta a la hora de compartir hembras. Los juegos de lucha constituirían de este modo otro sistema para establecer el estatus social, lo cual, en sociedades de reproducción cooperativa, a menudo ocurre a edades tempranas. Incluso, en algunas especies el carácter dominante puede ser heredado de los progenitores (Rees, 2011).

La organización social del grupo de machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno ha resultado ser muy estable durante dos años, ya que existió un número muy pequeño de relaciones de doble sentido. Más de un tercio de las díadas fueron descritas por al menos dos encuentros decisivos y tan sólo cuatro de ellas han resultado no ser relaciones unidireccionales. Esta pequeña frecuencia de díadas de doble sentido puede atribuirse a osos más jóvenes intentando mejorar su posición en la escala jerárquica porque siempre incluyeron un oso viejo y otro oso más joven y agresivo. No tenemos conocimiento de ningún estudio de duración mayor de un año en el que se haya asignado individual y mediante una metodología objetiva y sistemática el rango jerárquico de todos los machos de oso pardo de una población. No obstante, Egbert et al. (1976) ya hablaron de una organización social “relativamente estable” durante tres años en un arroyo con abundancia de salmones visitado por cerca de 70 osos grizzly, y Hornocker (1962) también afirmó que la estructura general de la población de osos de Tout Creek, en Yellowstone, no varió en 3 años. Contrariamente a nuestros resultados, Craighead et al. (1995a) identificaron un periodo anual de ajuste social durante la época reproductiva y la necesidad de reestablecer el estatus social cada año, también en los osos de Yellowstone. Aunque la metodología para respaldar que la dominancia interanual en Yellowstone era altamente variable es dudosa ya que la distinción entre las dos principales clases sociales, denominadas “contenders” y “noncontenders”, se basa en qué individuo inicia las interacciones agresivas, sí que establece un procedimiento sistemático en base al registro de amenazas y ataques entre los machos más agresivos. Craighead et al. (1995a) hablaron de 7 “machos alfa” diferentes a lo largo de 13 años en la población de osos pardos de Yellowstone, incluyendo un individuo que ostentó el título durante 6 años interrumpidos en dos periodos de tres años. Esto da idea de una estabilidad relativa en la cumbre de la pirámide jerárquica. En nuestro caso, el mismo macho con mayor rango de dominancia ostentó el título durante dos años y observaciones fuera de este estudio revelaron que siguió siendo dominante durante al menos dos años más. Sin embargo, nuestro estudio va más allá y es capaz de demostrar estabilidad no sólo en la cumbre de la pirámide jerárquica sino en la totalidad de las relaciones entre machos mayores de 3 años de la población. Esto supone un importante hallazgo para comprender la sociobiología de las especies solitarias. Incluso después de periodos invernales de aislamiento en los que suceden profundos cambios morfológicos y fisiológicos, los machos de oso pardo

conviviendo en grupos cerrados conservan en líneas generales su estatus social. Nuestra hipótesis, a la vista de las complicaciones para realizar un estudio de estas características en libertad, sería que tal tendencia a la estabilidad también existiese en osos de vida libre y que no tuviese lugar un restablecimiento anual de la jerarquía, siempre teniendo en cuenta las menores probabilidades de volver a interactuar con individuos con los que existe una relación de dominancia preestablecida.

Hasta la fecha, los métodos desarrollados con la finalidad de ordenar individuos en orden jerárquico se basan en la presunción de linealidad. Sin embargo, la expresión de esa linealidad depende del número de relaciones establecidas y del grado en el que dichas relaciones resultan transitivas (De Vries et al., 2006). Debido a que la aplicación de estos métodos a datos obtenidos experimentalmente significa, en la casi totalidad de los casos, la posibilidad de varios órdenes alternativos que cumplen las premisas establecidas, resulta razonable considerar que los métodos de ordenación jerárquica deberían considerar la posibilidad de la existencia tanto de poblaciones con jerarquías no lineales, como de casos en los que no se dispone de datos suficientes o apropiados para el establecimiento de un orden lineal. La falta de información entre díadas es una de los mayores problemas en la investigación de la dominancia (Klass & Cords, 2011). En el Parque de la Naturaleza de Cabárceno, tras 840 horas dedicadas a la observación de comportamiento agonístico no fue posible valorar dos tercios de las posibles relaciones, y la falta de información fue especialmente intensa en los últimos estratos sociales de la población. Gende & Quinn (2004), en una población sin machos adultos, obtuvieron un porcentaje máximo anual de díadas en las que fue posible valorar la relación de dominancia exacto al nuestro, mientras que Marshall (2008) registró interacciones entre la mitad de los posibles pares de individuos de su población. Por otra parte, la falta de evidencia de una estructura jerárquica lineal ha sido apuntada previamente en oso pardo Marshall (2008), y la existencia de inconsistencias y relaciones triangulares habituales en algunos estudios, como el de Egbert et al. (1976), apoyarían tal hipótesis. En nuestra población, los individuos con más díadas de relación desconocida fueron los menos dominantes, pero las escasas relaciones de doble sentido o que suponen inconsistencias sucedieron en estratos de la población superiores, sin incluir a los dos osos más dominantes. Hornocker (1962) llegó a afirmar que no existía un orden de dominancia dentro de las clases más subordinadas de su población, pero, como ya comentábamos anteriormente, podría existir la posibilidad de que los animales del grupo subordinado, que son en su mayoría animales jóvenes o de edad avanzada, expresasen sus relaciones de dominancia por mediante patrones comportamentales diferentes.

A la vista de tales resultados, hemos considerado oportuno que, en la práctica, las jerarquías deberían considerar grupos de animales en lugar de animales individuales cuando las posiciones de dos o más de ellos puedan intercambiarse, de manera que se representen de una única forma todas las posibilidades de las distintas ordenaciones con mínimas inconsistencias y fuerza de las inconsistencias de la misma población. Esto permite evitar situar en una posición superior a un individuo con comportamiento social equivalente a otro, y en nuestro caso el perfecto ejemplo serían las parejas de osos sin encuentros decisivos registrados. En los machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno el resultado es una pirámide jerárquica con tres individuos dominantes cuya ordenación es lineal estricta (clase Dm), encabezados por tanto por un macho alfa, y con un amplio nivel inferior (clase Sb) constituyendo la base. Se puede encontrar un antecedente en la creación de clases de dominancia en las investigaciones de Craighead et al. (1995a) y Hornocker (1962), pero tales estudios no muestran un método comparable al nuestro para su establecimiento. A pesar de ello, podemos observar que el porcentaje medio de individuos dentro del estrato dominante, que en su caso fue del 23 %, fue notoriamente mayor que el nuestro, que consistió en un 11 %. Por otra parte, Gende & Quinn (2004) utilizaron los mismos términos que nosotros para definir tres estratos de dominancia entre los osos pardos que acudían a varios arroyos con abundancia de recursos alimenticios: dominante, intermedio y subordinado. Sin embargo, al encontrar dificultades para su ordenación jerárquica completa, optaron por distinguir a la clase dominante sólo como un individuo y a la clase subordinada como individuos sin encuentros ganados y que hubiesen participado en un mínimo de 4 interacciones. Esta clasificación puede no ser incorrecta, pero la falta de la aplicación de un método de análisis más preciso conlleva la pérdida de información en la estructuración de la población. Existen varios programas de software disponibles para diversos métodos de análisis utilizados para matrices sociométricas. Aquí, se emplea el programa DomiCalc (Schmid and De Vries, 2013) originalmente presentado como una macro en Excel que ha sido reescrito en el lenguaje de programación Phyton e incluye algunas nuevas funciones para permitir la creación de jerarquías por grupos de individuos.

7.4.2. Descripción de los factores asociados al estatus social

En este estudio se han minimizado los efectos de la edad, sexo y familiaridad con el área, con el fin de centrar la atención en la relación de las características físicas, endocrinas y etológicas con el rango social de los machos de oso pardo. Para la descripción de los determinantes de estructura social, además de utilizar los datos procedentes de los dos años en los que se determinó la jerarquía de dominancia, también se han utilizado el año anterior y el siguiente,

debido a que se considera que la fuerte estabilidad de la dominancia en esos dos años permite mantener la clasificación, con un mínimo error asociado, al menos a los años contiguos. Existen además observaciones de encuentros decisivos en dichos años que avalan a grandes rasgos el mantenimiento del orden social descrito (datos propios no publicados).

Para el estudio del perfil hormonal en su relación con el estatus de dominancia, en el presente estudio sólo se han incluido datos tomados entre abril y junio con el fin de minimizar el efecto de las variaciones anuales en la actividad gonadal y endocrina en general. En los machos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno, existen datos acerca de un ritmo anual muy marcado en la concentración sanguínea de testosterona (Anel-López et al., 2017b; Manrique-Revuelta, 2010). Por su parte, los niveles de glucocorticoides, como ya explicábamos anteriormente, pueden sufrir ritmos circadianos en el oso pardo (Ware et al., 2013) y panda (Owen et al., 2005), y además se encuentran influidos por la alimentación (Bryan et al., 2013; Bryan et al., 2014; Owen et al., 2005), y distintos aspectos relacionados con la anestesia (Esteruelas et al., 2017; Ware et al., 2013). En el presente estudio y con el fin de minimizar los numerosos factores con capacidad para modular el perfil endocrino de los machos, sólo se han utilizado datos de osos mantenidos en condiciones de semilibertad, alimentados con la misma dieta, pertenecientes a la misma población cerrada, anestesiados utilizando las mismas drogas y cuyo muestreo sanguíneo ocurrió sistemáticamente en un estrecho rango horario.

Resulta llamativo que los registros más bajos de testosterona hayan sucedido durante la quincena 12 (junio) en nuestro estudio. Esto coincide con lo detectado en otros estudios que analizaron testosterona en esta población y que describían valores disminuidos de T a partir de la quincena 11 en los machos de oso pardo de la población de Cabárceno (Anel-López et al., 2017b; Manrique-Revuelta, 2010). Estos resultados resaltan la necesidad del estudio exhaustivo de las diferencias en las hormonas testosterona y cortisol asociadas a la estacionalidad reproductiva como un primer paso fundamental para la comprensión del peso de dicho factor y de otros factores individuales en las variaciones encontradas. Los tres osos más dominantes tienen tendencia a poseer elevados niveles de testosterona y cortisol. La tendencia de una relación positiva entre testosterona y rango social estaría en consonancia con lo encontrado en un amplio rango de especies, y más frecuentemente en especies de crianza cooperativa (Mehta et al., 2008). Aunque la población de osos de Cabárceno no utiliza tal sistema social, sí que viven en un grupo cerrado al igual que los que se forman en dicho tipo de especies. Sin embargo, la tendencia positiva entre rango jerárquico y testosterona entraría en conflicto con la teoría de Mehta et al. (2008) que abogaba por que tal relación pudiese desaparecer en poblaciones con una jerarquía estable, como es la encontrada en los machos de

la población de osos pardos de Cabárceno. Por otro lado, un aumento de glucocorticoides puede considerarse la consecuencia de la subordinación o el coste de adquirir y mantener un estatus de dominancia según la teoría de la carga alostática (Goymann & Wingfield, 2004). Por tanto, a la vista de los resultados se podría sugerir que, cuando conviven en grupo, ser dominante es más costoso en términos de estrés social para animales que pertenecen a una especie caracterizada por un comportamiento inicialmente solitario y sexualmente promiscuo. Hasta la fecha, la mayoría de las investigaciones han estudiado la testosterona y el cortisol de manera independiente, pero los resultados no han sido homogéneos. Teorías recientes han propuesto la posibilidad de un cierto nivel de interacción entre testosterona y cortisol en la regulación del comportamiento de dominancia. Mehta & Josephs (2010) encontraron evidencias de esta hipótesis en el hombre mostrando que testosterona y dominancia estaban positivamente relacionadas, pero sólo en individuos con bajos niveles de cortisol. Las conclusiones aquí presentadas sobre oso pardo coinciden en la relación directa entre cortisol y testosterona, aunque sin discriminar entre resultados en función de los niveles de cortisol. La evidencia de interacciones biológicas como la encontrada entre cortisol y testosterona nos lleva a considerar, en el contexto de la jerarquía social, el uso análisis de tipo multivariante, que permite incluir un amplio rango de variables en el análisis de la regulación del comportamiento.

En la población de oso pardo del Parque de Cabárceno, el análisis canónico revela que parámetros morfométricos (peso corporal, longitud y base del colmillo, longitud y anchura de manos y pies), endocrinos (testosterona) y etológicos (interrupción de montas) son en conjunto predictores del orden de dominancia. Por tanto, sugerimos que, en el futuro, en otras especies también se utilicen diversas variables de esta naturaleza para explicar tales efectos, como un método efectivo para identificar factores asociados a la dominancia.

La hipótesis del tamaño de los colmillos como ventaja en el combate no ha sido apoyada por el análisis canónico, en el cual ni el área de la base ni la longitud de los colmillos han sido variables con un marcado peso específico en el análisis. A pesar del menor promedio de la longitud de los caninos observada en los osos dominantes, una elevada variabilidad en los datos de las otras dos clases de dominancia ha podido influir en los resultados del análisis multivariante. Quizás un ajuste de los datos en función del desgaste asociado a la edad, como el que realizaron Galbany et al. (2015) en papiones, sería necesario para arrojar resultados más concluyentes. Aunque las medidas de las extremidades podrían ser indicativas del tamaño corporal y además los osos pardos utilizan las manos, en ocasiones en posición bípeda, en sus enfrentamientos agonísticos, las variables con mayor peso específico para la discriminación entre clases de dominancia son la frecuencia de interrupciones de monta y el peso corporal. Las interrupciones

de monta se muestran por tanto como un comportamiento relacionado con un estatus superior de dominancia, que exhiben mucho más a menudo los tres individuos de la clase dominante. Significan una aproximación directa hacia la pareja que está realizando una monta y la finalización de ésta. Sin embargo, las interrupciones de montas pueden ser promovidas por las hembras, no implican necesariamente patrones de comportamiento de huida del individuo que se encuentra montando y en ocasiones derivan en un enfrentamiento agonístico. Por tanto, los machos que estaban montando no siempre evitan de forma efectiva un enfrentamiento agonístico, lo cual sería lo esperable en animales subordinados a aquel que se le aproxima. El peso corporal, por otra parte, sería la variable más indicativa del tamaño corporal, aunque también puede estar influida por la condición corporal. El uso de mediciones entre abril y junio ha intentado disminuir las variaciones anuales en el peso corporal, ampliamente demostradas en el oso pardo (Hellgren, 1995; Kingsley et al., 1983; Manrique-Revuelta, 2010; Pearson & Halloran, 1972). A pesar de ser un aspecto muy a menudo relacionado con el estatus social, los datos en oso pardo sobre la relación entre peso corporal con el grado de dominancia son escasos y pobremente contrastados. En la única aproximación disponible en la literatura, realizada por Craighead et al. (1995a), el limitado tamaño muestral de los datos sólo hizo posible observar una tendencia no estadísticamente significativa de un mayor peso corporal y mayores tamaños de manos y pies en los osos dominantes. No conocemos ningún otro estudio que haya tenido en cuenta una posible relación la jerarquía en el oso pardo con parámetros cuantitativos indicativos de tamaño corporal o de las partes del cuerpo utilizadas en la lucha. En oso pardo, un mayor tamaño corporal sí ha sido relacionado con una mayor frecuencia de paternidad en los machos, pero aún se desconoce el papel de la jerarquía de dominancia en un fenómeno tan complejo como es el éxito reproductivo. Una aproximación más estrecha hacia nuestras conclusiones en otros úrsidos es la que deriva del estudio de Nie et al. (2012), que señalaron mejores resultados en los enfrentamientos agonísticos en relación a un mayor tamaño corporal.

En resumen, el estudio de la jerarquía social de los machos de oso pardo y sus determinantes resulta un aspecto fundamental de su comportamiento social que puede darnos las claves para comprender aspectos importantes de su biología reproductiva como el acceso a parejas sexuales o posibles influencias en la calidad seminal. Anteriores descripciones de la estructura social en los machos de oso pardo basados en la determinación del sentido de la dominancia entre interacciones agonísticas incluían un número bajo de machos adultos y ninguno de ellos había realizado un análisis cuantitativo de los determinantes de dominancia. En un grupo cerrado como es el que habita en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno, el análisis de las interacciones

agonísticas demuestra por primera vez una jerarquía estable en el tiempo en el oso pardo, al menos durante dos años, para los 27 machos mayores de tres años de la población. Esta población, caracterizada por un elevado número de individuos y por la falta de información de la relación de dominancia entre un número importante de pares de individuos, ha servido como modelo para la mejora de los métodos de establecimiento de dominancia disponibles. La implementación del uso del lenguaje Python en el análisis basado en el método de Schmid & de Vries (2013), ajustado a la posibilidad de situaciones de igualdad de dominancia, mejora la agilidad del análisis y permite el establecimiento de grupos de dominancia en los que los individuos son intercambiables cuando su situación no permite determinar una relación de dominancia estrictamente lineal. Tal y como sugiere la bibliografía disponible, los osos dominantes (N = 3) son más propensos a mostrar su estatus, y la clase subordinada (N = 16) es la más numerosa, la que contiene a la mayoría de los subadultos y en la que existe una menor incidencia de encuentros agonísticos decisivos de la relación de dominancia. El análisis multivariante de diversos parámetros morfométricos, así como del comportamiento de interrupción de las montas de otras parejas y de la testosterona como principal modulador endocrino clasifica a los machos en función de su situación jerárquica. Las variables con mayor peso específico a la hora de explicar el estatus social de los machos son el peso corporal y la frecuencia de participación en interrupciones de montas, lo cual sugiere por un lado que el peso, siempre que se tengan en cuenta sus variaciones estacionales, es el indicador más fiable de superioridad física por encima del tamaño de manos, pies y colmillos; y por otro, que el estatus social favorece de forma directa el acceso a las hembras que se encuentran en la fase sexualmente receptiva de su ciclo.

8. EXPERIENCIA II

**RITMO REPRODUCTIVO ANUAL DE LOS MACHOS DE OSO
PARDO (*Ursus arctos*)**

8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental del estudio del ritmo reproductivo anual de los machos de oso pardo se presenta a continuación como la Tabla 11 y la Figura 7. Del mismo modo que para el estudio de la estructura social, para su desarrollo se han utilizado dos tipos de metodologías: un estudio etológico o comportamental y una toma de medidas y muestras biológicas bajo anestesia general.

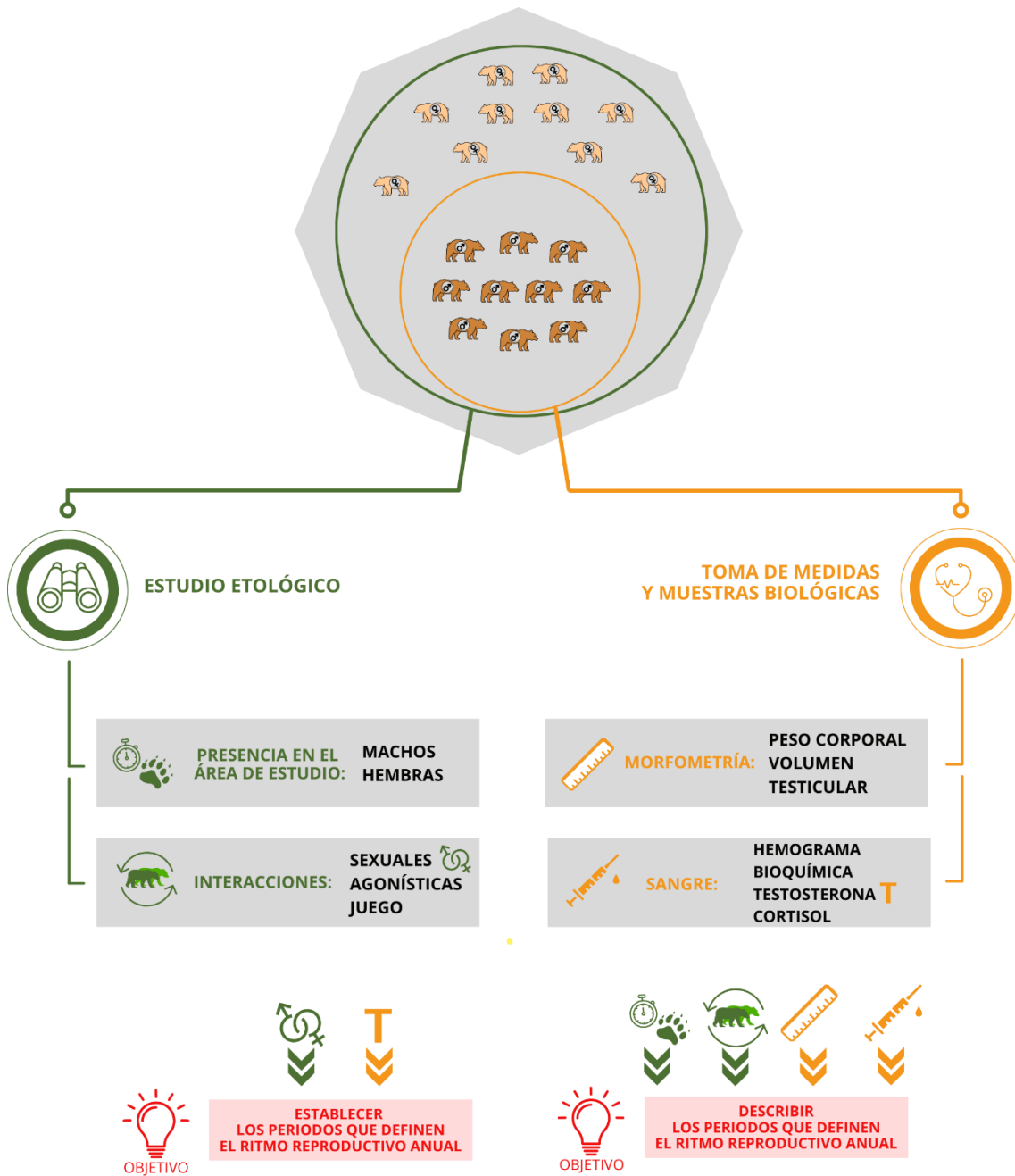
El estudio etológico incluyó parámetros determinados mediante observación ininterrumpida durante dos horas (8 a.m. a 10 a.m.), siempre teniendo en cuenta que durante la observación no ocurriesen eventos antropológicamente mediados dentro del recinto de los osos. Se registraron la presencia de individuos al comienzo y final de la observación, así como el número de interacciones sexuales, agonísticas y de juego.

Para la toma de medidas y muestras biológicas, se realizaron un total de 311 eventos anestésicos o capturas sobre un total de 39 machos distintos. Las determinaciones de hormonas en sangre se realizaron sobre 38 de esos individuos, mientras que los parámetros del hemograma y bioquímica sobre 32 y 30 de ellos, respectivamente.

Tabla 11. Diseño experimental del estudio del ritmo reproductivo anual de los machos de oso pardo en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno.

METODOLOGÍA	CRONOLOGÍA	CONDICIONES DE MUESTREO	Nº INDIVIDUOS	PARÁMETROS EVALUADOS
ESTUDIO ETOLÓGICO	5 años (Enero a diciembre)	314 días de observación. Dos horas ininterrumpidas cada día (8 a.m. a 10 a.m.)	Población completa (74)	Presencia total de osos en el "área de observación" a las 8 a.m y a las 10 a.m.
				Presencia de machos en el "área de observación" a las 8 a.m y a las 10 a.m.
				Interacciones sexuales en el "área de observación" en las que participa una hembra adulta entre las 8 a.m. y 10 a.m.: fecha, hora, individuos implicados y patrón de comportamiento.
				Interacciones agonísticas en el "área de observación" entre las 8 a.m. y 10 a.m.: fecha, hora, individuos implicados y patrón de comportamiento.
TOMA DE MEDIDAS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS	15 años (Febrero a noviembre)	311 capturas	39	Parámetros morfométricos: peso (kg), eje longitudinal de ambos testículos (cm), eje transversal de ambos testículos (cm).
	15 años (Febrero a noviembre)	272 capturas	38	Hormonas en sangre: cortisol ($\mu\text{g/dL}$) y testosterona (ng/mL).
	9 años (Febrero a noviembre)	238 capturas	32	Bioquímica sanguínea: proteínas totales (g/dL); glucosa (mg/dL); colesterol (mg/dL).
	4 años (Febrero a octubre)	111 capturas	30	Hemograma: Eritrocitos ($10^6/\mu\text{l}$); hemoglobina (g/dL); hematocrito (%); plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$); leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$); neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$); linfocitos ($10^3/\mu\text{l}$); monocitos ($10^3/\mu\text{l}$); basófilos ($10^3/\mu\text{l}$).

Figura 7. Diseño experimental del estudio del ritmo reproductivo anual de los machos de oso pardo en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno.



8.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los parámetros etológicos, morfológicos y endocrinos que caracterizan a los machos han sido analizados aplicando un método lineal generalizado (procedimiento MIXED) con el fin de evaluar el efecto de los periodos reproductivos. Del mismo modo, se ha aplicado un método lineal generalizado (procedimiento MIXED) para analizar los parámetros “número de montas” y “testosterona” según quincenas.

Asimismo, un análisis de correlaciones (procedimiento CORR) fue aplicado para determinar la relación lineal (coeficientes de Pearson) entre los parámetros morfológicos y sanguíneos estudiados.

8.3. RESULTADOS

Todos los machos participaron en interacciones sexuales, agresivas y de juego.

Durante los 314 días de observación entre enero y diciembre que constituyeron este estudio (5 años; Tabla 4), se registraron un total de: 960 montas, 1299 interacciones agonísticas en las que al menos uno de los participantes fue macho y 753 interacciones de juego en las que al menos uno de los participantes fue macho. Los machos interactuaron de forma agresiva más frecuentemente con hembras que con machos, contabilizándose 488 agresiones entre machos (38 %), frente a las 811 observadas entre un macho y una hembra (62 %). De entre las agresiones perpetuadas por un macho y una hembra, 47 de ellas (6 %) tuvieron como hembra participante a una osa con un oseño dependiente. Contrariamente, los machos interactuaron de forma amistosa más frecuentemente con machos que con hembras, contabilizándose un total de 597 juegos entre machos (79 %), frente a los 156 observados entre un macho y una hembra (21 %). Anecdóticamente, de ellos tan sólo dos juegos fueron observados entre un macho y una hembra con oseños dependientes.

Los valores medios de los parámetros del hemograma y bioquímica sanguínea, así como de los niveles séricos de hormonas (15 años; Tabla 5), pueden consultarse en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores medios de los parámetros del hemograma y bioquímica sanguínea y de los niveles séricos de testosterona y cortisol de los machos de oso pardo en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno.

	N	Media ± SEM	Mín. - Máx.
Eritrocitos (10⁶/μl)	111	6,8 ± 0,1	2,9 - 10,9
Hemoglobina (g/dL)	111	16,8 ± 0,3	7,4 - 26,8
Hematocrito (%)	111	46,7 ± 0,9	19,2 - 73,5
Plaquetas (10³/μl)	97	364,3 ± 13,7	24,0 - 940,0
Leucocitos (10³/μl)	111	10,3 ± 0,4	2,3 - 43,0
Neutrófilos (10³/μl)	83	7,6 ± 0,3	2,5 - 18,1
Linfocitos (10³/μl)	94	1,3 ± 0,1	0,2 - 3,1
Monocitos (10³/μl)	83	0,5 ± 0,0	0,0 - 1,9
Eosinófilos (10³/μl)	83	0,8 ± 0,1	0,0 - 3,5
Basófilos (10³/μl)	83	0,0 ± 0,0	0,0 - 0,1
Proteínas totales (g/dL)	237	7,6 ± 0,1	4,4 - 10,1
Glucosa (mg/dL)	202	127,5 ± 2,7	64,2 - 299,3
Colesterol (mg/dL)	238	260,3 ± 4,0	72,6 - 454,0
Cortisol (μg/dL)	232	3,6 ± 0,3	0,0 - 27,3
Testosterona (ng/mL)	262	5,9 ± 0,5	0,0 - 30,0

8.3.1. Establecimiento de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo

A continuación, se analizará la evolución de la concentración de testosterona y del número de montas como base para delimitar periodos del ritmo biológico anual del oso pardo.

8.3.1.1. Ritmo anual de la concentración de testosterona sérica

Como puede apreciarse en la Tabla 13, la concentración de testosterona sérica (T) se mantuvo en niveles bajos, menores de 5 ng/mL, desde junio hasta marzo ($p > 0,05$ entre todas las quincenas de junio a marzo) y distintos o que tienden a ser distintos a los mostrados en abril y mayo ($p < 0,05$ de las quincenas entre junio a marzo si los comparamos con Q07, Q08, Q09 y Q10 excepto entre Q07 y Q17 ($p = 0,07$), y entre Q09 y Q22 ($p = 0,05$)). En abril, T tuvo una evolución ascendente, siendo la primera quincena de abril, es decir Q07, menor a las dos quincenas siguientes ($p < 0,01$ con Q08 y $p < 0,05$ con Q09). Los niveles máximos del año sucedieron en Q08 y fueron estadísticamente mayores que el resto de quincenas ($p < 0,05$), excepto que Q09 ($p > 0,05$).

8.3.1.2. Ritmo anual del comportamiento reproductivo

La fecha más temprana en la que se observó comportamiento de cópula que implicase a una hembra adulta fue el 5 de marzo y la más tardía el 23 de agosto. Sin embargo, las cópulas fueron muy escasas durante la primera quincena de marzo y la última de agosto, de forma que sólo fueron descritas en el 11 % y el 15 % de los días de observación, respectivamente (Figura 8). Entre marzo y agosto, se registró comportamiento sexual en 181 de los días de observación (72,1 %). En la Figura 8, el total de las sesiones de observación en cada día del año se corresponde con la suma de las observaciones con y sin montas para la misma, siendo 5 el máximo posible para cada día ya que el estudio tuvo 5 años de duración. El año con una época reproductiva más extensa (2012) tuvo 157 días de duración desde la primera a la última monta.

Como puede observarse en la Tabla 13, la segunda quincena de abril y el mes de mayo registraron la mayor intensidad en las interacciones de monta (>5 montas/día de observación). Si comparamos el número de días con registro de número de montas (Figura 8) con su intensidad, podemos ver cómo en las quincenas anterior (Q07) y posteriores (Q11, Q12) a este pico de actividad sexual, aunque se observan montas en más del 80 % de los días de observación, el número de montas en cada observación se encuentra considerablemente reducido.

Tabla 13. Variación quincenal de la concentración de testosterona sérica (ng/mL) de los machos y del número de montas en el área de estudio (observación diaria entre las 8:00 a.m. y las 10:00 a.m.).

Quincena	Concentración de testosterona (ng/mL)				Número de montas			
	Número de muestras	Media ± SEM	Mínimo	Máximo	Número de días de observación	Media ± SEM	Mínimo	Máximo
Q01	0				6	0,0 ± 0,0	0	0
Q02	0				5	0,0 ± 0,0	0	0
Q03	4	0,4 ± 0,2	0,0	0,7	4	0,0 ± 0,0	0	0
Q04	4	1,3 ± 0,8	0,1	3,6	9	0,0 ± 0,0	0	0
Q05	10	2,4 ± 1,3	0,0	13,6	18	0,1 ± 0,1	0	1
Q06	12	3,3 ± 0,9	0,5	11,2	20	0,8 ± 0,3	0	4
Q07	34	8,6 ± 1,6	0,3	30,0	19	3,7 ± 0,6	0	8
Q08	33	16,4 ± 1,8	0,7	30,0	26	7,0 ± 1,0	0	17
Q09	27	12,0 ± 1,9	1,4	30,0	23	6,6 ± 0,9	0	16
Q10	28	7,2 ± 1,7	0,0	30,0	27	8,9 ± 1,3	1	28
Q11	41	1,7 ± 0,4	0,0	11,4	26	4,1 ± 0,5	0	11
Q12	22	0,6 ± 0,3	0,0	4,6	20	3,6 ± 0,5	0	8
Q13	11	0,5 ± 0,2	0,0	1,4	27	2,6 ± 0,7	0	16
Q14	12	0,5 ± 0,2	0,0	2,2	28	1,6 ± 0,6	0	15
Q15	0				4	2,8 ± 1,6	0	6
Q16	4	0,1 ± 0,1	0,0	0,3	13	0,2 ± 0,1	0	1
Q17	2	0,4 ± 0,4	0,0	0,8	4	0,0 ± 0,0	0	0
Q18	3	0,3 ± 0,3	0,0	0,9	5	0,0 ± 0,0	0	0
Q19	9	0,9 ± 0,8	0,0	6,9	5	0,0 ± 0,0	0	0
Q20	5	0,0 ± 0,0	0,0	0,1	4	0,0 ± 0,0	0	0
Q21	0				3	0,0 ± 0,0	0	0
Q22	1	0,7	0,7	0,7	5	0,0 ± 0,0	0	0
Q23	0				5	0,0 ± 0,0	0	0
Q24	0				8	0,0 ± 0,0	0	0
Total	262	5,9 ± 0,5	0,0	30,0	314	3,0 ± 0,2	0	28

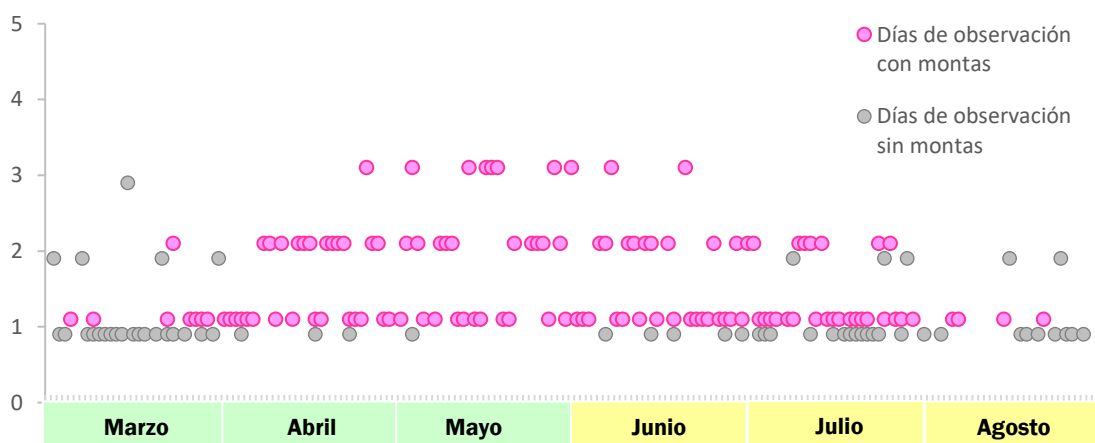


Figura 8. Distribución temporal de los días de observación del total de las 251 sesiones de observación de 2 horas de duración (5 años) realizadas durante la época reproductiva en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno para el estudio etológico, en función de si existió registro de montas.

8.3.1.3. Delimitación de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo

El análisis previo de la concentración de testosterona y del número de montas nos permite delimitar 5 periodos diferentes en el ritmo biológico anual de los osos pardos (Figura 9), denominados:

- "PreB" o periodo previo a la época reproductiva (Pre-Breeding): quincenas primera a cuarta;
- "EB" o periodo reproductivo temprano (Early Breeding): quincenas quinta a séptima;
- "PB" o periodo reproductivo central (Peak Breeding): quincenas octava a décima;
- "LB" o periodo reproductivo tardío (Late Breeding): quincenas undécima a decimosexta; y
- "PostB" o periodo posterior a la época reproductiva (Post-Breeding): quincenas decimoséptima a vigesimocuarta.

Por tanto, la época reproductiva se encuentra dividida en tres periodos (EB, PB y LB), mientras que la no reproductiva está compuesta por los dos restantes (PreB y PostB). Así, observamos cómo el tercer y último periodo de la época reproductiva tuvo la duración de la mitad de la misma, lo cual indica un comienzo de la reproducción más brusco que su final.

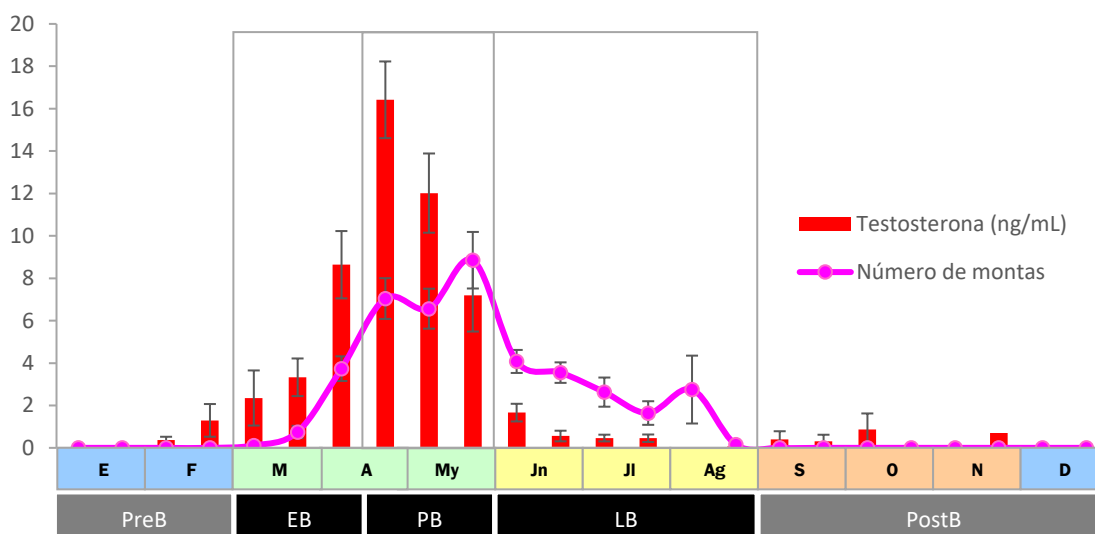


Figura 9. Número de montas por observación (N = 314 observaciones; 5 años) y concentración de testosterona sérica (ng/mL) (N = 264; 15 años), por quincenas, en la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media \pm SEM). "PreB": periodo previo a la época reproductiva; "EB": periodo reproductivo temprano; "PB": periodo reproductivo central; "LB": periodo reproductivo tardío; "PostB": periodo posterior a la época reproductiva.

8.3.2. Descripción de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual en los machos de oso pardo

El patrón de comportamiento circadiano de la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno mostró un aumento de la presencia de osos en el área de estudio comportamental desde las 8 a.m. hasta las 10 a.m (Figura A2). Este aumento sucedió en la mayoría (98,4 %) de los días de observación, correspondiendo las únicas excepciones a observaciones realizadas en enero, en las que los valores de presencia de osos observados fueron 0 o 1. Este hecho refleja el incremento de la concentración de animales en la zona a medida que se desarrolla cada día de observación, propiciado por la cercanía en el tiempo del momento de la administración de alimento.

A continuación (Tabla 14), se muestran las condiciones climáticas registradas para cada periodo durante el estudio etológico. El periodo en el que se registraron máximas temperatura, humedad relativa e insolación fue LB, mientras que la época no reproductiva, y en especial PreB, se caracterizaron por mayores registros de precipitaciones y menores de insolación y temperatura.

Tabla 14. Parámetros climáticos (media \pm SEM) durante el periodo de estudio etológico (5 años). “PreB”: enero y febrero, “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre.

Periodo	Temperatura media (°C)	Precipitación (L/m ²)	Humedad relativa a las 7 a.m. (%)	Insolación total diaria (h)
PreB	9,9 \pm 0,2	4,5 \pm 0,3	78,3 \pm 0,9	2,7 \pm 0,2
EB	12,1 \pm 0,2	3,1 \pm 0,2	79,1 \pm 1,0	5,0 \pm 0,3
BS	14,8 \pm 0,2	2,9 \pm 0,2	79,3 \pm 0,8	5,6 \pm 0,4
LB	19,6 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	83,8 \pm 0,4	6,8 \pm 0,3
PostB	15,2 \pm 0,2	3,9 \pm 0,2	79,6 \pm 0,6	3,6 \pm 0,2
Total	15,0 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	80,3 \pm 0,3	4,7 \pm 0,1

8.3.2.1. Descripción de las variaciones anuales en el comportamiento asociadas a la estacionalidad reproductiva

Todos los tipos de comportamiento estudiados manifestaron diferencias estacionales, bien entre todos los periodos descritos (presencia total de osos y presencia de machos; Figura 10) o bien entre alguno de los los periodos descritos (comportamiento sexual (ICS; Figura 11); comportamiento agresivo, tanto en el que participa al menos un macho (ICA_M) como entre dos machos (ICA_{m-m}) (Figura 12); y comportamiento de juego, tanto en el que participa al menos un macho (ICJ_M) como entre dos machos (ICJ_{m-m}) (Figura 13)). La Tabla A1 muestra la evolución de todos los parámetros etológicos estudiados.

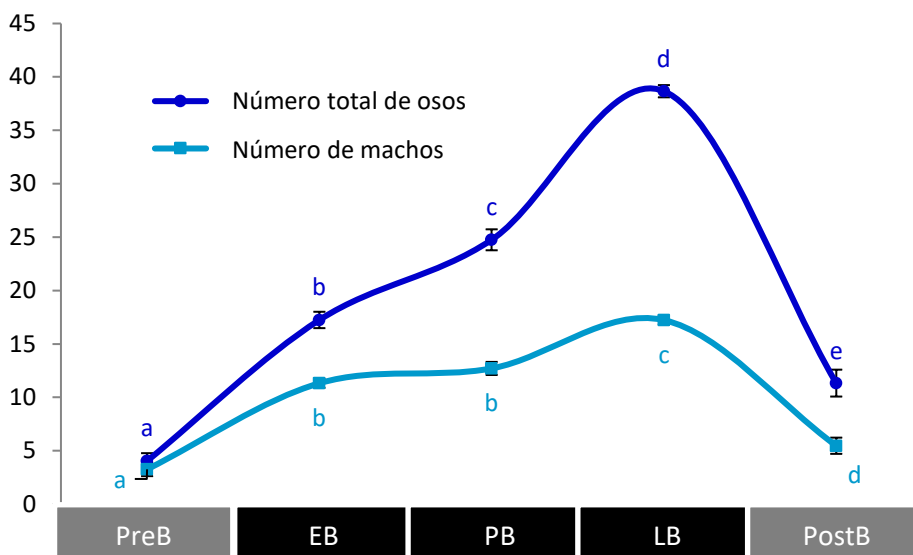


Figura 10. Número total de osos y número de machos presentes en el área de estudio a las 10 a.m. en la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media \pm SEM). “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

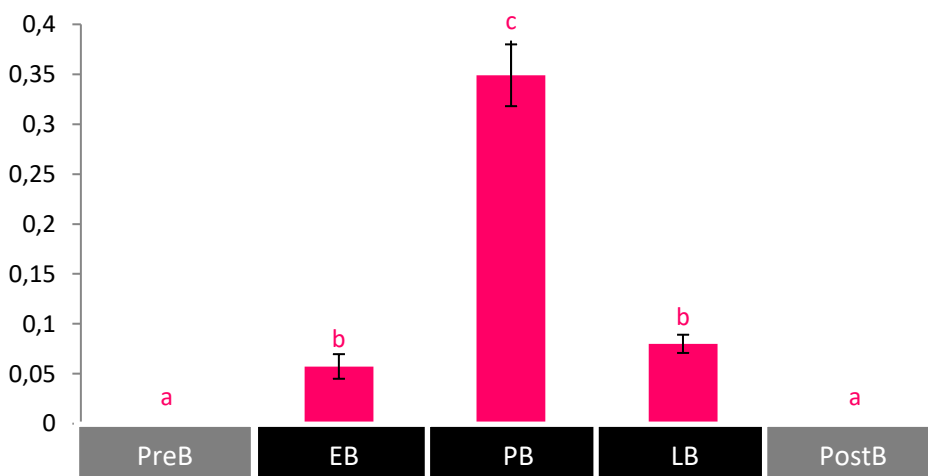


Figura 11. Índice de comportamiento sexual (ICS) en la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media \pm SEM). $ICS = (S / (M+H)) / (M / H)$. S: Número de montas; M: Número de machos; H: Número de hembras. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

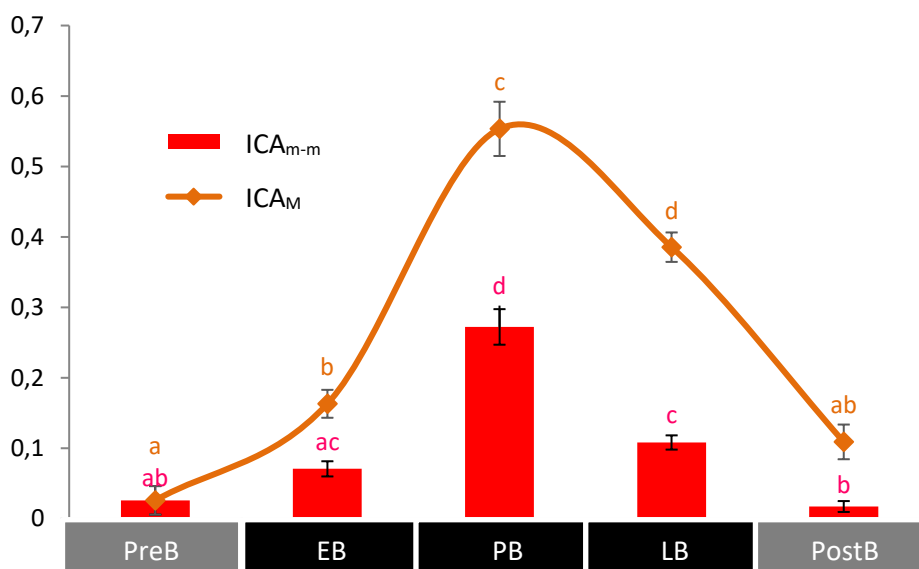


Figura 12. Índices de comportamiento agresivo (ICA_M: Índice de comportamiento agresivo de machos; ICA_{m-m}: Índice de comportamiento agresivo entre machos) en la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media ± SEM). ICA_M = A_M / M; ICA_{m-m} = A_{m-m} / M. A_M: Número de interacciones agresivas en las que participa al menos un macho; M: Número de machos; A_{m-m}: Número de interacciones agresivas en las que los dos participantes son machos. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos (p < 0,05).

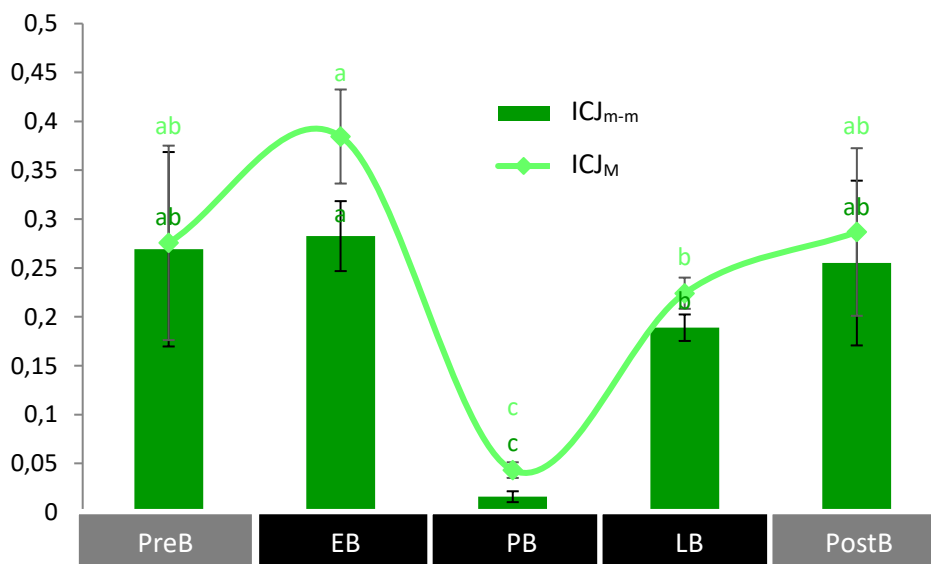


Figura 13. Índices de comportamiento de juego (ICJ_M: Índice de comportamiento de juego de machos; ICJ_{m-m}: Índice de comportamiento de juego entre machos) en la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media ± SEM). ICJ_M = J_M / M; ICJ_{m-m} = J_{m-m} / M. J_M: Número de interacciones de juego en las que participa al menos un macho; M: Número de machos; J_{m-m}: Número de interacciones de juego en las que los dos participantes son machos. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos (p < 0,05).

Entre los periodos PostB y PreB, que constituyen la época no reproductiva, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los tipos de comportamiento estudiados (sexual, agresivo y de juego). Esta época no reproductiva se caracterizó por una presencia de machos y de individuos totales muy baja ($p < 0,01$ con respecto a los periodos de la época reproductiva) aunque significativamente mayor en PostB con respecto a PreB ($p < 0,05$ para la presencia de machos y $p < 0,01$ para la presencia total) y por un nivel de interacciones amistosas mayor que de interacciones agonísticas. El componente agonístico de los machos fue el más bajo del año y prácticamente nulo excepto para las interacciones entre machos y hembras en PostB. Por su parte, durante la época no reproductiva el componente de juego de los machos fue similar al periodo reproductivo inicial y tardío ($p > 0,05$ para PreB y PostB en comparación con EB y LB en todos los casos).

Durante el periodo EB, la presencia de machos en el área de estudio creció con respecto a PreB ($p < 0,01$), y éstos siguieron participando en menor medida en interacciones agonísticas en comparación con las interacciones de juego. La frecuencia de actividad agresiva fue similar a PostB en términos de agresividad general de los machos ($p > 0,05$) y a PreB para las agresiones en las que sólo participan machos ($p > 0,05$). Por el contrario, la frecuencia de juego de los machos fue similar a los dos periodos restantes que constituyen la época no reproductiva ($p > 0,05$).

El periodo PB se caracteriza por tener tendencia a una mayor presencia de machos en el área de estudio que en EB ($p = 0,06$). Los patrones de comportamiento sufrieron un cambio drástico, invirtiéndose la proporción entre el comportamiento social agresivo y amistoso. Este periodo se caracterizó por alcanzar los mayores niveles de comportamiento de monta y de agresión intraespecífica de los machos, y los menores niveles de comportamiento de juego de los machos con respecto a todos los periodos restantes del ciclo anual del oso pardo ($p < 0,01$ en todos los casos). Esto sucedió tanto para el comportamiento agresivo y de juego en donde participa algún macho como en donde sólo participan machos. La frecuencia de comportamiento de juego entre machos fue prácticamente inexistente durante PB.

Durante el periodo LB, se volvió a una frecuencia de actividad sexual similar a EB ($p > 0,05$). La presencia de osos en el área de estudio, tanto total como por sexos, fue la mayor observada ($p < 0,01$ en todos los casos excepto para la presencia de machos entre EB y PB ($p = 0,06$)), con la particularidad de que se trata del único periodo con una proporción de individuos presentes en el área de estudio menor de machos que de hembras. Entre PB y LB, los machos redujeron su agresividad significativamente tanto a nivel general como para el comportamiento agresivo hacia otros machos ($p < 0,01$). A pesar de esta reducción, aún mostraron niveles importantes de

agresividad, que para el caso de la agresividad general de los machos (ICA_M) fueron mayores que los que sucedieron en EB ($p < 0,01$). Sin embargo, el comportamiento agonístico exhibido hacia otros machos sólo aumentó en forma de tendencia ($p = 0,07$) entre los periodos equivalentes al comienzo y final de la época reproductiva. Por su parte, la frecuencia de comportamiento de juego de los machos aumentó en LB con respecto a PB, tanto para el comportamiento de juego en el que participa al menos un macho como para el comportamiento de juego en el que los dos participantes son machos ($p < 0,01$ en ambos casos), aunque ésta aún fue menor que la observada durante EB ($p < 0,01$).

8.3.2.2. Descripción de las variaciones anuales en parámetros morfológicos y fisiológicos asociadas a la estacionalidad reproductiva

Las Tablas A2, A3 y A4 y las figuras 14 a 18 muestran la evolución de todos los parámetros morfológicos y fisiológicos estudiados.

Peso corporal y volumen testicular

Tanto el peso corporal como el volumen testicular experimentaron profundos cambios graduales a lo largo del año (Figura 14). Desde valores máximos durante la época no reproductiva (PostB y PreB), el peso sufrió un descenso progresivo hasta su mínimo al final de la época reproductiva (LB). Durante el pico de actividad reproductiva (PB) y LB, sus valores fueron similares ($p > 0,05$) e inferiores a los del resto del año ($p < 0,01$ en todos los casos). El fin del comportamiento sexual significó un aumento marcado en el peso de los osos, con diferencias entre las medias de 80,2 kg (23,8 %) entre LB y PostB ($p < 0,01$). Durante esta época previa al letargo invernal, el peso de los machos fue similar al exhibido en la época posterior al mismo ($p > 0,05$), sin embargo, sí fue significativamente mayor que en la época reproductiva ($p < 0,01$ en todos los casos). El volumen testicular, por el contrario, mostró sus cifras máximas durante la época reproductiva central y mínimas durante la época no reproductiva. Existió una correlación positiva ($p < 0,01$; $r = 0,32$) entre el volumen testicular y los niveles de testosterona (Tes_Log). Si nos centramos sólo en su evolución durante la época reproductiva, podemos observar cómo en el volumen testicular la época reproductiva inicial (EB) y PB mostraron valores similares ($p > 0,05$) y significativamente mayores que los de LB ($p < 0,05$). Durante este final de la época reproductiva, el volumen testicular no se vio significativamente alterado respecto a la época no reproductiva, aunque sí mostró una tendencia a ser menor que durante PreB ($p > 0,05$ para PostB y $p = 0,07$ para PreB).

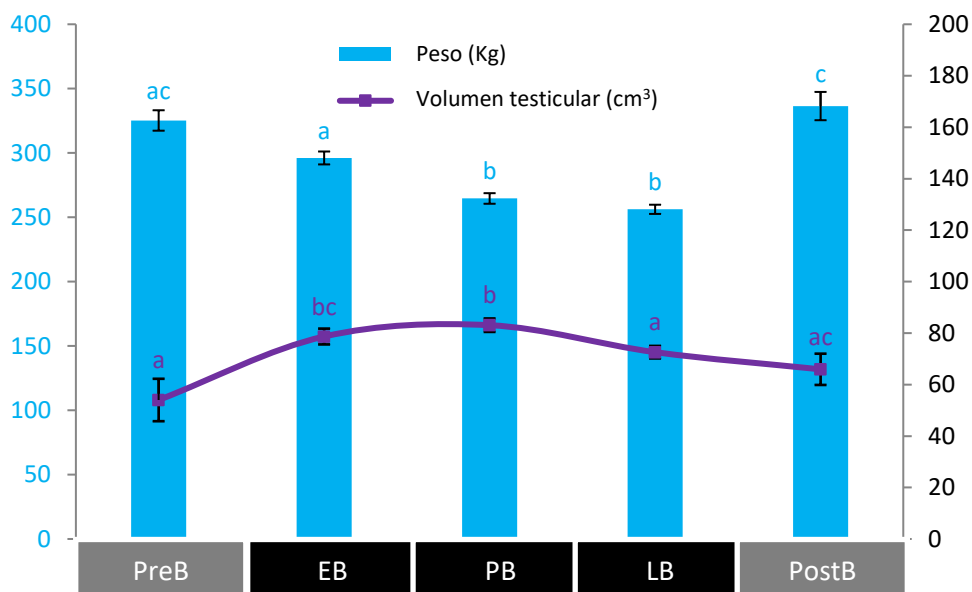


Figura 14. Peso corporal y volumen testicular de los machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media \pm SEM). “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

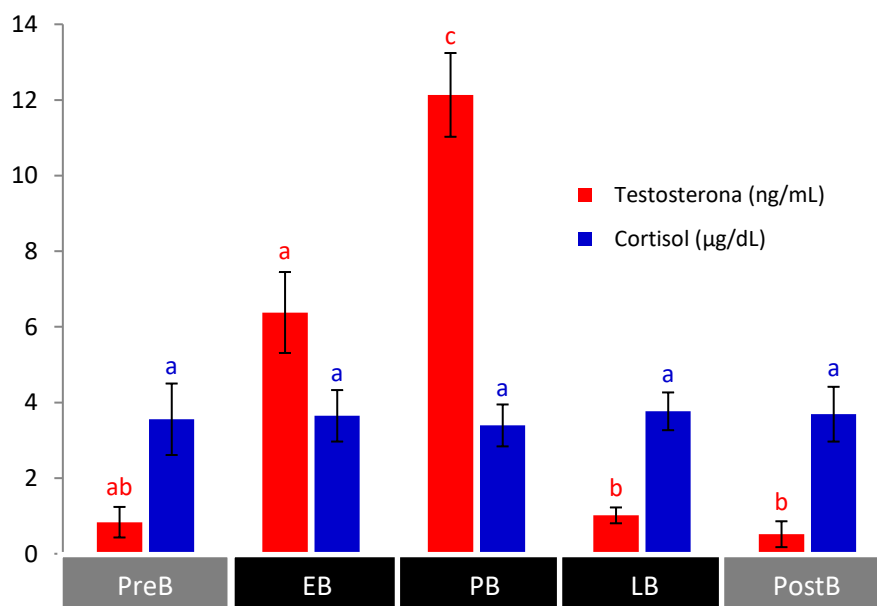


Figura 15. Concentración sérica de testosterona y cortisol de los machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media \pm SEM). “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

Testosterona y cortisol

Los niveles hormonales en sangre mostraron variaciones estacionales estadísticamente significativas para la testosterona (T), pero no para el cortisol (Figura 15). La concentración de testosterona fue similar entre PreB y EB ($p > 0,05$) y alcanzó sus niveles máximos durante la época central de apogeo del comportamiento sexual, los cuales fueron estadísticamente significativos a los del resto del año ($p < 0,01$ en todos los casos). Entre PB y LB, T disminuyó drásticamente ($p < 0,01$), de manera que también fue menor en LB que en EB ($p < 0,01$). Los bajos niveles mostrados durante LB se mantuvieron estadísticamente similares durante la época no reproductiva ($p > 0,05$ tanto entre LB y PostB como entre PostB y PreB y entre LB y PreB).

Hemograma y bioquímica

La evolución de los parámetros del hemograma y la bioquímica sanguínea puede observarse en las Figuras 16, 17 y 18.

Los parámetros de la serie roja y plaquetaria no mostraron diferencias significativas durante la época reproductiva (Figura 16). En la serie roja, tan sólo pudo observarse una tendencia a la disminución en PostB para los eritrocitos ($p = 0,08$ entre LB y PostB) y la hemoglobina ($p = 0,09$ entre LB y PostB, y $p < 0,05$ entre EB y PostB). Las plaquetas también sufrieron un descenso durante este periodo previo al letargo invernal, que en este caso sí fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

La serie blanca, por su parte, sí mostró cambios asociados a la estacionalidad reproductiva (Figura 17). La evolución del promedio del número total de leucocitos, neutrófilos y monocitos progresó paralelamente hasta septiembre, exhibiendo un patrón ascendente en sus concentraciones desde el comienzo del año hasta sus valores máximos coincidiendo en el pico de actividad sexual, pero esta evolución no fue estadísticamente significativa salvo para los monocitos entre EB y PB ($p < 0,05$). Los valores de los tres parámetros descendieron después de forma significativa ($p < 0,01$ entre PB y LB tanto para leucocitos como neutrófilos y monocitos) durante el resto de la época reproductiva (LB). Los eosinófilos, por su parte, sufrieron una evolución contraria, de forma que sus valores disminuyeron hasta mínimos registrados en PB ($p = 0,11$ entre PreB y EB; $p < 0,01$ entre EB y PB) y se recuperaron significativamente durante LB ($p < 0,01$ entre PB y LB). Sin embargo, los cambios en el número de linfocitos circulantes sólo fueron significativos al comparar los decrecientes niveles entre el principio y final de la época reproductiva ($p < 0,05$).

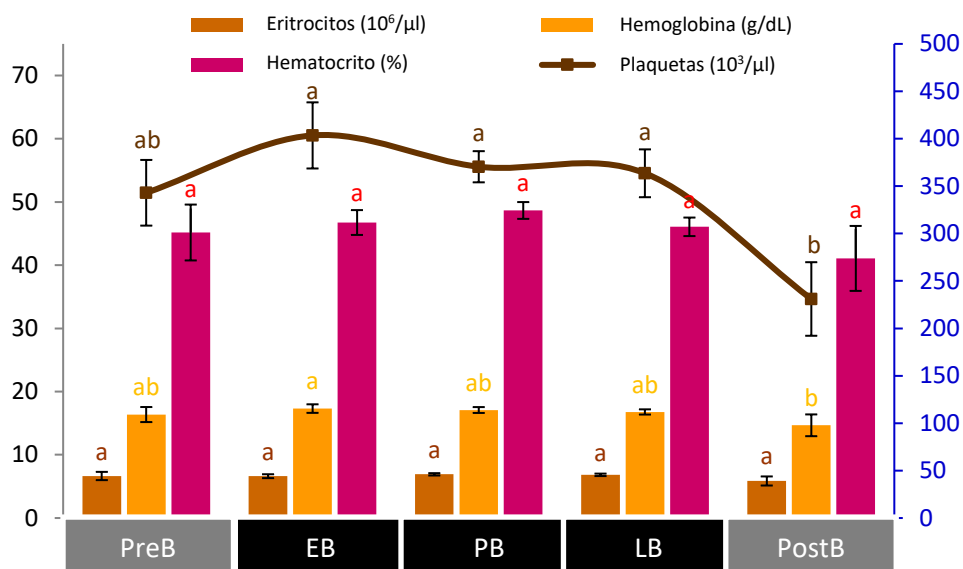


Figura 16. Parámetros de la serie roja y plaquetaria de los machos de oso pardo en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media \pm SEM). La graduación del eje secundario (en azul) sólo se aplica para la variable Plaquetas. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

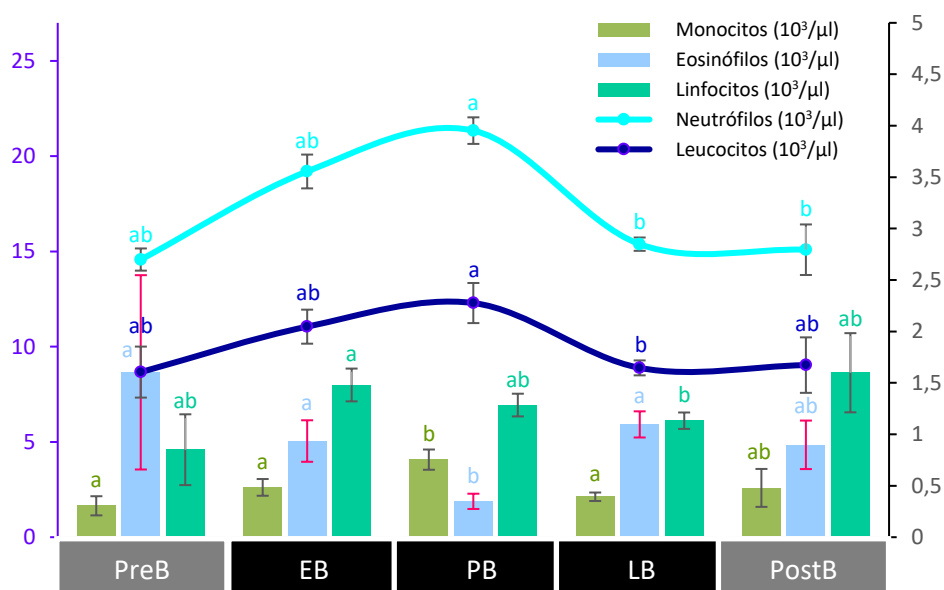


Figura 17. Parámetros de la serie blanca en machos de oso pardo en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media \pm SEM). La graduación del eje de ordenadas izquierdo sólo se aplica a Leucocitos y Neutrófilos. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

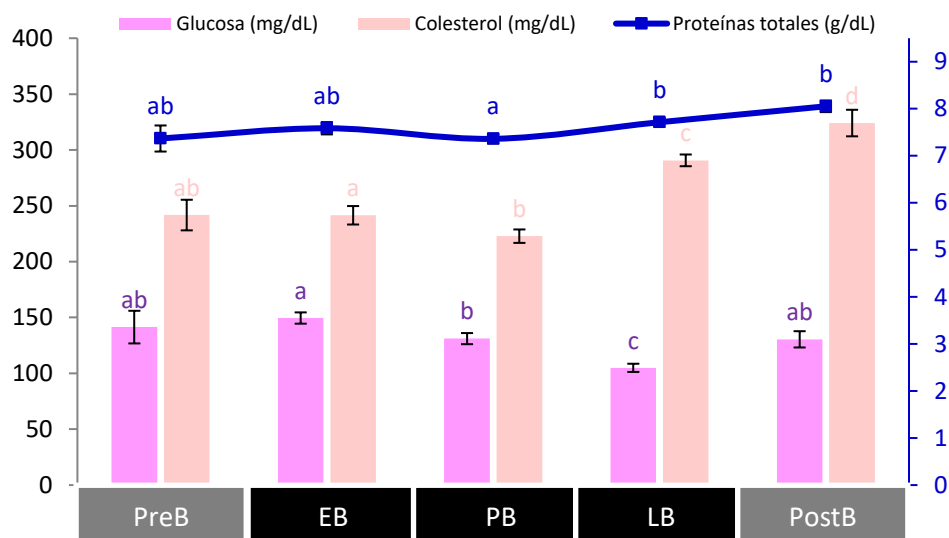


Figura 18. Parámetros de la bioquímica sanguínea en machos de oso pardo en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno (media \pm SEM). La graduación del eje horizontal secundario sólo se aplica a proteínas totales. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

La bioquímica sanguínea mostró diferencias para la concentración de proteínas totales, glucosa y colesterol circulantes asociadas a la estacionalidad reproductiva (Figura 18). Además, los valores de glucosa sanguínea presentaron una correlación positiva con el peso corporal ($p < 0,01$; $r = 0,40$), y los de colesterol una correlación negativa con los niveles de testosterona (Tes_Log) ($p < 0,01$; $r = -0,48$). Tanto los niveles de proteínas como de colesterol exhibieron sus valores mínimos durante PB, aunque entre EB y PB esta disminución sólo fue diferente estadísticamente para el colesterol ($p < 0,05$). Después, ambos aumentaron con respecto a LB, ($p < 0,01$ para ambos). La concentración máxima de colesterol en sangre se observó durante PostB ($p < 0,01$ con PreB, EB y PB; y $p < 0,05$ con LB). Los niveles mínimos de glucosa, sin embargo, se observaron en LB ($p < 0,01$ con el resto de periodos), tras un descenso marcado y significativo durante toda la época sexual ($p < 0,01$ entre EB y PB). La glucosa aumentó posteriormente durante PostB con respecto a LB ($p < 0,01$).

8.4. DISCUSIÓN

8.4.1. Establecimiento de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo

La época reproductiva es el evento principal que modula el ciclo biológico durante la fase activa anual en el oso pardo. En este trabajo, hemos estudiado la variación intraanual de la testosterona, principal hormona reproductiva en los machos, así como del comportamiento de monta como indicador de comportamiento reproductivo, el cual implica tanto hembras como machos receptivos sexualmente. Debido a la evolución bifásica de ambos parámetros, la división de la época reproductiva se ha basado en la demarcación de un periodo intermedio en el que se observan los niveles máximos actividad reproductiva. El uso de información referente a distintos años ha permitido disminuir posibles efectos interanuales en la cronología del ritmo biológico anual del oso pardo.

8.4.1.1. Ritmo anual de la concentración de testosterona sérica

Hasta la fecha, han sido varios los estudios que han encontrado elevadas concentraciones de testosterona sanguínea entre febrero y junio, pero más frecuentemente durante la primavera, en diferentes subespecies de oso pardo (Anel-López et al., 2017b; Gomes-Alves et al., 2011; Tomiyasu et al., 2021; Tsubota & Kanagawa, 1989; White et al., 2005). Resultados similares se han obtenido tras la medición de testosterona en pelo (Cattet et al., 2017). En general, la evolución de la testosterona en los osos del Parque de Cabárceno coincide con los cambios bifásicos descritos en la mayoría de datos previos en el oso pardo, con una curva ascendente hasta máximos que en los osos de Cabárceno se dan en la segunda quincena de abril, y una disminución posterior hasta recuperar niveles basales. De la literatura citada, todos los estudios que incluyeron muestras en abril (Anel-López et al., 2017b; Cattet et al., 2017; Gomes-Alves et al., 2011; Tomiyasu et al., 2021; Tsubota & Kanagawa, 1989) señalan que los niveles máximos de testosterona encontrados se produjeron al menos en parte durante el mes de abril, lo que concuerda con nuestros resultados. Encontramos, por tanto, que, en los datos aquí presentados para los machos del Parque de Cabárceno con muestras obtenidas durante 15 años y con la quincena como unidad temporal, el valor promedio máximo de testosterona sanguínea coincidiría en el tiempo con lo descrito en la bibliografía hasta el momento, a pesar de que las unidades temporales de análisis utilizadas previamente son muy dispares. Algunas de estas aproximaciones simplemente señalaron el mes de máxima testosterona registrada (Tsubota & Kanagawa, 1989) o indicaron comparaciones agrupando meses sin establecer ningún criterio

para su agrupación (White et al., 2005), mientras que otros realizaron un acercamiento a distinguir periodos temporales de distinta denominación sin aludir a la metodología que da lugar a su delimitación (Cattet et al., 2017; Gomes-Alves et al., 2011; Tomiyasu et al., 2021). Respecto a antecedentes sobre niveles de testosterona en los osos del Parque de Cabárceno, los primeros datos publicados incluyeron sólo 6 osos diferentes, y una clasificación cronológica no determinada mediante métodos estandarizados (Gomes-Alves et al., 2011). Posteriormente, Anel-López et al. (2017b) mostraron resultados de manera quincenal: la ampliación del tamaño muestral en su caso, que implica la disminución de la influencia de otros factores ambientales o dependientes del individuo, mostró una evolución muy similar a la de nuestro trabajo, con valores promedio superiores a 5ng/mL sólo durante ambas quincenas de abril y de mayo.

8.4.1.2. Ritmo anual del comportamiento reproductivo

La definición de comportamiento reproductivo en este estudio debe ser tenida en cuenta a la hora de la interpretación de los resultados obtenidos y de su comparación con la información científica disponible hasta el momento. Algunos autores (Fernández-Gil et al., 2006) han considerado como comportamiento sexual simplemente la interacción entre dos individuos de distinto sexo, pero dadas las especiales circunstancias de concentración de individuos en el Parque de Cabárceno, la valoración de cortejos y parejas que permanecen juntas queda muy dificultada en nuestro estudio, por lo que sólo se ha considerado la cópula como indicativa de comportamiento reproductivo.

Con una época reproductiva de 157 días de duración en el año 2012 para los osos pardos del Parque de Cabárceno, los datos aquí presentados difieren tan sólo 6 días con los de la época reproductiva más dilatada registrada, que ha sido descrita recientemente en la Cordillera Cantábrica con 163 días de duración (Blanco et al., 2022). Estas nuevas aportaciones suponen una gran diferencia en cuanto a los conocimientos preestablecidos sobre la cronología del comportamiento sexual en la especie (García-Rodríguez et al., 2020). Además, nuestros datos confirman que los osos pardos del Parque de Cabárceno son la población estudiada con un comienzo más temprano de la época reproductiva (García-Rodríguez et al., 2020), en concreto el 5 de marzo. Hasta la reciente publicación de los datos aportados por Blanco et al. (2022), que describen una monta el 28 de marzo, nunca antes se habían descrito montas en el mes de marzo en el oso pardo silvestre (García-Rodríguez et al., 2020). Respecto a la escasez de montas al comienzo y final de la época reproductiva en Cabárceno, debe puntualizarse que las interacciones sexuales de la primera quincena de marzo y última de agosto se corresponden con

cuatro eventos en los que o bien no hubo penetración ($N = 1$) o bien tuvieron menos de un minuto de duración. Por tanto, el significado de esos comportamientos puede ser ampliamente discutido ya que la probabilidad de cópula efectiva con eyaculación es nula o muy baja, pero siempre podremos considerarlos como indicativos de la receptividad de las hembras en términos de tolerar una posición de monta. Por otra parte, y aunque debemos tener en cuenta que la menor intensidad de observación se dio en esa época del año, no se registraron montas en otoño, las cuales sí han sucedido anecdóticamente en otras poblaciones de muy distinta distribución geográfica: Canadá (Nevin & Gilbert, 2005), Japón (Kohira & Mori, 2010) e Italia (Tosoni et al., 2011). En este punto debe mencionarse que no existieron casos de muerte de oseznos de menos de un año en Cabárceno durante el otoño de ninguno de los años estudiados, y por tanto estos datos reforzarían la hipótesis de que los casos de montas en otoño descritos en otras poblaciones puedan deberse a estros generados tras la pérdida completa de una camada.

Las referencias a cuantificaciones de la intensidad en la actividad sexual son escasas y de variable resultado en el oso pardo, pero disponemos de datos sobre la distribución temporal de las montas en la Cordillera Cantábrica. En la subpoblación occidental de la Cordillera Cantábrica, Fernández-Gil et al. (2006) describieron registros de montas en la segunda quincena de abril ($N = 1$), mayo ($N = 4$ y $N = 5$ para ambas quincenas, respectivamente) y primera quincena de junio ($N = 2$). El comportamiento de cortejo también es más frecuente en mayo en la Cordillera Cantábrica (Palomero et al., 2011). Por tanto, el pico de actividad sexual sucede *a priori* durante mayo, lo cual coincidiría en parte con lo observado en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno, donde la máxima frecuencia de montas tiene lugar en la segunda quincena de abril y en el mes de mayo. Por el contrario, en la población de oso pardo americano de Yellowstone las montas fueron más frecuentes durante junio, concretamente la segunda quincena de junio (Craighead et al., 1995a; Hornocker, 1962). En otras poblaciones cautivas, la frecuencia de los estros es variable según localizaciones, de forma que el estro fue más frecuente en mayo para osos que habitaban en San Diego, coincidiendo parcialmente con nuestros resultados, pero sin embargo fue más frecuente en junio o en mayo y junio para dos poblaciones que habitaban en Alemania (Spady et al., 2007). Además, en nuestro caso encontramos que la época reproductiva es más abrupta en su comienzo que en su final. Este hecho podría explicarse por diferencias en la cronología de la receptividad de las hembras. Sin embargo, debido a que la intensidad del comportamiento reproductivo se mide en número de montas, otra hipótesis plausible sería que la intensidad en el número de montas dependiese más de diferencias en la promiscuidad, en uno o ambos sexos, o incluso de la duración de las montas, según el momento dentro de la

época reproductiva. Esta última hipótesis podría descartarse en nuestro caso debido a un estudio previo que no pudo demostrar diferencias en la duración de las montas de la población de oso pardo de Cabárceno según el momento de la época reproductiva (Manrique et al., 2012).

Entre las posibles causas de haber encontrado en Cabárceno la población de oso pardo con una época reproductiva extensa, la más temprana de las anteriormente descritas y caracterizada por un pico de actividad sexual similar al de la Cordillera Cantábrica pero también ligeramente más dilatado y temprano, deben incluirse factores ambientales, sociales, nutricionales y relacionados con la intensidad de muestreo. En primer lugar, debe subrayarse el excepcional número de montas registradas en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno. Parece obvio que las probabilidades de un encuentro entre individuos de ambos sexos, irrevocablemente aumentadas en condiciones de mayor densidad poblacional, y su disponibilidad fisiológica para el acto sexual determinarán en última instancia el número de montas y su cronología. Sin embargo, la descripción de estas montas se ve profundamente influenciada por la facilidad para su registro por parte de un observador. Debemos tener siempre en cuenta la intensidad y condiciones de muestreo como aspectos que influyen en los datos utilizados para la caracterización de la época reproductiva de una población. En los estudios en los que todos los animales no son observados de forma ininterrumpida durante la totalidad de la época reproductiva, la falta de registros de comportamiento sexual no significa la ausencia del mismo. Por ello, los datos aquí aportados cobran una especial importancia en términos del elevado número de horas de observación en las que ha existido observación directa de osos, la cual está dificultada enormemente en condiciones de libertad. Por otra parte, a menudo en el oso pardo se asume el fotoperiodo como principal determinante de la cronología de la época reproductiva (Spady et al., 2007), pero los factores determinantes de la misma no han sido debidamente estudiados. La duración y pico de la época reproductiva de la población de osos de Cabárceno es en parte coincidente con la descrita para la población silvestre más cercana, la de la Cordillera Cantábrica, con la cual comparte similitudes en cuanto a latitud y fotoperiodo, pero existen diferencias en cuanto a que Cabárceno se encuentra a menor altitud. Sin embargo, García-Rodríguez et al. (2020) no encontraron diferencias en la duración de la actividad reproductiva en el oso pardo asociadas a la altitud en una revisión de las distintas poblaciones estudiadas en las últimas décadas. De hecho, no encontraron relación entre la duración de la época reproductiva con la latitud, altitud ni fotoperiodo, posiblemente debido a artefactos relacionados con la falta de registro de interacciones sexuales por las dificultades de la observación en condiciones de campo y las características oportunistas de muchos de los registros. En su lugar, García-Rodríguez et al. (2020) sí describieron cómo el comienzo de la

misma ocurre antes en las poblaciones que habitan a menor latitud, y explicó los datos de inicio temprano de las montas obtenidos en la Cordillera Cantábrica en base a la existencia de características climáticas benignas en condiciones de baja latitud, las cuales se verían incluso mejoradas en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno. Aspectos sociales podrían asimismo influir en la receptividad de los individuos hacia un encuentro sexual, e incluso en la duración de las cópulas. Por ejemplo, en el grupo de oso pardo de Cabárceno variaciones en la duración de las montas han sido encontradas en función de la edad pero no del momento de la época reproductiva (Manrique et al., 2012). Por otra parte, una cierta forma de supresión sexual de origen social ha sido demostrada en las hembras de oso pardo (Støen et al., 2006). En machos, datos referentes a un monopolio reproductivo por parte de algunos individuos también apuntan a este fenómeno, así como la existencia de diferentes estrategias reproductivas con una base aparentemente modulada por la jerarquía social. Por otra parte, el estro en las hembras ha demostrado ser altamente variable tanto entre hembras como interanualmente (Steyaert et al., 2012) y existen numerosos aspectos del mismo que aún deben ser objeto de intensa investigación. La duración del estro de cada hembra y la sincronía o asincronía del conjunto de estros de todas las hembras de la población jugará un papel fundamental en las fechas en las que se producirá un número mayor de montas en la población. Por último, cabe mencionar que quizás factores genéticos podrían verse también involucrados en la modulación de la cronología reproductiva. Sin embargo, debemos recordar que la población de osos de Cabárceno y la que habita la Cordillera Cantábrica no comparten el mismo origen genético.

8.4.1.3. Delimitación de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo

En este trabajo, el ritmo biológico anual del oso pardo ha quedado definido en cinco unidades temporales denominadas “periodos”, en los que sólo durante los tres centrales existe comportamiento reproductivo. Las tres quincenas en las que se manifiestan máximos de actividad sexual muestran asimismo niveles elevados de testosterona. Además, encontramos que la quincena previa (primera del mes de abril) también se caracteriza por altas concentraciones de testosterona. No obstante, el hecho de que su concentración de testosterona difiera estadísticamente de la de las dos quincenas siguientes, sumado a una menor actividad sexual observada, ha significado su inclusión en el periodo reproductivo inicial, como un momento de transición entre ambos, pero más definido por los eventos biológicos que suceden al principio de la época reproductiva. Ante la falta de antecedentes previos en la división de la época reproductiva en el oso pardo, la nomenclatura utilizada para denominar sus

periodos ha sido la previamente utilizada por Aitken-Palmer et al. (2012) para oso panda. El trabajo de Aitken-Palmer et al. (2012) es además, según nuestro conocimiento, el único que aporta datos sobre intensidad de la época reproductiva mediante datos comportamentales y hormonales en una misma población de úrsidos. Mientras que en oso pardo los máximos niveles de testosterona sanguínea en los machos de Cabárceno se producen al comienzo del periodo central de la época reproductiva y por tanto coincidiendo con la que se considera ya máxima intensidad en el comportamiento reproductivo (>5 montas/observación), en el oso panda por el contrario, aunque no existe un análisis estadístico asociado a las medias semanales, las máximas concentraciones de testosterona se observaron inmediatamente antes del pico de actividad reproductiva y al comienzo del mismo de forma que ésta disminuye progresivamente a lo largo de toda la época reproductiva. En el oso panda por tanto parece que existe una ligera asincronía entre la función reproductiva masculina y la receptividad femenina que no sucede en la población de oso pardo de Cabárceno. Ante las dificultades para obtener datos suficientes y fiables de comportamiento sexual que definan la época reproductiva de las distintas poblaciones de oso pardo, la medición del nivel de testosterona en los machos, cuyos máximos son casi coincidentes con el pico de actividad reproductiva, se presenta como una herramienta muy útil para la identificación de la época reproductiva central con indudables ventajas prácticas.

A pesar de su extensión e importancia, anteriores aproximaciones a señalar periodos en el ritmo biológico anual del oso pardo no habían considerado la división de la época reproductiva (Cattet et al., 2017; Tomiyasu et al., 2018). Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se delimita el ritmo biológico anual del oso pardo sobre la base de patrones etológicos y fisiológicos reproductivos objetivos.

8.4.2. Descripción de los periodos que definen el ritmo reproductivo anual de los machos de oso pardo

A pesar de que las condiciones climáticas del área donde habita la población de osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno son más suaves en comparación con la mayoría de poblaciones de osos en libertad, existen marcadas diferencias asociadas a la estacionalidad reproductiva en todos los comportamientos (presencia de individuos, comportamiento reproductivo, agonístico y juego), en los parámetros morfológicos (peso corporal y volumen testicular), y en la mayoría de parámetros fisiológicos estudiados. Tan sólo el hematocrito, el número de eritrocitos y la concentración de cortisol no muestran diferencias significativas entre los cinco periodos que definen el ritmo reproductivo anual del oso pardo.

8.4.2.1. Descripción de las variaciones anuales en el comportamiento asociadas a la estacionalidad reproductiva

Una vez caracterizada la compartimentalización de la ciclicidad anual del oso pardo, ésta ha sido descrita en base a aspectos comportamentales, en concreto a la afluencia al lugar de estudio y al comportamiento social, tanto de naturaleza agonística como amistosa. Para tal fin, es imprescindible utilizar un número de individuos amplio como el que ofrece el grupo de osos del Parque de Cabárceno debido a las diferencias individuales que exhiben los osos pardos en este tipo de comportamientos (Fagen & Fagen, 1996). Enfrentamientos agresivos en su sentido más amplio y juegos intraespecíficos han recibido una reducida atención en el oso pardo, en parte por la dificultad para el registro de eventos de este tipo en condiciones de libertad. Por ello, los datos aquí presentados suponen, en muchos de sus aspectos, información novedosa que, una vez interpretada en función de las características y forma de vida de los osos de la población estudiada, pueden servir como base para la comprensión de los escasos datos de los que se dispone en individuos de vida silvestre.

Presencia de osos en el área de estudio

La presencia en el área de estudio es un parámetro cuyas variaciones, en el contexto de la población de osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno, responde a una etiología multifactorial.

Respecto a las variaciones circadianas, encontramos que en poblaciones en libertad se han descrito patrones de actividad de carácter crepuscular en la Cordillera Cantábrica o nocturno en otras poblaciones de Europa (Clevenger et al., 1990), pero en general muy variables a lo largo de su rango de distribución. Sin embargo, en la población estudiada, el pico de actividad en el área de estudio se registra durante la administración de alimento por parte de los cuidadores (datos propios no publicados). Esta administración sucede en el área de estudio después de las sesiones de observación para toma de datos etológicos, y por lo tanto el aumento de concentración de osos a medida que avanzan las dos horas de observación incluidas en cada sesión diaria de observación responde al posicionamiento de los osos en lugares preferentes para acceder a los alimentos que van a ser suministrados. La gran extensión del área de observación permite la agregación circunstancial de un gran número de individuos de distintas edad, sexo y estatus social.

Las principales hipótesis sobre las causas de variación anual de osos en el área de estudio son cambios en la actividad y en el apetito: el letargo invernal o su proximidad podrían disminuir su presencia en el área, mientras que un aumento del apetito promovería la estancia de los osos en el área de estudio ya que, como comentábamos anteriormente, ésta coincide con el área de

alimentación y además las sesiones de observación se realizan inmediatamente antes de la misma. Los valores mínimos de presencia de individuos suceden durante los meses de invierno, en los cuales no cesa por completo la administración de alimento, lo cual coincide con las drásticas disminuciones de actividad que experimentan los osos pardos en libertad durante el letargo invernal. Los datos no permiten realizar una comparativa de la duración del letargo de los osos de Cabárceno, ya que las diferencias en el comportamiento entre animales durante el invierno obligan a que, para su determinación, se necesitase otro tipo de monitorización a nivel de individuo. En todo caso, los cambios en la presencia de individuos en el área de observación en los meses más fríos son progresivos, tanto en cuanto a su disminución previa como aumento posterior, lo cual coincide con los estados de actividad intermedia descritos en libertad (González-Bernardo et al., 2020; Nelson & Robbins, 2010; Nelson et al., 1983) y con los descensos paulatinos de actividad descritos en osos escandinavos antes de la entrada a la osera (Friebe et al., 2001). Aunque la reducción en el número de osos observados durante el invierno se puede explicar en parte por disminuciones en la actividad general, no debemos olvidar que los valores de presencia de individuos expresan el número de osos en un lugar de concentración de recursos alimenticios y por tanto cabe esperar que se vean influenciadas por las variaciones anuales en el apetito. Estos cambios en el apetito explicarían el incremento registrado durante el final de la época reproductiva, y por tanto señalarían esa época como la de comienzo de la hiperfagia. De esta forma, el área de observación funcionaría como lugar de agregación de animales durante la hiperfagia previa al invierno, al menos en los momentos previos a la administración de alimento, del mismo modo que Ruiz-Villar et al. (2019) describieron una agregación de osos durante el periodo de hiperfagia en un robledal de la Cordillera Cantábrica. Los niveles moderados de presencia a partir de septiembre contrastan con la información de otros autores que equiparaban los valores de actividad del verano con los del otoño en condiciones de libertad (Clevenger et al., 1990; Roth, 1983; Roth & Huber, 1986). En libertad, la explicación más plausible para niveles sostenidos de actividad durante el otoño sería la búsqueda de alimento y, por tanto, esta evolución sería indicadora de un elevado apetito. Sin embargo, los osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno frecuentan menos el área de alimentación durante el otoño, hecho que puede reflejar un estado corporal satisfactorio en términos de grasa corporal propiciado por la administración aumentada de alimento en las semanas previas. Otra posible hipótesis para el aumento de la presencia de osos en el área de observación durante el final de la época sexual sería el uso de dicha área con fines reproductivos. No debemos olvidar que se han descrito zonas de concentración de actividad sexual para osos cantábricos (Fernández-Gil et al., 2006), y dependiendo de si tal fenómeno existiese en la población estudiada y de si dichas zonas se encontrasen dentro del área de observación o no,

podría existir una influencia de la actividad sexual en la presencia de individuos. Por el contrario, la época reproductiva también podría ejercer una influencia negativa en el número de animales en el área de estudio debido a la actividad de búsqueda de pareja sexual. En Cabárceno, los registros de actividad sexual en la época de mayor afluencia de osos al área de estudio se ven disminuidos con respecto a quincenas anteriores caracterizadas por una menor afluencia de osos al área, y por tanto no parece existir una relación positiva entre la intensidad en la actividad sexual y la afluencia de osos al área de observación.

Comportamiento agresivo

Del mismo modo que para el comportamiento sexual, todos los machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno exhiben comportamiento agresivo y su frecuencia experimenta profundos cambios a lo largo del ciclo anual. Es importante destacar la importancia de estos resultados, ya que la mayoría de referencias directas a comportamientos agresivos se corresponden con observaciones sesgadas en el tiempo, más comúnmente asociadas a épocas de abundancia de salmón en los ríos, y por tanto este estudio supone la primera cuantificación de las variaciones en la agresividad en el oso pardo descrita para una misma población durante al menos un año. Debido a la orientación del presente trabajo hacia el estudio de la influencia de la estacionalidad reproductiva, se ha intentado minimizar al máximo la influencia de otros posibles factores condicionantes como el sexo, densidad de animales, de recursos alimenticios, o la necesidad de establecimiento de dominancias. Para ello, se ha estudiado solamente el comportamiento de los machos en una población lo más estable posible en cuanto a número de animales y disponibilidad de alimento, que ocupa una superficie fija y cuya estructura jerárquica ha demostrado estabilidad interanual al menos a corto plazo. Sólo en una población cautiva podrían restringirse dichos factores hasta los niveles expuestos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la agresividad intraespecífica podría verse aumentada debido a la restricción del espacio inherente al manejo en cautividad (Ottewell, 2016). Por tanto, aunque los resultados aquí expuestos tienen un gran valor para estudios comparativos, los niveles de intensidad general en el comportamiento agonístico deben quedar siempre sujetos a interpretación.

En el Parque de la Naturaleza de Cabárceno, los machos de oso pardo muestran mayores índices de agresividad en la época reproductiva pero sólo a partir del pico de actividad sexual (BS). Esto coincide en parte con las escasas y en ocasiones poco contrastadas afirmaciones encontradas en la literatura científica que señalan la reproducción como momento de mayor agresividad en el oso pardo (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962). En primer lugar, como ya hemos mencionado, la mayoría de referencias en la bibliografía sobre eventos agonísticos se describen en Norteamérica durante el desove del salmón, es decir en verano, y por tanto coincidiendo con

la época más asociada a la actividad sexual en oso grizzly en libertad. Egbert et al. (1976) afirmaron que incluso los individuos con menores niveles de agresividad, es decir los de posición más baja en la pirámide jerárquica, se mostraron extremadamente agresivos cuando se encontraban asociados a una hembra en celo. Una mayor expresión de la agresividad es común en los machos de especies con reproducción estacional (Bouissou, 1983). Además, tanto una mayor presencia de cicatrices recientes, presuntamente infringidas en eventos agonísticos intraespecíficos (Egbert et al., 1976; Hornocker, 1962; Pulliainen et al., 1984), como una mayor intensidad en el marcaje (Tomiyasu et al., 2018) en periodos con actividad reproductiva apoyaría el aumento sugerido de interacciones sociales de carácter agresivo en la especie durante la misma. Los datos aquí presentados muestran que, en el comienzo de la época reproductiva aún no existe un aumento significativo de la agresividad de los machos con respecto al periodo inmediatamente anterior. Es posible que, en otras poblaciones no cerradas, tras el letargo invernal y en especial al comienzo de la época reproductiva, pudiese exhibirse una mayor agresividad entre machos debido al encuentro entre osos de relación jerárquica no establecida. Esta hipótesis necesitaría ser contrastada con futuras investigaciones. En Cabárceno, donde la jerarquía es estable y no se reestablece sistemáticamente con periodicidad anual, esto no ocurre.

La máxima expresión de agresividad en los machos sucede en el momento de mayor actividad sexual, es decir al final de abril y en mayo, para disminuir después al final de la época reproductiva. El estudio de los patrones motores de comportamiento agresivo mostrado por Stonorov & Stokes (1972) coincide también en esta dirección, mostrando que a medida que avanzaba el verano estos patrones variaron hacia comportamientos que expresan un menor nivel de agresividad. Por otra parte, resulta llamativo que el índice de interacciones agresivas protagonizadas sólo por machos (ICA_{m-m}) presenta valores similares al comienzo y al final de la época reproductiva, indicando probablemente un nivel de competencia por las hembras similar. El aumento del comportamiento agresivo total (ICA_M) durante LB podría explicarse en base a una tendencia hacia una mayor agresividad entre los machos y las hembras sin crías al final de la época reproductiva, es decir, aquellas disponibles sexualmente. No se han encontrado datos que soporten este hecho en otras poblaciones, ya que el comportamiento agresivo entre individuos de distinto sexo no considerados presuntos intentos de infanticidio ha sido objeto de escaso análisis. La interpretación de estos resultados es por tanto una hipótesis novedosa que consistiría en considerar la mayoría de interacciones agonísticas entre un macho y una hembra como un reflejo de rechazo sexual por parte de estas últimas. Esto contrasta abiertamente con la afirmación de Bellemain, et al. (2006b), quienes, aunque apuntando a la dificultad para su

documentación, afirmaron no haber observado ni tener conocimiento de observaciones de una hembra rechazando a un macho de oso pardo. En el grupo de osos estudiado en este trabajo, sin embargo, es común la interpretación como rechazo sexual de interacciones en las que el macho es el que se acerca a la hembra con actitudes y comportamientos propios del cortejo y a las que la hembra responde de manera agresiva o evasiva. El rechazo de las hembras a los intentos de cópula de los machos sería, según esta teoría, mayor tras el pico de actividad sexual, hecho en cuya explicación podrían jugar un papel fundamental el número de hembras sexualmente disponibles, la actitud de las hembras sexualmente no disponibles, y/o la insistencia y actitud de los machos. Cabría esperar que mayores niveles de testosterona en los machos aumentasen su interés en las hembras y por tanto las posibilidades de rechazo por parte de las mismas en épocas fuera del pico de actividad sexual, pero sin embargo los machos de oso pardo no muestran niveles elevados de testosterona durante la época reproductiva tardía. El estudio de la receptividad en las hembras y de sus niveles hormonales podría ayudar a la comprensión de este fenómeno. Cabe considerar un último factor como posible modulante parcial de la agresividad, que es la competencia por el alimento, y que teóricamente aumentaría durante la hiperfagia que tiene lugar desde las últimas semanas de la época reproductiva hasta la entrada en la osera para el letargo invernal. A pesar de que la administración de comida es considerada una fuente de enfrentamientos en cautividad (Koene et al., 2002; datos propios no publicados), su influencia en los niveles de agresividad de los machos durante las 8 a.m. y las 10 a.m., previamente a que la ración diaria sea administrada, parece reducida, ya que no impidió ni el descenso de agresividad entre machos observado al final de la época reproductiva ni la drástica disminución registrada en la época previa al invierno.

La influencia de las hormonas sexuales en el comportamiento agresivo de los machos de oso pardo queda por tanto sujeta a discusión. En general, la extensa literatura científica al respecto considera que el comportamiento agresivo en machos se ve fuertemente influenciado por el efecto de la testosterona, pero el grado de dependencia de ambos parámetros y de éstos con respecto a la función reproductiva difiere entre las distintas especies (Bouissou, 1983). Derocher & Stirling (1990) describieron menores índices de comportamiento agonístico fuera de la época reproductiva en el oso polar, lo cual sucede en los machos de Cabárceno durante la mayoría de la época no reproductiva. Derocher & Stirling (1990) atribuyeron tal hecho a las bajas concentraciones de testosterona circulante que se dan en oso polar durante la época de deshielo. Sin embargo, en el oso pardo observamos que sólo uno de los tres periodos definidos para la época reproductiva, en concreto el pico de actividad reproductiva, muestra una concentración de testosterona en sangre significativamente diferente con respecto a ambos

periodos en los que no existe actividad sexual. Este periodo coincide con el de máxima agresividad en machos, y por tanto secundaria con la teoría de la agresividad modulada por la testosterona durante el periodo reproductivo central. Dicha influencia sería discutible en otros periodos, ya que los mismos osos tuvieron una mayor concentración de testosterona durante el periodo previo al pico de actividad sexual respecto a la última parte de la época reproductiva, aumento que no se vio reflejado en el nivel de agresividad entre machos y que fue incluso contrario al incremento nivel de agresividad intraespecífica total de los machos observado durante la época reproductiva tardía. Por tanto, en machos de oso pardo encontramos que, mientras otro tipo de comportamiento social como es el marcaje mediante glándulas sebáceas es totalmente dependiente de la testosterona (Tomiyasu et al., 2018), para el caso de la agresividad intraespecífica sus determinantes parecen ser multifactoriales y aún no se encuentran descritos completamente. La descripción de la evolución anual del comportamiento agresivo de los machos de oso pardo mostrada en el presente manuscrito puede servir como base para la comprensión de los mismos.

Comportamiento de juego

El conjunto de machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno juega con una frecuencia importante, que incluso supera a la de interacciones agonísticas durante más de la mitad de su ciclo anual. Este grupo de osos que conviven en estado de semilibertad esta integrado por animales bastante sociales, pero la comparación de la intensidad en su comportamiento de juego con el de otras poblaciones estudiadas resulta complicada debido a la diversidad de criterios utilizados para definir la naturaleza de las interacciones y a la falta información sobre juegos entre animales adultos (Egbert et al., 1976; Montaudouin & Pape, 2005). El hecho de que en Cabárceno todos los machos muestren comportamiento de juego implica que todos los machos de oso pardo tienen potencial para exhibir comportamiento social amistoso, independientemente de su edad y rango social. Esto contrasta abiertamente con las muy escasas referencias de juego en osos pardos adultos en estado salvaje que pueden encontrarse en la bibliografía. En el caso del Parque de la Naturaleza de Cabárceno, la gran mayoría de las interacciones amistosas en las que participan machos involucran individuos del mismo sexo. Esto es contrario a la afirmación de Montaudouin & Pape (2005) de que el sexo no influye en las interacciones amistosas, pero hay que recordar que en este trabajo no se incluyeron zoos con más de un macho adulto. Nuestros hallazgos sí coinciden con lo presentado por Colmenares & Rivero (1983), que describen “frecuentes, intensas y largas” interacciones de juego entre machos jóvenes en cautividad, y con los aportados para otros úrsidos, como el oso polar (Latour, 1981b) y el oso negro asiático (Ottewell, 2016), para los cuales se describen

mayores niveles de sociabilidad en machos. En oso polar, además, son los machos adultos la subpoblación con mayor tendencia a agruparse y se caracterizan por exhibir un mayor nivel de interacción social a través del contacto físico con otros machos adultos que con ningún otro grupo de sexo y edad (Latour, 1981b). El único ejemplo de cuantificación de la frecuencia de interacciones de juego de machos adultos del que tenemos constancia no es comparable a nuestros datos debido a sus particulares condiciones ya que describe la adaptación de osos ciegos a un nuevo grupo (Koene et al., 2002).

Existen algunos elementos que podrían favorecer las importantes frecuencias en el comportamiento de juego detectadas en los machos de oso pardo de Cabárceno, entre las que se encuentran: la cobertura de las necesidades básicas (Latour, 1981a), un elevado estado de bienestar (Fagen & Fagen, 1990) o estados disminuidos de estrés (Fagen & Fagen, 2004). Por otra parte, al comportamiento de juego se le asumen beneficios futuros tan sobresalientes como mayores índices de supervivencia: el oso pardo es la especie en la que se ha demostrado por primera vez el juego con un mayor índice de supervivencia, al menos hasta el momento de la independencia post-destete de los oseznos (Fagen & Fagen, 2004; Fagen & Fagen, 2009). Estos beneficios del juego, frecuentemente menospreciados en animales adultos, hipotéticamente podrían significar: el mantenimiento de un estado corporal adecuado, la mejora de las habilidades de combate, la evaluación de la aptitud para la lucha de otros individuos, o el establecimiento o mantenimiento de relaciones jerárquicas sin agresividad asociada (Clapham & Kitchin, 2016). No podemos descartar que estos potenciales beneficios se manifestasen más claramente en un entorno controlado como la población de osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno, en el cual el flujo de nuevos individuos en la población es mínimo y la distancia entre individuos puede ser pequeña en determinados momentos, especialmente durante la administración de alimento.

Referencias en la bibliografía acerca de cambios anuales en la frecuencia del juego en el oso pardo describen un descenso del tiempo pasado jugando al final del verano y en el otoño entre hermanos aún viviendo en el núcleo familiar (Stelmock & Frederick, 1980). En nuestro estudio, vemos que para los machos de mayor edad esto no ocurre así y que sólo existe una disminución coincidiendo con los momentos de mayor intensidad en el comportamiento sexual. Esto coincide con datos, no publicados, obtenidos en los mismos osos pardos que fueron protagonistas del estudio de Colmenares & Rivero (1983): dichos machos no mostraron comportamiento de juego durante el pico de actividad reproductiva (F. Colmenares, comunicación personal, 2023). En la descripción de los patrones de comportamiento cíclicos anuales del oso pardo en Cabárceno, el juego llevado a cabo sólo por machos también

desaparece casi en su totalidad durante la época PB, momento del año que correspondería, por un lado, con el de mayor competencia entre machos debido a la rivalidad derivada del acceso a las hembras en celo, y por otro con el de mayor nivel de testosterona, hormona que podría inhibir el comportamiento social afiliativo. El periodo PB es también en el que existe significativamente una mayor agresividad hacia otros machos, demostrando así que cuando existe una elevada actividad sexual, los machos de oso pardo son menos tolerantes hacia la presencia de otros machos y raramente exhiben comportamiento amistoso hacia ellos. Estos hallazgos apoyarían la teoría de Latour (1981a) de que el juego social entre machos adultos de oso polar durante periodos de su ciclo anual en los que no existe competencia intraespecífica sirven como un periodo de socialización importante para momentos del año en los que esta rivalidad es más intensa. Sorprendentemente, en otras épocas en las que existieron hembras receptivas (EB y LB) pero la actividad de cópula era menos intensa, los niveles de comportamiento de juego no se vieron afectados en la población de osos del Parque de Cabárceno. Probablemente, existan perfiles de otras hormonas relacionados con esta evolución, como sucede por ejemplo con la oxitocina y la prolactina en otras especies (Ågmo & Laan, 2022).

El comportamiento de juego entre individuos de distinto sexo se caracteriza por estar cuantitativamente mucho menos representado que aquel en el que participan machos, y la época de mayor frecuencia en este tipo de comportamiento es el periodo reproductivo temprano. A pesar de que, debido al régimen de manejo y a la enorme dificultad de distinguir asociaciones de cierta duración entre machos y hembras tal y como se hace en animales en libertad, es difícil distinguir cuándo los juegos forman parte de un cortejo, es muy probable que la mayoría de juegos entre machos y hembras al comienzo de la actividad reproductiva tengan componente sexual. Hasta donde sabemos, esta sería la primera referencia sobre mayores interacciones amistosas o de cortejo durante las primeras semanas de la época reproductiva con respecto al resto del año en la especie. Presumiendo que la finalidad del juego entre machos y hembras fuese en su mayoría sexual, significaría que existe mayor contacto físico previo al acto sexual al principio de la época reproductiva, a pesar que en las semanas siguientes las montas fueron más abundantes. Quizás las hembras sólo exhiben este tipo de comportamiento inmediatamente antes o en los primeros momentos en los que empiezan a ser receptivas; quizás este comportamiento sólo se muestre en los primeros encuentros sexuales de cada pareja, relegándose después a un segundo plano por ser animales convivientes; o incluso sería posible que el contacto físico amistoso previo al acto sexual sea más difícil a partir del pico de actividad sexual debido al aumento de agresividad de los machos. También sería incluso posible que ciertas hembras, con periodos de receptividad tempranos respecto al resto de hembras, fuesen

más propensas a exhibir este tipo de comportamiento. El estudio del historial reproductivo completo de los integrantes de cada pareja y los patrones exhibidos durante las interacciones sería necesario para poder llegar a conclusiones al respecto. En cualquier lugar, al margen de las posibles funciones o desencadenantes del comportamiento de juego en ambos sexos, resulta interesante observar cómo una especie considerada como solitaria puede mostrar tal variabilidad hacia ciertos niveles de socialización.

8.4.2.2. Descripción de las variaciones anuales en parámetros morfológicos y fisiológicos asociadas a la estacionalidad reproductiva

Peso corporal

El peso corporal de los machos adultos también experimenta un marcado ritmo cíclico anual. No obstante, y al contrario que en la amplia bibliografía al respecto, en los osos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno no existen diferencias significativas entre el peso de los últimos (PostB) y primeros (PreB) meses del año. Existe una referencia sobre similitud en el peso corporal de primavera y otoño en libertad en el estudio de Ligot (2019). Sin embargo, sus datos no son comparables a los nuestros ya que se refieren en su mayoría a osos subadultos y, además, la mayoría de sus datos de primavera fueron tomados en marzo y abril, meses que para nosotros ya consideramos época reproductiva. La falta de diferencias en el peso corporal entre machos adultos de Cabárceno entre PostB y PreB resulta muy llamativa ya que las diferencias observadas por otros autores entre la época previa y posterior al letargo invernal pueden llegar a superar el 30 % del peso de los osos (Hellgren, 1995; Hilderbrand et al., 2000; Pearson & Halloran, 1972). Aunque están descritas disminuciones ligeramente menores para úrsidos mantenidos en cautividad (Hellgren, 1995), la reducción de peso durante los meses más fríos del año observada en Cabárceno es la menor en oso pardo adulto de la que se tenga constancia. Nuestra hipótesis consiste en que los patrones de letargo exhibidos por los individuos muestreados serían la clave para comprender estos resultados, especialmente considerando que todas las muestras tomadas durante PreB correspondieron al mes de febrero. Febrero es una época de baja presencia y actividad de osos en esta población, más cercana a la exhibida en diciembre y enero que a la de noviembre o marzo, lo cual indica que algunos individuos de la población aún se pueden encontrar en fase de letargo. Teniendo en cuenta que las capturas para muestreo se realizaron siempre en el área de estudio sobre animales activos, es posible que la población muestreada en la época PreB esté sesgada hacia osos cuyo letargo hubiese sido reducido esos años o que incluso no hubiesen exhibido letargo invernal de ningún tipo, lo cual explicaría el mantenimiento de su peso debido a la disponibilidad de alimento durante el invierno.

En cambio, en la población de Cabárceno sí existen diferencias entre el peso de los osos de gran parte de la época reproductiva, concretamente aquella que sucede a partir de la segunda quincena de abril, en comparación con el resto del año. Aunque los cambios de masa corporal durante la fase activa han sido menos estudiados en la literatura científica, existen referencias a disminuciones en la ingesta de los machos de oso pardo durante el celo (Fernández-Gil et al., 2006; Hornocker, 1962). El mayor tiempo dedicado a la búsqueda de hembras receptivas, a su custodia y finalmente al propio comportamiento de cópula influirían de esta manera en un balance energético negativo. Mayores índices de agresividad, un probable estado fisiológico de estrés o aumentos en los niveles de testosterona también podrían contribuir a dicha tendencia. La actividad reproductiva ha sido señalada como causa de disminución en el peso corporal también para otras especies (Snider et al., 2022).

La recuperación del peso perdido durante la mayoría del año se produce de forma repentina en PostB, de manera que en los registros de septiembre, octubre y noviembre el peso corporal es el máximo del año y fue significativamente mayor que durante cualquiera de los tres periodos que conforman la época reproductiva. Esto correspondería con el periodo de hiperfagia y, por tanto, a pesar de no haberse detectado una reducción de su peso durante el invierno, en los machos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno existe comportamiento de hiperfagia previa al invierno. El aumento de peso experimentado fue del 31 %, es decir, similar al descrito por Evans et al. (2012) y Hissa et al. (1998a) en oso pardo europeo, tanto en cautividad como en libertad aunque en dichos casos se utilizaron casi exclusivamente animales no adultos, y también similar (28 %) a los datos referentes a machos adultos de osos pardo americano (Kingsley et al., 1983).

Volumen testicular

Así como el peso corporal puede considerarse un indicador del metabolismo energético y estado general de los osos, el estudio del tamaño testicular constituye un método sencillo y no invasivo de cuantificar posibles cambios en la función gonadal y, por tanto, en la capacidad reproductiva. En el del Parque de Cabárceno, los machos adultos experimentan cambios cíclicos en el tamaño testicular, en concordancia con lo generalmente encontrado para la especie (Erickson et al., 1968; Gomes-Alves et al., 2011; Pearson, 1975; Tsubota & Kanagawa, 1989; White et al., 2005). Estos cambios se relacionan positivamente con el nivel de testosterona, tal y como también encontraron Gomes-Alves et al. (2011) en oso pardo y Howell-Skalla et al. (2002) en oso polar. El tamaño testicular puede ser expresado como volumen testicular, habiéndose utilizado diversos métodos matemáticos para el cálculo del mismo. Al igual que Jeong et al. (2019) y Knauf

et al. (2002), en este trabajo se ha utilizado la fórmula de un elipsoide para el cálculo del volumen medio de los testículos en osos.

Los valores máximos de volumen testicular suceden durante la época reproductiva, tal y como sugieren estudios publicados en oso grizzly (Erickson et al., 1968; Pearson, 1975; White et al., 2005), oso pardo europeo (Ligot, 2019), oso negro americano (Garshelis & Hellgren, 1994; McMillin et al., 1976) y oso polar (Howell-Skalla et al., 2002). Este estudio es pionero en describir la relación entre la intensidad de la actividad reproductiva y características testiculares. En concreto, los valores máximos de volumen testicular suceden durante el periodo de actividad sexual más intensa (PB), el cual muestra diferencias significativas con respecto al resto del año excepto al periodo reproductivo inicial. La discrepancia entre estos resultados y los encontrados previamente en la misma población por Gomes-Alves et al. (2011) pueden ser atribuidos a su distinta y poco precisa delimitación de los periodos que componen el ciclo anual y a su reducido tamaño muestral. Al final de la época reproductiva (LB) existe una disminución en el tamaño testicular, siendo este similar al mostrado durante la fase activa sin actividad sexual (PostB y PreB) pero diferente del mostrado en el resto de la época reproductiva (EB y PB). Esto no coincide con lo encontrado en otros úrsidos, en concreto el oso panda y el oso negro asiático, en los cuales no se registraron diferencias significativas durante la época reproductiva (Aitken-Palmer et al., 2012; Okano et al., 2009). En el caso del oso panda, el mayor tamaño testicular, aunque no fue estadísticamente diferente al mostrado durante el resto de la época reproductiva, se dio durante el pico central de máxima actividad reproductiva, y el menor al final de la misma al igual que lo aquí mostrado para el oso pardo. No se observa una diferencia de tamaño testicular al final de la época reproductiva en comparación con la época no reproductiva, hecho que deberá tenerse en consideración en estudios posteriores, ya que demuestra que la existencia de comportamiento reproductivo no está necesariamente asociada a un mayor tamaño testicular, sino que deberá considerarse la intensidad de la actividad sexual para la interpretación de los indicadores de tamaño testicular.

Testosterona

Las concentraciones sanguíneas de testosterona, de forma similar a lo descrito en la literatura, son muy variables en función de los periodos y también entre individuos. Existen estudios sobre niveles de testosterona en diferentes periodos en el oso pardo, principalmente en función de la existencia de letargo y de actividad reproductiva, pero hasta la fecha todos ellos habían considerado la época reproductiva como una única entidad biológica (Cattet et al., 2017; Gomes-Alves et al., 2011) que puede estar precedida por un periodo transicional (Tomiyasu et al., 2018). De esta forma, nuestro estudio constituye la primera demostración sobre las diferencias en los

niveles de testosterona dentro de la época reproductiva en el oso pardo asociados a las variaciones en la intensidad del comportamiento sexual; además, estas variaciones se han validado estadísticamente para cada uno de los tres periodos en que se divide la época reproductiva, lo cual aporta solidez a la división realizada. Aunque no existan estudios similares en oso pardo, encontramos un precedente de este tipo de análisis en otro úrsido, el oso panda, en el que Aitken-Palmer et al. (2012) estudiaron los niveles de testosterona fecal dividiendo la época reproductiva también en tres periodos, con un periodo intermedio correspondiente al pico de actividad sexual. Al igual que en los osos pardos de nuestro estudio, esta aproximación reveló diferencias significativas estacionales en la testosterona, pero en su caso las diferencias observadas sólo consistieron en una menor testosterona durante la época reproductiva tardía con respecto al periodo reproductivo inicial, y niveles intermedios durante el periodo reproductivo central pero no distintos a los del resto de la época reproductiva.

Los niveles de T durante el pico de actividad sexual son muy superiores y estadísticamente distintos a cualquier otro periodo del año. Estos datos coinciden al menos en parte con lo expuesto por Anel-López et al. (2017b), Cattet et al. (2017), Tomiyasu et al. (2018) y Tsubota & Kanagawa (1989), quienes registraron valores máximos de testosterona a finales de marzo y abril, en abril y mayo, en abril y mayo, y entre abril y junio, respectivamente. Las sutiles discrepancias observadas podrían deberse tanto a diferencias metodológicas, entre ellas la disparidad en las unidades temporales de análisis utilizadas, pero también a diferencias genuinas en la evolución de la testosterona. Las evidencias de una íntima relación de T con el comportamiento reproductivo aquí demostradas hacen sospechar que las variaciones en la cronología de la actividad sexual entre distintas poblaciones de oso pardo a lo largo de todo su rango de distribución (García-Rodríguez et al., 2020) pudiesen probablemente acompañarse también de variaciones en la evolución del ciclo anual de la testosterona. De hecho, en oso negro americano ya han sido demostradas diferencias en dos poblaciones tanto en cuanto a la cronología del pico de testosterona como en la duración del mismo, en relación a una distinta duración de la época reproductiva entre ellas (Garshelis & Hellgren, 1994).

Asimismo, resulta destacable el hecho de que los niveles de T durante el periodo reproductivo tardío difieren de los encontrados en el resto de la época reproductiva, es decir la primera mitad de la misma, pero son estadísticamente similares a los registrados cuando no existe actividad de monta en la población. En oso pardo de Hokkaido, Tsubota & Kanagawa (1989) describieron una evolución de la testosterona similar, afirmando que en su población estudiada ya se registraron valores basales, por debajo de 1,0 ng/mL, hacia la mitad de la época reproductiva. En oso panda, las diferencias en la concentración de testosterona fecal observadas por Aitken-

Palmer et al. (2012) durante la época reproductiva, que se extendió cuatro meses, incluyeron también valores mínimos también en el periodo reproductivo tardío, el cual abarcó las seis últimas semanas de comportamiento sexual. No obstante, en el oso panda la concentración de testosterona del periodo reproductivo tardío es la menor del año en términos absolutos, y sólo se diferencia estadísticamente de la mostrada en el periodo reproductivo inicial y el periodo pre-reproductivo, pero no en el periodo reproductivo central como sucedía en el oso pardo. La coincidencia en el tiempo de comportamiento de monta y niveles bajos de T en los machos de oso al final de la época reproductiva plantea un nuevo escenario en el que deben revisarse el papel de la testosterona y otros moduladores del eje neuroendocrino y gonadal en la regulación del comportamiento sexual en el oso pardo. Incluso, sería necesario ampliar dicho planteamiento no sólo al comportamiento sexual, en última instancia limitado por la existencia de hembras receptivas, sino también a la regulación de la espermatogénesis, ya que ésta es capaz tanto de extenderse más allá de la época de actividad sexual en el oso pardo como de extenderse más allá, concretamente hasta 4 meses, del pico de testosterona sanguínea (Tsubota & Kanagawa, 1989). En este punto, es necesario mencionar la existencia de la denominada “challenge hypothesis”, descrita para aves por Wingfield et al. (1990) pero sugerida también para varias especies de mamíferos (Goymann et al., 2003). Según esta teoría, existe un cierto nivel de testosterona necesario para la reproducción, pero éste tiene la capacidad de verse incrementado muy por encima de dichos niveles básicos en relación a determinados estímulos ambientales como las interacciones entre machos o la presencia de hembras sexualmente receptivas. Así, podría argumentarse que, en nuestro estudio, aunque la testosterona circulante durante la época reproductiva tardía fue suficiente para mantener el comportamiento sexual, valores superiores durante la primera mitad de la época reproductiva responderían a estímulos ambientales específicos. Durante el periodo PB, tanto los aumentos de la competencia entre machos, cuyo máximo exponente sería el comportamiento agresivo entre ellos, como los aumentos de la intensidad en el comportamiento de monta detectados podrían jugar un papel importante en el marcado aumento de T durante el pico de actividad sexual encontrado en este trabajo. Sin embargo, los índices de ambos comportamientos no son estadísticamente distintos durante el resto de la época reproductiva (EB y LB), y por tanto no explicarían la diferencia en T al comienzo y final de la misma. Mecanismos hormonales subyacentes, potencialmente modulantes de los niveles de testosterona sanguíneos y del comportamiento reproductivo, deberían tenerse en cuenta para comprender tal evolución. Un estudio previo señaló una relación positiva de la testosterona con la condición corporal en oso negro asiático (Tomiyasu et al., 2021); sin embargo, en los machos de Cabárceno no se observó una correlación entre testosterona (Tes_Log) y peso corporal ($p = 0,07$; $r = 0,14$).

Cortisol

Los niveles de cortisol ($3,6 \pm 0,3 \mu\text{g/dL}$) registrados en los osos macho adultos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno, conviviendo en régimen de semilibertad, se encuentran dentro de los rangos de referencia ofrecidos por Græsli et al. (2014) para oso pardo europeo silvestre de cualquier edad ($1,63 - 20,48 \mu\text{g/dL}$), así como dentro del intervalo de confianza del 95 % mostrado por Lindsjö (2010) para oso grizzly ($3 - 6,52 \mu\text{g/dL}$). De hecho, su promedio se acerca más al valor mínimo de cada rango presentado por ambos trabajos previos y, de la misma manera, resulta inferior al promedio de cortisol encontrado, también para grizzly, por Cattet et al. (2003) ($5,33 \pm 0,6 \mu\text{g/dL}$). Por tanto, podríamos afirmar que la concentración de cortisol sanguíneo de los machos de Cabárceno no revela una situación de estrés crónico basal, el cual podría presuponerse debido a su régimen de manejo en cautividad y/o a un ambiente de elevada densidad poblacional. Tal comparación debe quedar sujeta a discusión ya que no debemos olvidar que el método de captura es uno de los factores de variación del cortisol sanguíneo más habitualmente demostrados, y el utilizado en Cabárceno no coincide fielmente con el elegido por Cattet et al. (2003), Græsli et al. (2014) ni Lindsjö (2010). Si bien en todos ellos se ha utilizado la teleanestesia sin restricción física, existen diferencias en el método de captura que podrían significar variaciones en el nivel de estrés agudo del animal anestesiado y por consiguiente de la reacción endocrina del mismo al agente estresor.

La falta de diferencias anuales en los niveles de cortisol circulante encontrada en los machos de Cabárceno coincide con anteriores análisis en oso pardo americano, tanto silvestres (Lindsjö, 2010) como cautivos (Ware et al., 2013), y en oso pardo europeo subadulto (Græsli et al., 2015). Tan sólo un estudio previo, llevado a cabo por Von Der Ohe et al. (2004) reveló cambios en el cortisol fecal del oso pardo entre junio y septiembre dependientes del tipo de dieta. Resulta llamativo que para otros úrsidos como el oso negro y panda sí se detecten de forma habitual variaciones temporales en el cortisol según el momento del año (Harlow et al., 1990; Hellgren et al., 1993; Kersey et al., 2010; MacDonald et al., 2006; Owen et al., 2005; Palumbo et al., 1983). Debemos tener presente la posibilidad de que los datos se encuentren sesgados debido a factores estresantes como por ejemplo enfrentamientos intraespecíficos previos o el mismo proceso de anestesia y captura, ya que en mamíferos se pueden encontrar aumentos detectables de los niveles de cortisol corporal tan sólo 3 minutos tras el estímulo desencadenante (Sheriff et al., 2011), es decir, un tiempo menor del necesario para la inducción anestésica. Un hipotético estrés durante la captura sería muy variable dependiendo de la reacción del animal a la misma; en el grupo de osos de Cabárceno, existen machos que no modifican su comportamiento durante la captura salvo un breve movimiento de cabeza en el

momento del disparo del dardo anestésico, mientras que otros individuos huyen y se muestran esquivos. No encontramos motivos por los cuales la posibilidad de sufrir mayor o menor estrés durante la captura pudiese variar estacionalmente; por lo tanto, la existencia, aleatoria y probablemente común, de eventos durante la inducción relacionados con la anestesia u otros factores que supongan estrés agudo asociado podrían estar enmascarando un ritmo endógeno en los niveles de cortisol circulante. En futuros estudios sería recomendable el uso de otro tipo de muestras biológicas para investigar esta hipótesis, tales como el pelo, indicador de las concentraciones de cortisol a medio y largo plazo y que no se ve afectado por el estrés agudo. Otros indicadores de estrés agudo serían la frecuencia cardíaca, la cual queda alterada por la anestesia, el ratio neutrófilos/linfocitos o la concentración de glucosa.

Serie roja y plaquetaria

El promedio de los valores de hematocrito y de concentración de hemoglobina y eritrocitos observados en los machos de Cabárceno se encuentran dentro de los rangos de referencia establecidos por Græsli et al. (2015) para individuos subadultos en primavera y verano. Sin embargo, los datos de nuestro estudio obtenidos durante febrero (PreB) para las tres variables son mucho menores que los exhibidos en febrero y marzo por osos subadultos en estado de libertad en Suecia (Græsli et al., 2015). El periodo reproductivo inicial en Cabárceno correspondería en parte con el rango determinado para el invierno (febrero-marzo) y para la primavera (abril-mayo) por Græsli et al. (2015), pero sus valores tampoco se ajustarían a los rangos invernales. Los resultados obtenidos para la segunda mitad del año no pueden compararse ya que Græsli et al. (2015) no establecieron rangos entre julio ni enero. El hecho de que dichos indicadores de la serie roja sanguínea no experimenten cambios significativos durante la primera mitad del año en los machos del Parque de Cabárceno y por tanto que los resultados de las muestras obtenidas en invierno (febrero y marzo) sean similares a las del verano es contrario a lo descrito habitualmente para la especie (Græsli et al., 2015; Hissa et al., 1994) y para el oso negro americano (Erickson & Youatt, 1961; Hellgren, 1989), donde los datos de primavera son mayores que en verano para hematocrito (Græsli et al., 2015; Pearson & Halloran, 1972), hemoglobina (Græsli et al., 2015) y concentración de eritrocitos (Pearson & Halloran, 1972). La explicación a este hecho podría encontrarse en el estado metabólico de los osos muestreados en este trabajo. En los estudios que describen aumentos en los parámetros de la serie roja durante el invierno, éste suele atribuirse a la deshidratación y hemoconcentración inherente al estado de letargo invernal. Los osos muestreados en febrero y marzo en Cabárceno, al contrario, se encontraban en el área de alimentación y desplazándose activamente, y por ello su hemograma se acerca más al de los osos silvestres en estado activo.

La falta de diferencias en la concentración de eritrocitos y en el hematocrito durante la época reproductiva no concuerda con la disminución desde primavera al verano observada previamente en oso pardo (Græsli et al., 2015; Pearson & Halloran, 1972). En los machos del Parque de Cabárceno, existe una tendencia al descenso en los hematíes, hematocrito y hemoglobina durante PostB, aunque sólo hubo diferencias significativas en la hemoglobina con respecto al periodo reproductivo inicial y en las plaquetas con la totalidad de la época reproductiva. No se conocen referencias similares de valores mínimos de hematíes, hematocrito o hemoglobina previos al letargo invernal en oso pardo u oso negro americano. De hecho, referencias anecdóticas en la especie, de un pequeño número de animales, indicaban lo contrario (Hissa et al., 1994; Pearson & Halloran, 1972) pero estudios más amplios serían necesarios para llegar a tal conclusión. Es importante puntualizar el pequeño número de osos adultos estudiados: Græsli et al. (2015) utilizaron únicamente animales subadultos en su estudio, Hissa et al. (1994) sólo incluyeron un oso adulto, y Pearson & Halloran (1972) analizaron datos de 22 individuos incluyendo adultos y subadultos. Por tanto, los datos aquí presentados constituyen la información más extensa sobre variaciones de parámetros de la serie roja y plaquetaria en oso pardo adulto en la fase activa del ritmo biológico anual. La falta de datos de animales aletargados en nuestro estudio impide distinguir si la disminución observada al final del otoño es temporal y los valores se incrementaron en diciembre y enero al igual que en otras poblaciones o si los animales muestreados poseían un estado fisiológico distinto al de los osos silvestres debido a futuras variaciones en la duración o intensidad del inminente letargo invernal. Diferencias nutricionales también podrían influir en la serie roja sanguínea, especialmente aquellas relacionadas con el hierro por su papel en la síntesis de hemoglobina, sin embargo no existen evidencias de anemia por deficiencia de hierro en oso pardo europeo en libertad (Pearson & Halloran, 1972) y las carencias de hierro en los osos que habitan en Cabárceno son muy poco probables debido a su variada y abundante alimentación y al hecho de que el suelo de su recinto contiene elevadas cantidades del mineral ya que éste constituía parte de una antigua mina de extracción de hierro a cielo abierto. La superior calidad de la dieta de los osos de Cabárceno puede explicar la falta de diferencias significativas en el hematocrito y las concentraciones de eritrocitos y hemoglobina durante la mayoría del año. Por su parte, la disminución de plaquetas previa a los meses de invierno observada en los machos de Cabárceno puede deberse a una disminución progresiva de las mismas ya que está descrito una trombocitopenia fisiológica reversible durante el letargo invernal en el oso pardo (Arinell et al., 2018). Las implicaciones de este hecho aún no se encuentran descritas para el oso pardo. La reducción de la concentración de plaquetas en otras especies está relacionada con disminuciones en los niveles de tromboembolismo, lo cual es muy conveniente en estados

disminuidos de actividad física como la hibernación. Sin embargo, esta relación sólo se ha descrito con contajes de plaquetas inferiores a $150 \times 10^3/\mu\text{l}$, es decir, por debajo de los registrados en el oso pardo por Arinell et al. (2018) durante el invierno ($174 \pm 51 \times 10^3/\mu\text{l}$) y por este trabajo durante PostB ($231,0 \pm 38,8 \times 10^3/\mu\text{l}$).

Serie blanca

El promedio de los valores de leucocitos totales encontrados en los machos de Cabárceno se encuentra dentro de los rangos de referencia establecidos por Græsli et al. (2015) para individuos subadultos en cualquier época del año. En nuestros resultados, los leucocitos, neutrófilos y monocitos aumentan progresivamente, aunque no de forma significativa, hasta sus valores máximos del año durante el periodo de más intensa actividad sexual (PB), que corresponde con la parte central de la primavera. La evolución subsiguiente en los mismos resulta en una disminución estadísticamente significativa entre finales de primavera (PB) y la mayoría del verano (LB). Estos resultados son contrarios a lo encontrado hasta ahora el para contaje total de glóbulos blancos para oso pardo, ya que estudios previos señalaban menores concentraciones durante la primavera que en verano (Kusak et al., 2005; Pearson & Halloran, 1972). No obstante, en la comparación realizada por Kusak et al. (2005) los datos de la primavera englobaban los valores de primavera e invierno, lo cual podría alterar los resultados ya que está ampliamente demostrado que en invierno sucede una leucopenia marcada, habitual en especies hibernantes y explicada por una probable depresión de la función inmune durante la hibernación (Hellgren, 1995). Por su parte, los datos presentados por Halloran & Pearson (1972) con un tamaño muestral mucho menor que el de nuestro estudio presentan dos particularidades que podrían explicar las diferencias en cuanto a nuestros resultados: más de la mitad de sus datos correspondientes a la primavera se señalan como animales recién salidos de la hibernación, lo cual no se equipara con los datos de EB en nuestro estudio; y, además, la mitad de sus animales muestreados en el verano tenían heridas punzantes e infectadas en cara y flancos. Infecciones, estrés y ejercicio muy intenso son algunas de las causas que pueden producir aumentos en el recuento de glóbulos blancos. Pearson & Halloran (1972) señalaron que las muestras obtenidas en verano se caracterizaban porque la leucocitosis era de tipo neutrofílico, al igual que en nuestro trabajo. En los osos de Cabárceno, la época central de actividad reproductiva, que sucede en primavera, es aquella en la que se encuentran más heridas recientes debido a enfrentamientos intraespecíficos (datos propios no publicados). Además, la mayor excitación sexual y el estrés metabólico de un balance energético negativo podrían suponer niveles mayores de estrés, que no han podido demostrarse en base a los niveles de cortisol medido en suero sanguíneo. Otra forma de evaluar el estrés es el ratio

neutrófilos/linfocitos, el cual presenta su máximo durante el PB (0,77 frente a 0,72 en el resto de la época reproductiva, 0,7 en PreB y 0,65 en PostB). El leucograma de estrés típico se caracteriza por una situación de leucocitosis con neutrofilia, linfopenia y eosinopenia, lo cual correspondería con los datos de PB en comparación con LB en nuestro estudio, exceptuando la linfopenia. No se ha encontrado una explicación plausible a los valores no disminuidos de linfocitos en dicho periodo, pero alguna causa adicional ha podido modificar una linfopenia fisiológica asociada al leucograma de estrés. Por tanto, los valores máximos de glóbulos blancos y neutrófilos durante la época reproductiva central podrían explicarse debido a una situación de estrés en combinación con heridas infectadas, derivadas de los enfrentamientos entre machos. Este estudio revela por primera vez la existencia de variaciones en todos los tipos de células inmunes circulantes en el oso pardo asociadas a su estacionalidad reproductiva.

Proteínas totales

Si nos centramos en la bioquímica sanguínea, encontramos que los valores promedio de proteínas totales en sangre durante la fase activa ($7,6 \text{ g/dL} \pm 0,1$) son ligeramente mayores al intervalo de referencia establecido por Græsli et al. (2014) para oso pardo europeo adulto ($5,3\text{-}7,4 \text{ g/dL}$) y que se acercan más a los descritos por Jamnicky et al. (1987) para osos en libertad en Croacia ($7,98 \text{ g/dL} \pm 0,75$) que en osos cautivos ($6,24 \text{ g/dL} \pm 0,68$), aunque el pequeño tamaño muestral de su estudio no mostró diferencias significativas entre ellos. El nivel de proteínas sanguíneas en los machos adultos de Cabárceno varía estacionalmente, como en la mayoría de estudios al respecto, y es menor durante el pico de actividad reproductiva (PB) con respecto a LB y PostB, es decir a la segunda mitad del año. Esto contradice lo descrito hasta ahora por Græsli et al. (2015) y Schroeder (1987), que afirmaban que las proteínas eran mayores en los meses de febrero y marzo o en primavera, respectivamente. La hipótesis más plausible es que su evolución se deba principalmente a un efecto del aporte externo de proteínas en la dieta. Un posible efecto derivado de una hemoconcentración debido a deshidratación queda descartado en nuestro caso ya que no existe un aumento paralelo de proteínas y hematocrito. Por otra parte, se ha sugerido en varias ocasiones una relación entre el peso y la concentración de proteínas en sangre en úrsidos (Schroeder, 1987; Tryland et al., 2002), pero nuestros datos no defienden esta premisa de forma estricta. Finalmente, se debe tomar en consideración que la privación nutricional produce una rápida disminución de las proteínas sanguíneas (Rouvinen-Watt et al., 2010). Aunque la condición corporal más baja de los machos de Cabárceno sucede al final de la época reproductiva, cuando ya se ha comenzado a aumentar la cantidad de comida suministrada por parte de los cuidadores, durante el pico de actividad reproductiva existe un menor apetito, debido probablemente a los elevados niveles de excitación sexual derivados del aumento de la

testosterona. Hay que recordar que en la población de osos de Cabárceno no varía la proporción de proteína aportada en la dieta externamente, sino solamente la cantidad de comida total administrada. En condiciones de libertad sin embargo, el aporte de proteína en la dieta sí varía estacionalmente, de forma que los osos escandinavos obtienen una dieta más rica en proteínas durante la primavera y el verano (Stenset et al., 2016). Esto explicaría los aumentos de proteínas totales en primavera previamente comentados, pero un análisis más exhaustivo, contemplando también las diferencias asociadas a sexo y edad, sería necesario para comprender por qué las proteínas no se encuentran también aumentadas en verano, cuando la dieta todavía es rica en contenido proteico.

Colesterol

Del mismo modo, los valores promedio de colesterol total en sangre durante la fase activa ($260,3 \pm 4,0$ g/dL) se ajustaron al rango de referencia establecido por Græsli et al. (2015) para oso pardo europeo subadulto en primavera y verano en Suecia (154,4 - 440,2 g/dL). Græsli et al. (2014) no encontraron diferencias en el colesterol asociadas a la edad en osos silvestres en Suecia. Al igual que sucedía con las proteínas, la concentración de colesterol mínima del ritmo fisiológico anual del oso pardo se observó durante el pico de actividad reproductiva. Sin embargo, Græsli et al. (2015) no encontraron cambios entre los niveles correspondientes al verano y primavera en oso pardo europeo. Es posible que nuestros datos no coincidan con lo descrito previamente debido a diferencias asociadas a la edad, ya que el estudio de Græsli et al. (2015) incluía únicamente individuos subadultos. Mayores fluctuaciones en machos adultos podrían responder a variaciones fisiológicas relacionadas con la actividad reproductiva y/o la dieta. Hay que recordar que el colesterol tiene un papel fundamental para la espermatogénesis y la producción de testosterona. De hecho, existe una correlación negativa ($p < 0,01$; $r = -0,48$) entre los niveles de colesterol y de testosterona. Sin embargo, estudios previos indican que el colesterol requerido para la espermatogénesis proviene de lipoproteínas sanguíneas y no del colesterol circulante (Rouvinen-Watt et al., 2010). Resulta llamativo que la descripción de los resultados de colesterol en sangre en cinco mediciones en el mismo oso cautivo entre septiembre y mayo de Hissa et al. (1994) mostraron datos abiertamente contrapuestos a los nuestros. En todo caso, mayores concentraciones de colesterol previas al letargo invernal están en consonancia con los aumentos de colesterol previamente descritos durante el invierno en el oso pardo (Arinell et al., 2012; Græsli et al., 2015; Sommer et al., 2016; Stenvinkel et al., 2013) y en general para las especies hibernantes.

Glucosa

El promedio de la concentración de glucosa sanguínea ($127,5 \pm 2,7$ mg/dL) también está dentro de los rangos de referencia establecidos por Græsli et al. (2014) para oso pardo europeo adulto en libertad (59,4 - 196,3 mg/dL). Los datos aquí presentados contribuyen a la descripción del ritmo fisiológico del oso pardo, de forma que por primera vez se muestran datos de glucosa durante el otoño en la especie. La evolución observada hasta el otoño fue similar a la descrita por Græsli et al. (2015) para subadultos, con valores primaverales mayores que los estivales, en contraposición a las conclusiones de Halloran & Pearson (1972), que afirmaban lo contrario con un tamaño muestral mucho menor en el que se incluían animales de cualquier edad. Respecto al otoño, resulta reseñable que existan importantes diferencias entre los niveles de glucosa del final de la época reproductiva (LB) con los determinados en septiembre, octubre y noviembre (PostB), teniendo en cuenta que ambos periodos podrían considerarse con un balance energético positivo ya que a partir del pico de actividad sexual se puede observar un aumento del apetito y, presumiblemente, una disminución paulatina del nivel de actividad física asociada a la reproducción en los machos. Por el contrario, Huber et al. (1997) no encontraron diferencias en la concentración de glucosa del invierno y primavera en comparación con el verano y otoño.

Una correlación de la evolución de la glucosa sanguínea con la del peso corporal, encontrada en nuestro trabajo, también ha sido descrita en oso negro americano (Schroeder, 1987). La explicación a este fenómeno se torna compleja debido a que, aunque el diseño experimental de este estudio ha permitido minimizar al máximo los posibles elementos modulantes de la glucosa en sangre como la edad, factores ambientales y de manejo o el momento de muestreo, algunos factores condicionantes entre los que se encuentran la dieta o el nivel de ejercicio físico, estrés o incluso otros parámetros endocrinos quedan aún sujetos a variación en los individuos muestreados. Los cambios en los procesos anabólicos y catabólicos de un animal con variaciones tan drásticas en su composición corporal implican distintas alternativas en los sustratos utilizados como fuente de energía a lo largo del año. Parece no obstante que la condición corporal y por tanto la composición corporal, y no tanto el balance energético, es el factor determinante del metabolismo que determina la concentración de glucosa libre disponible en sangre en los machos de oso pardo.

En resumen, los machos de oso pardo se caracterizan por profundos cambios comportamentales y fisiológicos a lo largo de su ciclo anual. El fenómeno de la hibernación ha captado la atención de la comunidad científica durante décadas, pero la dinámica de su ritmo biológico durante la fase activa anual se encuentra mucho menos estudiada. La complejidad de la recogida de datos en el oso pardo en su hábitat se refleja en la escasa calidad de los datos disponibles sobre la

cronología de la época reproductiva y sobre las variaciones anuales de los principales parámetros morfológicos y fisiológicos. Las variaciones en la distribución temporal de la época reproductiva entre las distintas poblaciones (García-Rodríguez et al., 2020), así como los numerosos factores ambientales y endógenos que regulan la homeostasis corporal, complican la extrapolación de los resultados que la bibliografía ha aportado para el estudio del ciclo biológico anual del oso pardo. Debido a la utilización exclusiva de machos adultos procedentes de una misma población, este estudio ha permitido eliminar varios de los más importantes factores de variación (sexo, edad, y numerosos factores ambientales derivados de la localización y modo de vida) en el análisis integral de los eventos biológicos en el oso pardo. El estudio en conjunto de los cambios etológicos, morfológicos, metabólicos y endocrinos en función de la estacionalidad reproductiva aporta un conocimiento generalizado de la biología reproductiva que servirá como base en la adaptación y aplicación de técnicas de reproducción asistida imprescindibles en el desarrollo de bancos de recursos genéticos. La época reproductiva en los osos del Parque de Cabárceno muestra comportamiento de monta entre marzo y agosto, siendo la población con la monta más temprana registrada hasta el momento. La época reproductiva se divide en tres periodos (EB, PB y LB) en base a la existencia de un pico central con elevadas frecuencias de monta y elevadas concentraciones de testosterona en sangre (segunda quincena de abril y el mes de mayo (PB)), coincidente en parte con los datos referentes a la población más cercana geográficamente que es la que habita en la Cordillera Cantábrica donde la intensidad en la actividad reproductiva parece suceder en mayo (Blanco et al., 2022; Fernández-Gil et al., 2006). Este periodo reproductivo central se caracteriza por la mayor expresión del comportamiento agresivo de los machos, tanto en general como hacia otros machos; por el contrario, es el único periodo del año con una disminución en el comportamiento de juego. El nivel de estimulación sexual, pero sobre todo la brusca subida en la concentración de testosterona circulante, se asocia por tanto a una mayor agresividad y a la casi desaparición del comportamiento amistoso. La existencia de comportamiento sexual en el resto de la época reproductiva con concentraciones de testosterona muy inferiores apoyaría la teoría de Wingfield et al (1990) denominada “challenge hypothesis”, según la cual los niveles de testosterona pueden incrementarse muy por encima de aquellos necesarios para la función reproductiva ante determinados estímulos ambientales como las interacciones entre machos o la presencia de hembras sexualmente receptivas. El cortisol sérico no muestra variaciones durante todo el año, pero se recomienda el uso de otras muestras biológicas en las que los resultados no muestren variabilidad a corto plazo para estudiar posibles artefactos en el método derivadas del estrés agudo durante la inducción anestésica. El peso corporal es mayor cuando comienza la actividad reproductiva, y disminuye a partir de PB debido al desgaste energético

que ésta conlleva en los machos. El final de la época reproductiva se caracteriza por niveles la máxima presencia de osos en el área de estudio ya que coincide con el comienzo de del comportamiento de hiperfagia, pero similares índices de comportamiento de monta y de testosterona sérica con respecto al comienzo de la época reproductiva. El periodo LB es también el momento de la época reproductiva donde existe mayor concentración sanguínea de colesterol, pero menores registros en el volumen testicular y glucosa en sangre. Existen por tanto profundas variaciones en todos los aspectos comportamentales y morfológicos estudiados y en la mayoría de los fisiológicos durante la época reproductiva, los cuales subrayan la necesidad de tener en cuenta la estacionalidad reproductiva, también en cuanto a su intensidad, a la hora de interpretar cualquier parámetro biológico en el oso pardo.

9. EXPERIENCIA III

**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE LOS
EYACULADOS DE OSO PARDO (*Ursus arctos*)**

9.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

La tercera experiencia de esta tesis doctoral trata sobre el estudio de los factores que influyen en la calidad de los eyaculados de oso pardo. El diseño experimental de dicho estudio se presenta a continuación en la Tabla 15 y la Figura 19.

Tabla 15. Diseño experimental del estudio de los factores que influyen en la calidad de los eyaculados de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno.

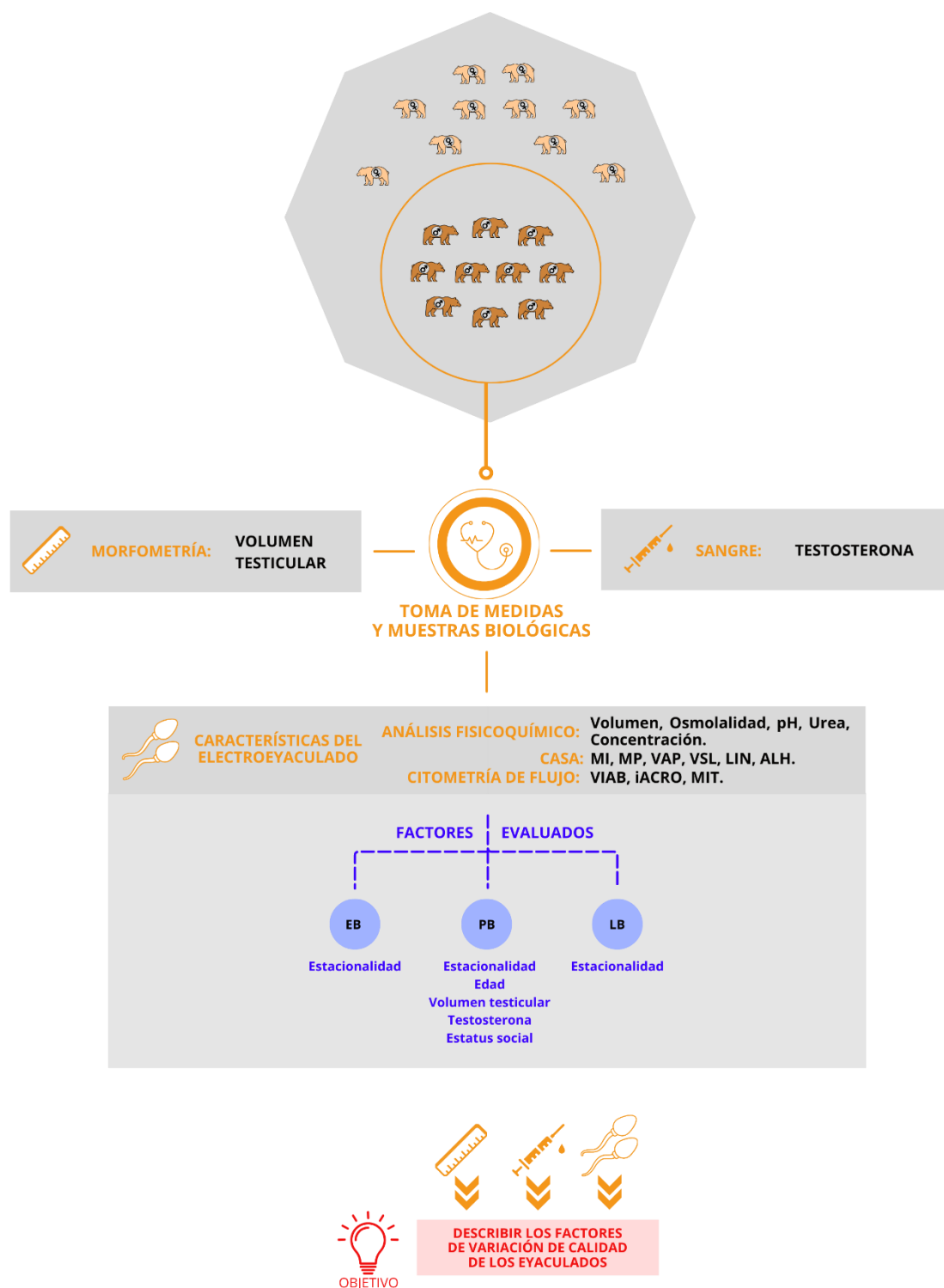
METODOLOGÍA	CRONOLOGÍA	CONDICIONES DE MUESTREO	Nº INDIVIDUOS	PARÁMETROS EVALUADOS
TOMA DE MEDIDAS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS	10 años (Febrero a octubre)	236 capturas (196 FR totales; 188 FR en época reproductiva)	32	Parámetros morfométricos: eje longitudinal de ambos testículos (cm), eje transversal de ambos testículos (cm).
				Hormonas en sangre: testosterona (ng/mL).
				Parámetros seminales: volumen (mL); pH; pO (mOsm/kg); contenido en urea (mg/DL); concentración (espermatozoides $\times 10^6$ /mL); MI (%): spz móviles totales; MP (%): spz con movimiento progresivo; VAP (μ m/s): velocidad media; VSL (μ m/s): velocidad rectilínea; LIN (%): linealidad; ALH (μ m): amplitud del movimiento lateral de la cabeza; iACRO (%): spz viables con acrosomas intactos (PI-/PNA-); VIAB (%): spz viables (SYBR14+/PI-); MIT (%): spz con alto potencial de membrana (JC1+).

Un total de 236 capturas bajo anestesia general de 32 machos distintos proporcionaron información sobre: parámetros morfométricos testiculares, parámetros endocrinos utilizando muestras sanguíneas, así como parámetros seminales de los eyaculados obtenidos mediante electroeyaculación utilizando una recogida fraccionada.

Esta experiencia tiene como objetivo el estudio de las características seminales (cuantitativas y cualitativas) de eyaculados de oso pardo en relación a cinco factores (periodo, edad, volumen testicular, nivel de testosterona y estatus social) de importancia en la biología reproductiva del oso pardo que han sido caracterizados en las experiencias previas descritas en este manuscrito. El factor estatus social pudo establecerse para dos de los años estudiados, considerándose su efecto también el año inmediatamente anterior y el inmediatamente posterior a ellos debido a la estabilidad de las relaciones de dominancia estudiadas, y por tanto dicho factor sólo se consideró para 4 de los años estudiados. En primer lugar, se analizó para cada parámetro seminal el efecto del factor periodo dentro de la estación reproductiva (EB = marzo y primera quincena de abril, PB = segunda quincena de abril y mayo y LB = junio, julio y agosto). En segundo lugar, los factores restantes fueron estudiados durante el periodo reproductivo central (PB). Para ello, se estableció una clasificación de cada uno de dichos factores en tres grupos: para la edad "GE_1" = hasta 10 años, "GE_2" = entre 10 y 20 años, y "GE_3" = mayor de 20 años; para el volumen testicular "VOL1" = hasta 60 cm³, "VOL2" = entre 60 y 80 cm³, y "VOL3" = mayor de

80 cm³; para los niveles sanguíneos de testosterona “GTES_1” = menor de 1 ng/mL, “GTES_2” = entre 1 y 10 ng/mL, “GTES_3” = mayor de 10ng/mL; y finalmente para el estatus de dominancia “Dm” = dominantes, “In” = rango intermedio, “Sb” = subordinado, según la clasificación de los machos previamente establecida en la primera experiencia.

Figura 19. Diseño experimental del estudio de los factores que influyen en la calidad de los eyaculados de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto.



9.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los factores con capacidad para definir la calidad seminal de los machos fueron analizados aplicando un método lineal generalizado (procedimiento MIXED) con el fin de evaluar el efecto de los periodos reproductivos (3 periodos), de la edad de los individuos (3 grupos), del volumen de sus testículos (tres grupos), del nivel de testosterona (tres grupos), y del estatus social (3 clases de dominancia).

Asimismo, un análisis de correlaciones (procedimiento CORR) fue aplicado para determinar la relación lineal (coeficientes de Spearman) entre distintos parámetros etológicos (dominancia: Dm, In y Sb), estacionales (periodos: EB, PB y LB) y endocrinos (testosterona sérica; ng/mL) y algunos factores intrínsecos de los individuos (edad: años; y volumen testicular: cm³).

9.3. RESULTADOS

9.3.1. Características generales de los eyaculados

Para la obtención de las muestras seminales, 236 electroeyaculaciones bajo anestesia general fueron realizadas entre los meses de febrero y octubre (10 años; Tabla 6). La fecha más temprana en la que se obtuvieron espermatozoides mediante electroeyaculación fue el 8 de febrero y la más tardía el 28 de octubre, coincidiendo con la fecha más temprana y tardía de captura la toma de muestras biológicas. La frecuencia quincenal de las capturas en las que se obtuvieron espermatozoides y aquellas en las que no ($N = 14$; 6 % del total) puede observarse en la Figura 20. En total, se obtuvieron eyaculados en 222 electroeyaculaciones. Aunque existe una menor intensidad de muestreo en los meses no reproductivos que dificulta el análisis de los datos, parece existir una tendencia a un mayor número de capturas sin obtención de espermatozoides por electroeyaculación durante la época no reproductiva (28 % frente al 4 % de las capturas azoospermicas sucedidas en la época reproductiva).

Finalmente, en 26 de esas electroeyaculaciones no pudo obtenerse una fracción no urospermica. De esta manera, sólo 196 de las sesiones de electroeyaculación dieron como resultado una muestra seminal con espermatozoides sin contaminación con orina según los criterios de urospermia descritos con anterioridad, de las cuales 8 sucedieron durante la época no reproductiva y 188 durante la época reproductiva.

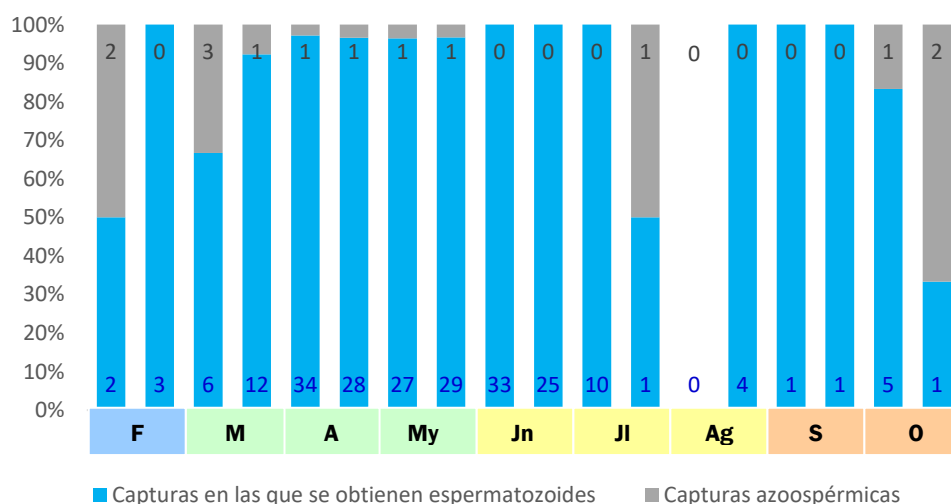


Figura 20. Distribución quincenal de las capturas utilizadas para la recogida de muestras seminales mediante electroeyaculación según la presencia o ausencia de espermatozoides. "F", "M", "A", etc., corresponden con los meses del año (febrero, marzo, abril, etc.). Los números indican número de capturas para los dos tipos diferenciados de muestras: negro para las capturas en las que no se obtuvieron espermatozoides en la electroeyaculación (azoospermicas) y azul para las capturas en las que se obtuvieron espermatozoides.

En esta experiencia, se emplearon los datos derivados del análisis de las 188 fracciones ricas o FR derivadas de las capturas realizadas durante la época reproductiva. La fracción rica es aquella fracción con mayor concentración espermática de cada eyaculado, y que se asume como representativa de la calidad seminal del macho en el momento de la recogida. Los principales resultados para los parámetros seminales cuantitativos, de movilidad espermática y aquellos relacionados con la viabilidad, integridad estructural y actividad mitocondrial de los espermatozoides elegidos como descriptivos de las muestras se pueden observar en la Tabla 16. Según estos datos generales, las fracciones ricas tienen promedios de pH de 8,3, de osmolalidad ligeramente inferior a 300mOsm/kg, de porcentaje de espermatozoides móviles totales de un 74,6 %, de porcentaje de espermatozoides progresivos de un 45,5 %, velocidades medias y rectilíneas de sus espermatozoides de 100,2 $\mu\text{m/s}$ y 75,0 $\mu\text{m/s}$ respectivamente, un porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas intactos (PI/PNA) del 79 %, una viabilidad del 76,5 % (SIBR14/PI), y un porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (JC-1) del 71,5 %.

Tabla 16. Características seminales de la fracción rica (N = 188) de los eyaculados de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno obtenidos mediante electroeyaculación durante la época reproductiva (marzo - agosto).

Parámetro	N	Media \pm SEM	Mín. – Máx.
pH	180	8,3 \pm 0,0	6,7 - 9,3
Osmolalidad (mOsm/kg)	165	296,1 \pm 1,8	208,0 - 409,0
Volumen (mL)	188	1,9 \pm 0,1	0,3 - 10,5
Concentración (spz x 10 ⁶ /mL)	188	294,3 \pm 21,2	0,0 - 1417,5
Producción (spz x 10 ⁶)	188	545,0 \pm 51,9	0,0 - 5321,0
MI (%)	170	74,6 \pm 1,3	24,0 - 99,5
MP (%)	170	45,5 \pm 1,5	1,4 - 90,8
VAP ($\mu\text{m/s}$)	170	100,2 \pm 1,9	37,4 - 156,2
VSL ($\mu\text{m/s}$)	170	75,0 \pm 2,0	14,7 - 140,2
LIN (%)	170	49,6 \pm 0,7	26,8 - 73,4
ALH (μm)	170	5,0 \pm 0,1	1,8 - 10,4
iACRO (%)	178	79,0 \pm 0,9	31,0 - 98,9
VIAB (%)	140	76,5 \pm 1,1	10,0 - 94,0
MIT (%)	121	71,5 \pm 2,0	0,0 - 98,0

MI (%): Espermatozoides móviles totales; MP (%): Espermatozoides con movimiento progresivo; VAP ($\mu\text{m/s}$): Velocidad media; VSL ($\mu\text{m/s}$): Velocidad rectilínea; LIN (%): Linealidad; ALH (μm): Amplitud del movimiento lateral de la cabeza; iACRO (%): Espermatozoides viables con acrosomas intactos (PI/PNA-); VIAB (%): Espermatozoides viables (SYBR14+/PI-); MIT (%): Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (JC1+).

9.3.2. Análisis de los factores de variación de la calidad de los eyaculados

Cada parámetro de calidad del semen fresco fue analizado en función de cinco factores elegidos como posibles determinantes de calidad seminal: por un lado, la estacionalidad reproductiva, y, por otro lado, una vez eliminado el efecto de la estacionalidad, cuatro factores intrínsecos del individuo en el momento de la recogida de la muestra: la edad, el volumen testicular, los niveles de testosterona en sangre y el estatus social o de dominancia.

En primer lugar, el análisis de la influencia estacional sobre las características seminales mostró diferencias estadísticamente significativas entre periodos tanto en parámetros de producción seminal como cinéticos y relacionados con la viabilidad, integridad estructural y actividad mitocondrial de los espermatozoides (Figura 21 y Tabla A5). Con la finalidad de estudiar los factores dependientes del individuo (edad, volumen testicular, nivel de testosterona y estatus social) y teniendo en cuenta el efecto externo de la estacionalidad, las Tablas A6 a A19 (apéndice A) muestran para todos los parámetros estudiados los resultados obtenidos para cada factor en cada periodo. En segundo lugar, el efecto de la edad, el volumen testicular, los niveles de testosterona y el estatus social han sido estudiados en aquellas muestras obtenidas durante el periodo reproductivo central (PB) y pueden consultarse en las Figuras 22 a 25.

Las correlaciones entre dichos factores se pueden observar en la Tabla 17. Se encontró una correlación positiva de la testosterona (ng/mL) con la edad (años) ($p < 0,05$; $r = 0,16$) y con el volumen testicular (cm^3) ($p < 0,05$; $r = 0,19$), y una correlación negativa de la testosterona (ng/mL) con los periodos (EB, LB, LB) ($p < 0,01$; $r = -0,51$). Además, el volumen de los testículos (cm^3) también estuvo correlacionado positivamente con la edad (años) ($p < 0,01$; $r = 0,34$) y con las clases de dominancia (Dm, In, Sb) ($p < 0,05$; $r = 0,31$).

Tabla 17. Análisis de correlación entre los factores estudiados como posibles determinantes de la calidad de los eyaculados (coeficiente de correlación de Spearman).

	PERIODO		EDAD		VOLUMEN TESTICULAR		TESTOSTERONA		DOMINANCIA		
	Coef.	Prob> r	Coef.	Prob> r	Coef.	Prob> r	Coef.	Prob> r	Coef.	Prob> r	
PERIODO	-										
EDAD	0,088	0,244	-								
VOLUMEN TESTICULAR	-0,011	0,888	0,336	<0,001	-						
TESTOSTERONA	-0,514	<0,001	0,159	0,034	0,188	0,019	-				
DOMINANCIA	-0,061	0,639	-0,176	0,171	0,312	0,029	-0,078	0,545	-		

Periodo: 3 periodos reproductivos (EB, PB, LB); Edad (años); Volumen testicular (cm^3); Testosterona (ng/mL); Dominancia: 3 clases de dominancia (Dm, In, Sb).

9.3.2.1. Estacionalidad

Los parámetros indicadores de características fisicoquímicas y de producción seminal sólo mostraron diferencias estadísticamente significativas para el volumen de la fracción rica (Figura 21). En general, se observó una tendencia al aumento del volumen de la FR a lo largo de toda la época reproductiva (de marzo hasta agosto; $p = 0,07$ entre EB y PB, y $p < 0,05$ entre EB y LB).

Una evolución similar pudo apreciarse en algunos parámetros cinéticos, en concreto VAP, VSL y LIN, que fueron menores durante EB en comparación con LB ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,01$, respectivamente). Además, LIN fue inferior ($p < 0,05$) y VSL tendió a ser inferior ($p = 0,07$) durante el pico de actividad sexual (PB; segunda quincena de abril y mayo) que durante el siguiente periodo (LB; junio, julio y agosto).

El análisis de la influencia de la estacionalidad reproductiva sobre las características citofisiológicas de los espermatozoides mostró que el porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma intacto (iACRO) fue menor durante EB que durante PB y LB ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). Además, existió una tendencia hacia valores inferiores de VIAB al principio de la época reproductiva (EB) respecto a los otros dos periodos que la componen ($p = 0,05$ para ambos). El porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial no varió entre los tres periodos de la época reproductiva.

9.3.2.2. Edad

Respecto a las características fisicoquímicas, encontramos en primer lugar que los animales jóvenes de edad intermedia, entre 10 y 20 años, produjeron fracciones ricas de menor pH y menor concentración espermática que los osos jóvenes de menos de 10 años (0,05 en ambos casos) (Figura 22). No obstante, los cambios en la concentración espermática no se reflejaron en una disminución del número de espermatozoides totales ($p > 0,05$). En este punto, es necesario destacar que no existieron diferencias significativas en las características seminales para los animales de más de 20 años con respecto a los otros dos grupos de edad en ninguno de los parámetros estudiados.

Durante pico de actividad reproductiva, no existió efecto de la edad del macho donante ni en los parámetros de movilidad ni en los parámetros cinéticos analizados.

La edad del oso no influyó ni en el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto ni en la viabilidad, pero sí en el porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial, que fue superior en osos de edad intermedia respecto a los más jóvenes ($p < 0,05$).

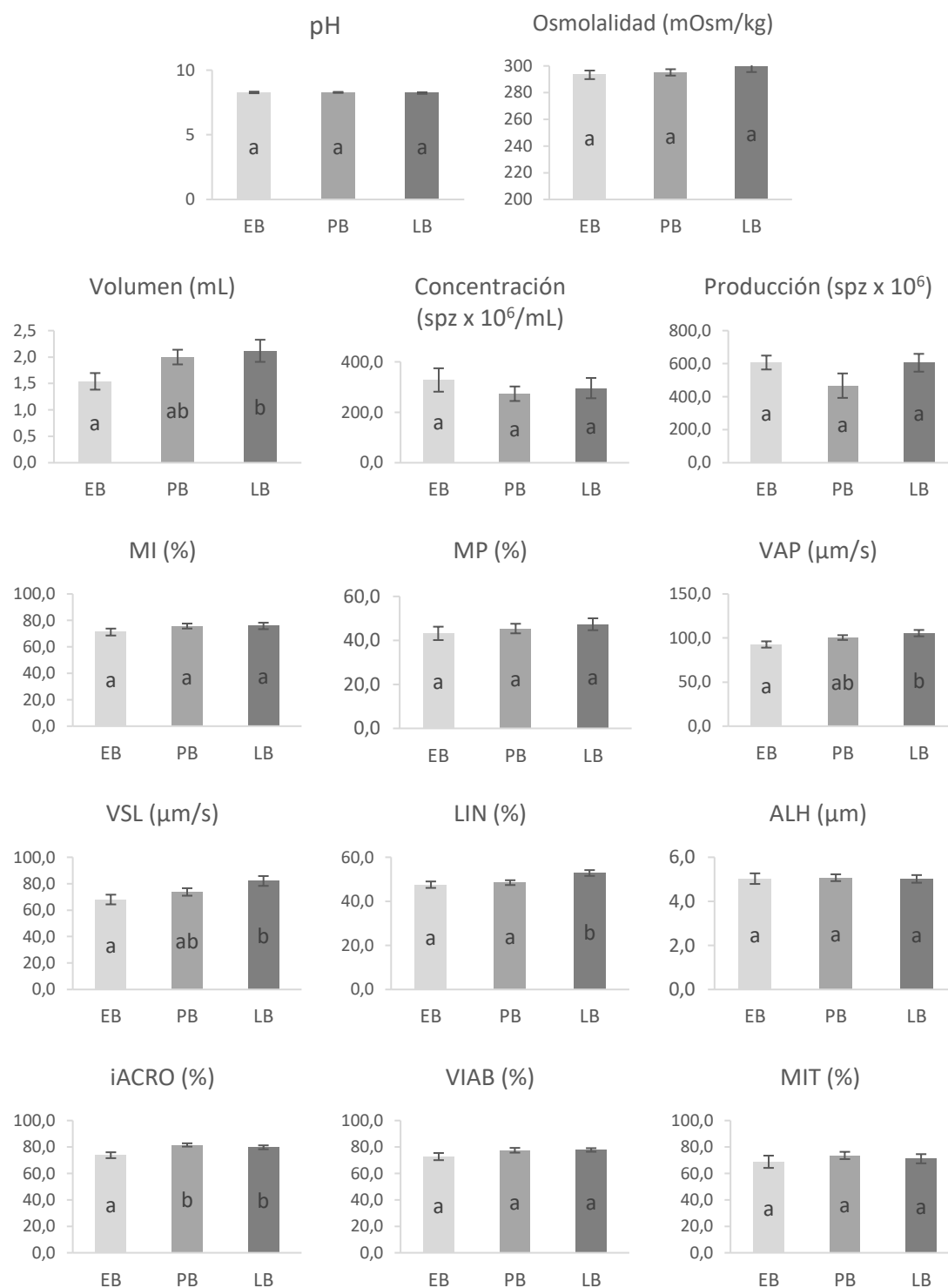


Figura 21. Parámetros seminales de la fracción rica del electroeyaculado en oso pardo durante la época reproductiva según periodos. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. MI (%): Espermatozoides móviles totales; MP (%): Espermatozoides con movimiento progresivo; VAP (µm/s): Velocidad media; VSL (µm/s): Velocidad rectilínea; LIN (%): Linealidad; ALH (µm): Amplitud del movimiento lateral de la cabeza. iACRO: Espermatozoides viables con acrosomas intactos (PI-/PNA-); VIAB: Espermatozoides viables (SYBR14+/PI-); MIT: Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (JC1+). Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

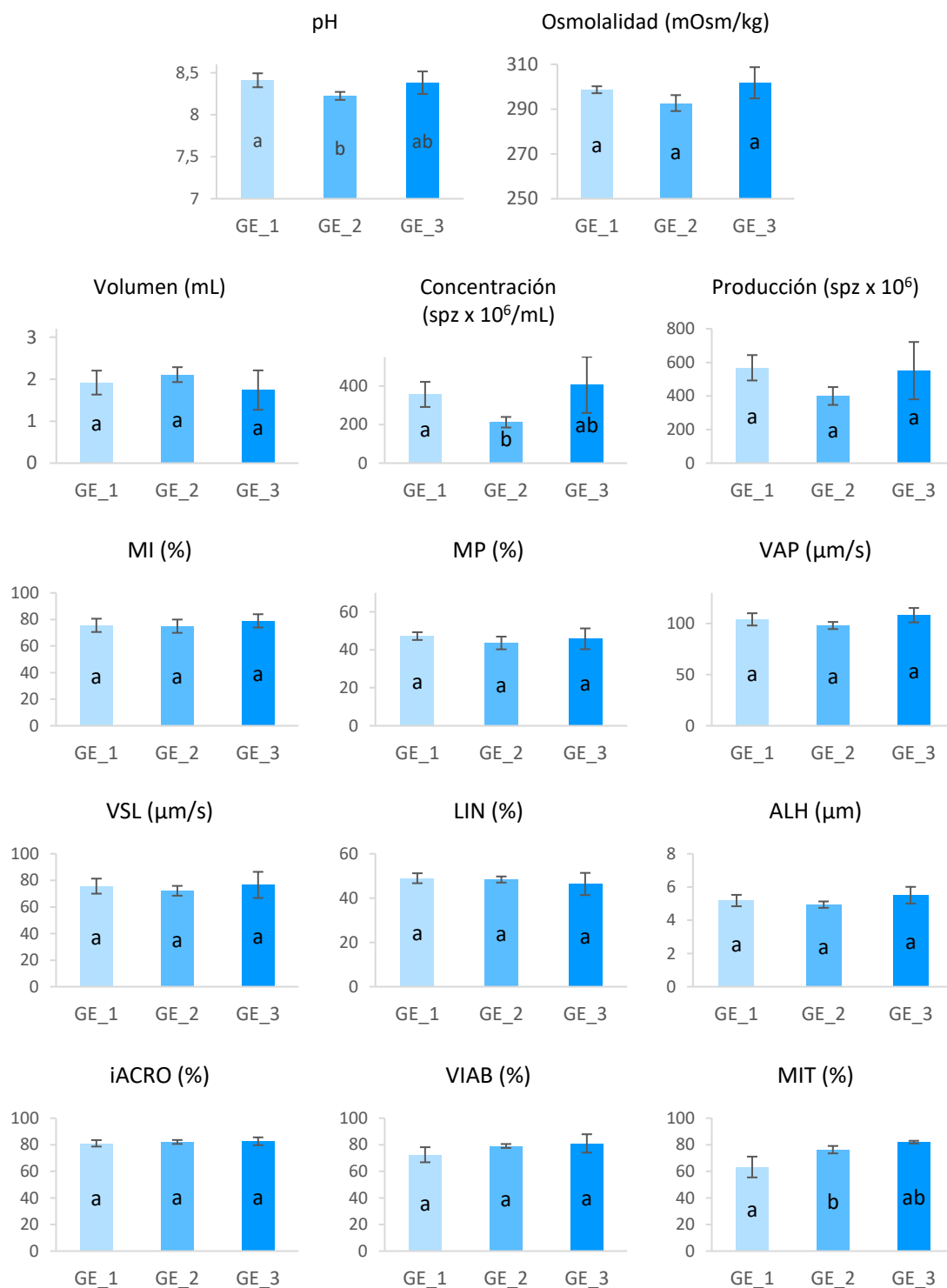


Figura 22. Parámetros seminales de la fracción rica del electroeyaculado en oso pardo durante el periodo reproductivo central (PB) según la edad (GE_1: hasta 10 años; GE_2: a partir de 10 y hasta 20 años; GE_3: mayor de 20 años). MI (%): Espermatozoides móviles totales; MP (%): Espermatozoides con movimiento progresivo; VAP (μm/s): Velocidad media; VSL (μm/s): Velocidad rectilínea; LIN (%): Linealidad; ALH (μm): Amplitud del movimiento lateral de la cabeza. iACRO: Espermatozoides viables con acrosomas intactos (PI-/PNA-); VIAB: Espermatozoides viables (SYBR14+/PI-); MIT: Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (JC1+). Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre grupos de edad (p < 0,05).

9.3.2.3. Volumen testicular

Los osos con mayor tamaño testicular en el momento de la captura (VOL3) aportaron eyaculados con una fracción rica de menor pH ($p < 0,01$), mayor volumen ($p < 0,01$), y mayor número de espermatozoides ($p < 0,05$) que aquellos con un tamaño de testículos intermedio (VOL2) (Figura 23). Además, esta misma evolución se puede observar entre VOL3 y los osos de menor tamaño testicular (VOL1), en forma de tendencia para el pH y el volumen de la fracción rica ($p = 0,07$ en ambos casos) y de forma significativa para el número de espermatozoides ($p < 0,01$). La concentración espermática también tendió a aumentar ($p = 0,08$) entre VOL1 y VOL3.

El volumen testicular no se relacionó con variaciones en la movilidad espermática (MI ni MP). Todos los parámetros cinéticos mostraron una disminución en sus valores promedio a medida que aumenta el volumen testicular, pero esto sólo se tradujo en diferencias significativas en el caso de una menor VAP y VSL de VOL3 en comparación con VOL1 ($p < 0,05$ para ambos casos), y en una tendencia para VSL entre VOL2 y VOL3 ($p = 0,06$).

No existió efecto del volumen testicular del macho donante sobre ninguno de los parámetros determinados mediante citometría de flujo.

9.3.2.4. Testosterona sérica

No existió efecto de los niveles de testosterona sérica (T) en las características fisicoquímicas ni con los parámetros de producción de los eyaculados (Figura 24).

Bajos niveles séricos de testosterona (GTES_1) se relacionaron con valores inferiores en la movilidad. Para el caso de la motilidad progresiva, esta disminución existe sólo en comparación con los individuos con T intermedia entre 1 y 10 ng/mL (GTES_2) ($p < 0,05$), pero no con aquellos con T mayor de 10 ng/mL (GTES_3) ($p > 0,05$). Para el porcentaje total de espermatozoides móviles (MI), las diferencias fueron siempre significativas ($p < 0,05$ al compararlo tanto con GTES_2 como con GTES_3). Bajos niveles séricos de testosterona (GTES_1) también se relacionaron con valores inferiores en los parámetros cinéticos VAP y VSL ($p < 0,01$ en comparación con GTES_2 y $p < 0,05$ en comparación con GTES_3 para ambos parámetros). Los valores de ALH, además, resultaron ser mayores en GTES_2 ($p < 0,01$ en comparación con GTES_1; $p < 0,05$ con GTES_3), y también en GTES_3 en comparación con GTES_1 ($p < 0,05$).

Sin embargo, bajos niveles séricos de testosterona mostraron un efecto positivo en iACRO ($p < 0,05$ en comparación con GTES_2 y $p = 0,07$ con GTES_3) y MIT ($p < 0,05$ en comparación con GTES_2 y $p < 0,05$ con GTES_3).

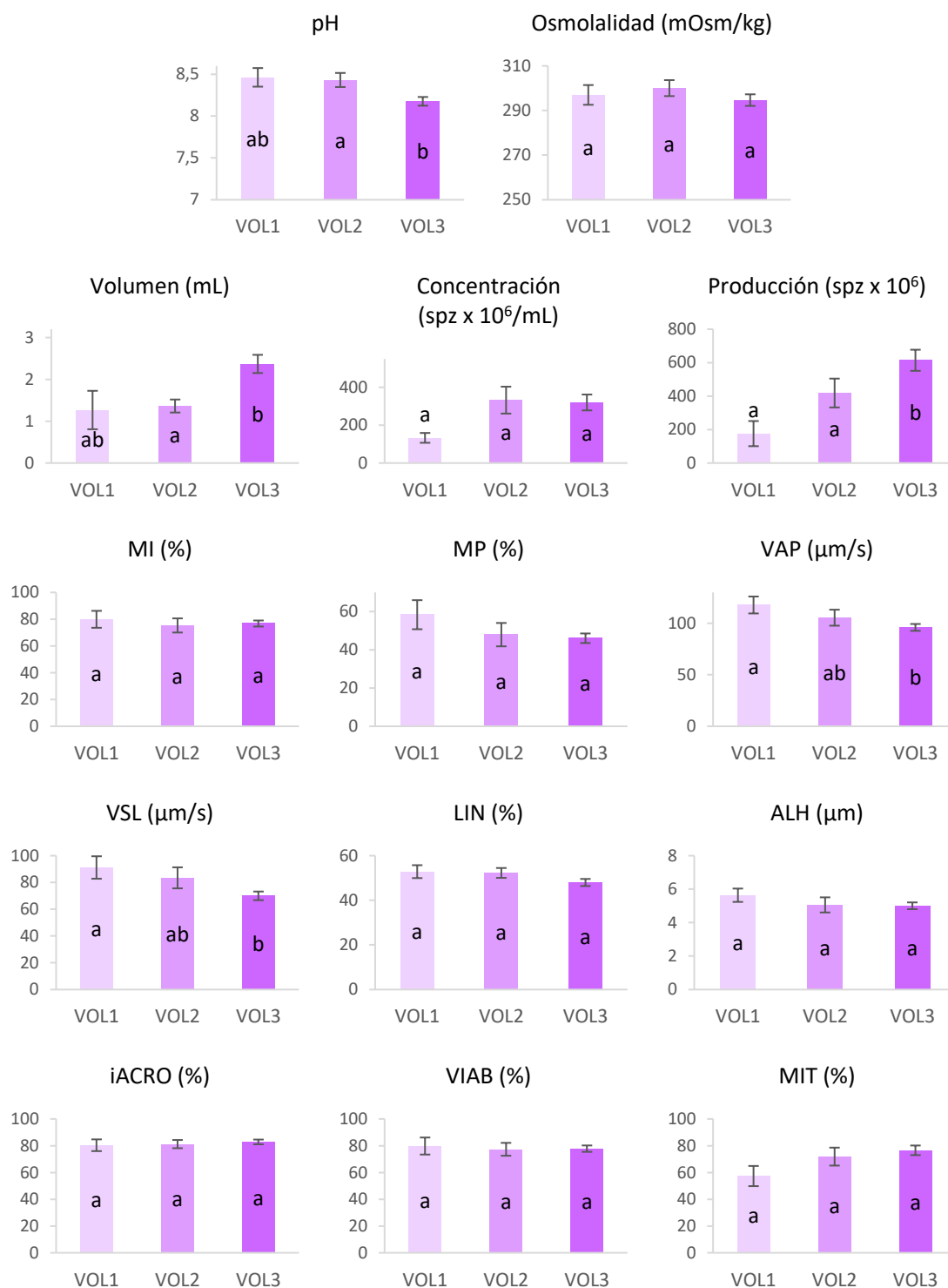


Figura 23. Parámetros seminales de la fracción rica del electroeyaculado en oso pardo durante el periodo reproductivo central (PB) según el volumen testicular (VOL1: hasta 60 cm³; VOL2: a partir de 60 y hasta 80 cm³; VOL3: mayor de 80 cm³). MI (%): Espermatozoides móviles totales; MP (%): Espermatozoides con movimiento progresivo; VAP (µm/s): Velocidad media; VSL (µm/s): Velocidad rectilínea; LIN (%): Linealidad; ALH (µm): Amplitud del movimiento lateral de la cabeza. iACRO: Espermatozoides viables con acrosomas intactos (PI-/PNA-); VIAB: Espermatozoides viables (SYBR14+/PI-); MIT: Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (JC1+). Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre grupos de volumen testicular (p < 0,05).

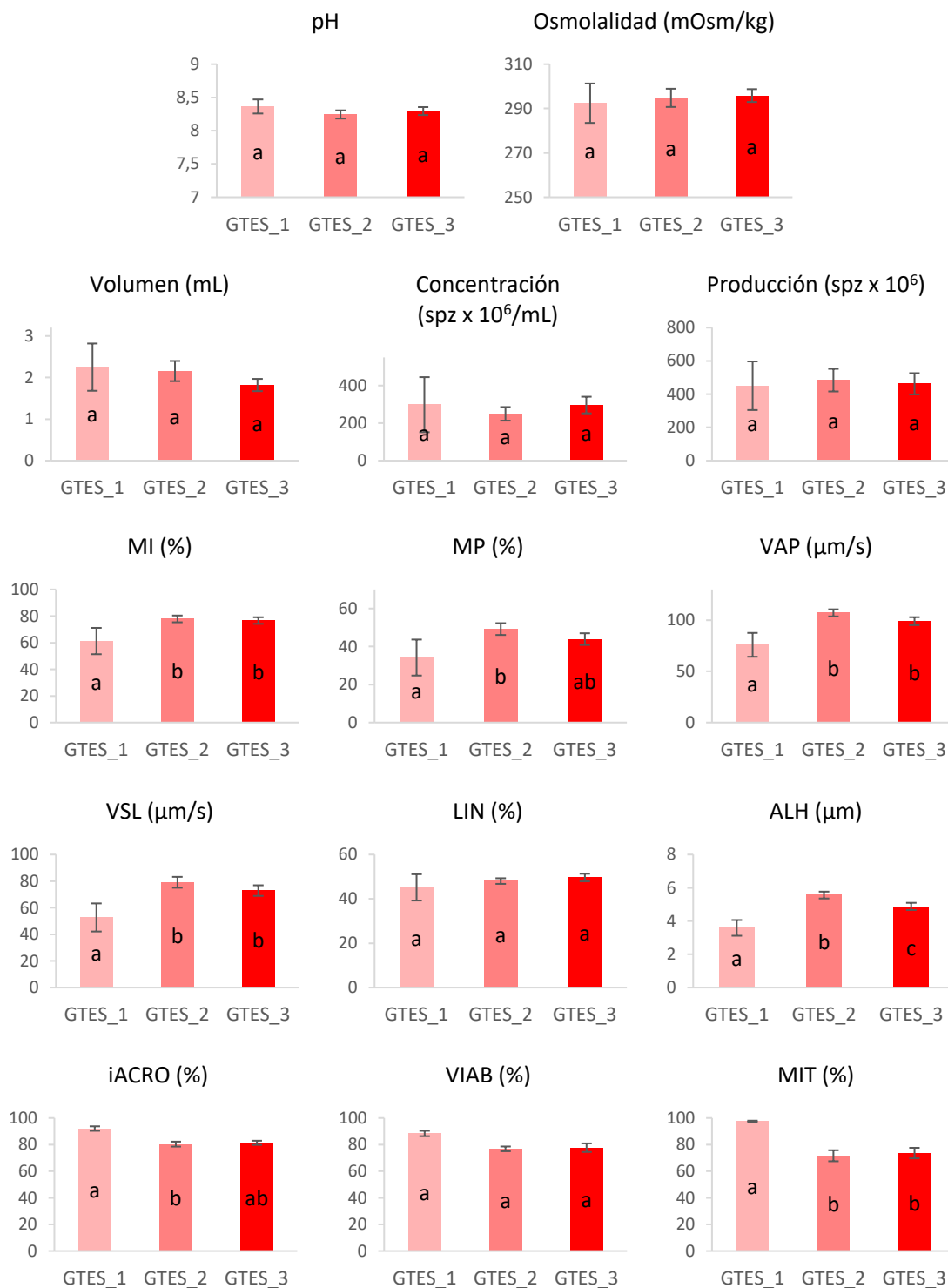


Figura 24. Parámetros seminales de la fracción rica del electroeyaculado en oso pardo durante el periodo reproductivo central (PB) según la concentración de testosterona (GTES_1: menor de 1 ng/mL; GTES_2: entre 1 y 10 ng/mL; GTES_3: mayor de 10ng/mL). MI (%): Espermatozoides móviles totales; MP (%): Espermatozoides con movimiento progresivo; VAP (μm/s): Velocidad media; VSL (μm/s): Velocidad rectilínea; LIN (%): Linealidad; ALH (μm): Amplitud del movimiento lateral de la cabeza. iACRO: Espermatozoides viables con acrosomas intactos (PI-/PNA-); VIAB: Espermatozoides viables (SYBR14+/PI-); MIT: Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (JC1+). Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre grupos de testosterona (p < 0,05).

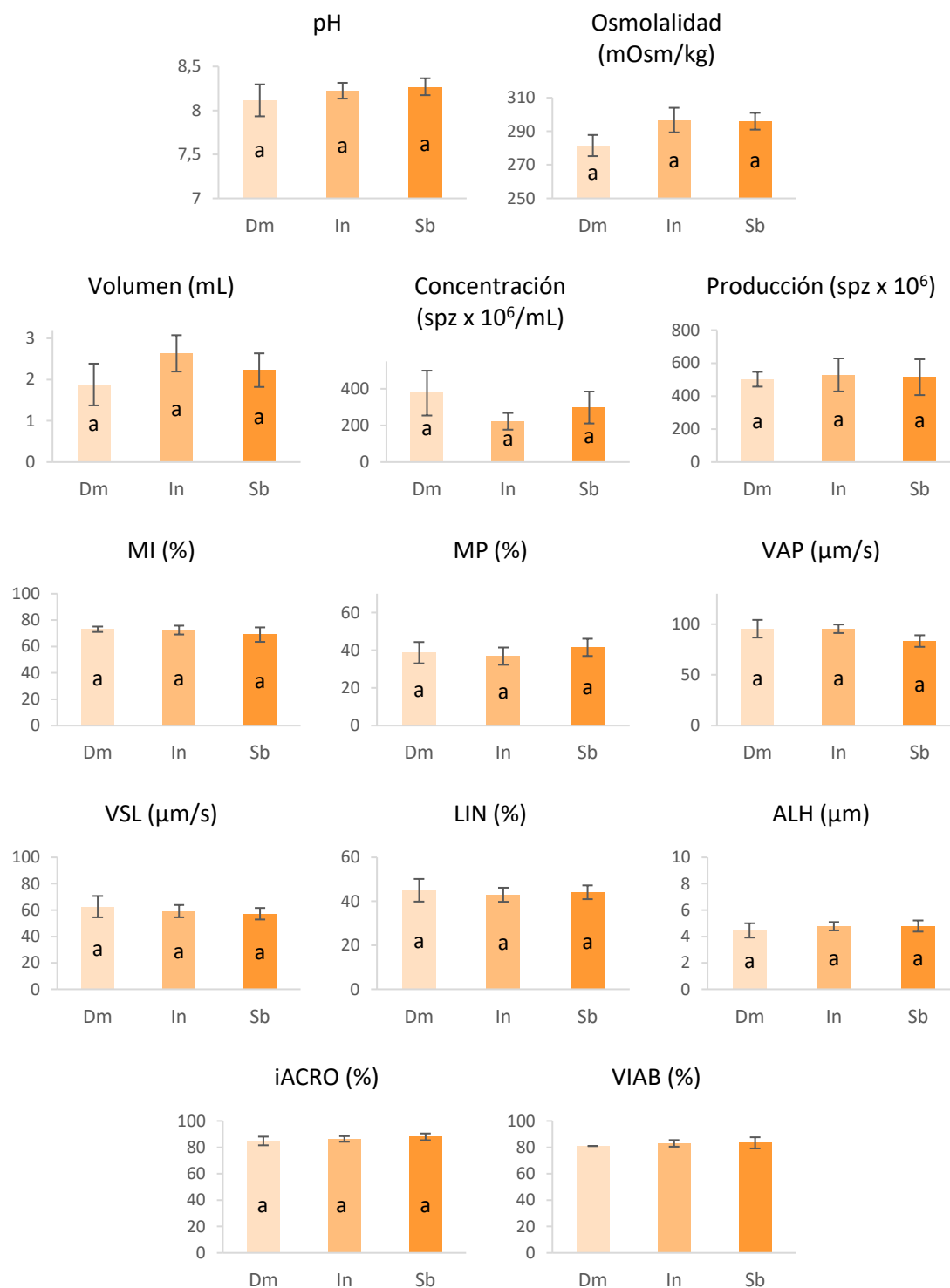


Figura 25. Parámetros seminales de la fracción rica del electroeyaculado en oso pardo durante el periodo reproductivo central (PB) según el estatus de dominancia (Dm: dominantes; In: rango intermedio; Sb: subordinados). MP (%): Espermatozoides con movimiento progresivo; VAP ($\mu\text{m/s}$): Velocidad media; VSL ($\mu\text{m/s}$): Velocidad rectilínea; LIN (%): Linealidad; ALH (μm): Amplitud del movimiento lateral de la cabeza. iACRO: Espermatozoides viables con acrosomas intactos (PI-/PNA-); VIAB: Espermatozoides viables (SYBR14+/PI-). Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre clases de dominancia ($p < 0,05$).

9.3.2.5. Estatus social

El estudio de la influencia del estatus social en la calidad seminal mostró cómo el factor dominancia no estuvo involucrado en variaciones en ninguno de los parámetros seminales estudiados (Figura 25).

9.4. DISCUSIÓN

La existencia de una selección sexual posterior a la cópula en el oso pardo puede sugerirse debido a la observación de fracaso reproductivo en machos fértiles. De esta manera, osos de demostrada validez como sementales no siempre producen descendencia tras una monta con una hembra que sí quedó preñada de otro macho (Bellemain et al., 2006b). Dejando de lado factores dependientes de la hembra en la explicación de tal fenómeno, el papel de la competición espermática en la selección postcopulatoria cobra una gran significación ya que estamos hablando de una especie con un sistema reproductivo promiscuo para ambos sexos en la que la paternidad múltiple sucede de forma habitual. Características seminales que otorguen ventajas en la competición por la fecundación de los óvulos serán clave para el éxito reproductivo de los machos y por tanto su aportación a la genética poblacional, especialmente para aquellos individuos que no tengan un acceso preferente a las hembras y por tanto no dispongan de ventajas en la selección sexual pre-copulatoria.

En el presente estudio, se han descrito las características de la producción seminal en el oso pardo en los distintos periodos en los que se divide su época reproductiva, utilizando eyaculados provenientes de electroeyaculación y animales de una población mantenida en condiciones de semilibertad. Un tamaño muestral elevado ha permitido que, posteriormente, y con la finalidad de realizar un análisis integral de los determinantes de calidad seminal de mayor trascendencia, se haya podido realizar un análisis de la edad, el volumen testicular, el nivel de testosterona sérica y el estatus de dominancia sobre parámetros clave de las características seminales sólo en las muestras recogidas durante el periodo PB (segunda quincena de abril y mayo), caracterizado por la máxima actividad reproductiva y concentración de testosterona. De esta manera, se pretende definir la influencia de los factores dependientes del individuo eliminando en lo posible la influencia de efectos de la estacionalidad reproductiva, ya que ésta afecta no sólo a los parámetros seminales sino también al ritmo biológico de algunos de los factores estudiados como el volumen testicular o la testosterona. Esto ha sido posible gracias a la definición previa de la jerarquía y ritmo biológico reproductivo anual de los machos de oso pardo de la población estudiada. Otros posibles factores implicados, como el tamaño o condición corporal o el perfil genético del macho, quedarían pendientes de ser objeto de análisis en futuros estudios.

9.4.1. Características generales de los eyaculados

En primer lugar, encontramos que las fechas de obtención de espermatozoides por electroeyaculación coincidieron con la fecha más temprana y más tardía de toma de muestras. Por tanto, no es posible descartar la existencia de espermatozoides antes o después de esas fechas con los datos existentes. En vista de los resultados, podemos afirmar que, en estas latitudes, los machos de oso pardo disponen de gametos en las gónadas en una fecha tan temprana como principios de febrero y tan tardía como finales de octubre, es decir, casi un mes antes y más de un mes más tarde de las últimas montas observadas. Un análisis preliminar utilizando los machos de Cabárceno que incluía en parte las mismas muestras que las utilizadas en este estudio ya había revelado la presencia de espermatozoides en electroeyaculados obtenidos entre febrero y octubre (Manrique-Revuelta et al., 2023). Es posible obtener espermatozoides a principios de febrero, mes en el que Tsubota & Kanagawa (1989) también encontraron espermatogénesis activa en oso de Hokkaido, y también a finales de octubre, coincidiendo con la descripción de Erickson et al. (1968) de la presencia de espermatozoides libres en epidídimo y túbulos seminíferos en varios individuos de oso Kodiak durante octubre e incluso un poco más tarde, concretamente el 4 de noviembre. Esto confirma, una vez más, la capacidad de adaptación del sistema reproductivo del oso pardo. Los machos son capaces no sólo de exhibir comportamiento reproductivo en fechas no consideradas como época reproductiva, como el otoño (García-Rodríguez et al., 2020; Steyaert et al., 2012), sino que nuestros datos demuestran que, además, están fisiológicamente preparados para proporcionar gametos in vivo mediante técnicas no quirúrgicas (electroeyaculación) de una calidad suficiente para su posterior criopreservación.

Aunque el pequeño tamaño muestral de la época no reproductiva no permite un análisis profundo, parece existir una mayor dificultad para la obtención de espermatozoides por electroeyaculación cuando no existe comportamiento reproductivo. Esto entra dentro de lo esperado ya que durante la época reproductiva se espera un incremento de las reservas espermáticas y una mayor facilidad para conseguir la eyaculación. Lo sorprendente en este sentido es que, aunque su frecuencia fuese menor que en la época reproductiva, la mayoría de electroeyaculaciones llevadas a cabo en febrero, septiembre y octubre han dado como resultado muestras conteniendo espermatozoides que en ocasiones fueron de una calidad aceptable. La no obtención de espermatozoides también sucede puntualmente en todos los periodos de la época reproductiva, tanto EB como PB y LB. El significado de las muestras azoospermicas no tiene por qué ser la falta de espermatozoides disponibles, evento poco probable durante la época reproductiva según los datos disponibles en otras poblaciones sobre la presencia de

espermatozoides libres en túbulos seminíferos mediante histología, sino que puede estar relacionado con un fallo en la electroeyaculación. Posibles variaciones en el procedimiento, como por ejemplo en la administración de los estímulos eléctricos, deberían tenerse en cuenta, aunque en nuestro estudio sólo dos personas experimentadas fueron las encargadas de manipular la sonda transrectal en todas las recogidas. Procesos patológicos tampoco pueden ser descartados dado la baja incidencia. En todo caso, la no obtención de espermatozoides conlleva el fracaso en la obtención de material genético mediante la técnica de electroeyaculación y por tanto la utilidad del método para la preservación y/o uso en técnicas de reproducción asistida de gametos masculinos. Frecuencias de éxito en la electroeyaculación en otras especies de úrsidos han resultado ser mucho menores, encontrando por ejemplo ratios del 53,8 % en oso negro americano y oso negro asiático (Brito et al., 2010; Jeong et al., 2019) frente al 94% observado en nuestro estudio. Tanto variaciones interespecíficas como metodológicas podrían estar influyendo en tal disparidad de resultados. En oso panda las cifras son mayores, registrándose porcentajes similares al nuestro, con un 93,2 % de electroeyaculaciones exitosas durante la época reproductiva. Sin embargo, sólo un 35,4 % lo fueron en el periodo entre el 1 de enero y el comienzo de la época reproductiva y, en contradicción con los resultados de nuestro trabajo, ningún muestreo produjo espermatozoides en la etapa comprendida entre el final la época reproductiva y el final del año natural (Aitken-Palmer et al., 2012).

Se debe tener en cuenta en todo momento que en este trabajo sólo se ha utilizado la fracción rica para el análisis de los factores de variación seminal, lo cual conlleva importantes connotaciones a la hora de discutir el significado de los resultados de ciertos parámetros referentes al volumen de la muestra y a la concentración y producción espermáticas. Disponemos de datos de dichos parámetros en semen fresco de oso pardo (Alvarez et al., 2012; Ishikawa et al., 1998) y otros úrsidos (Chen et al., 2007; Okano et al., 2009), pero no es posible realizar una comparativa exhaustiva ya que proceden de electroeyaculaciones no fraccionadas y por tanto se refieren a la totalidad eyaculado. La recogida fraccionada permite en nuestro trabajo descartar las muestras urosperómicas y las menos concentradas, de manera que la fracción rica es una muestra que presenta un menor volumen y menor número de espermatozoides, así como una mayor concentración espermática y un mayor pH que la totalidad del eyaculado.

El oso pardo se puede considerar como una especie cuyos machos son potencialmente buenos donantes de material seminal para su uso en bancos de recursos genéticos. En esta especie, el protocolo de criopreservación ha sido optimizado con estudios sobre la composición de los diluyentes utilizados y el momento de adición de alguno de sus componentes (Álvarez-Rodríguez

et al., 2011; Álvarez-Rodríguez, 2013a; Álvarez-Rodríguez, 2013b; Anel et al., 2010; Gomes-Alves, 2014a; Nicolás et al., 2011), el protocolo de centrifugación (Álvarez-Rodríguez et al., 2016; Anel-López et al., 2017a; Nicolás et al., 2012a; Nicolás et al., 2012b), el protocolo de tratamiento térmico en la criopreservación (López-Urueña et al., 2014a; López-Urueña et al., 2014b) y sobre distintas técnicas de almacenamiento precongelación (Álvarez-Rodríguez et al., 2013c; López-Urueña et al., 2016; López-Urueña et al., 2015). Resulta especialmente interesante para el aprovechamiento de estas muestras de elevado valor biológico el desarrollo de técnicas de recuperación de espermatozoides en muestras urospérmicas, debido a la elevada frecuencia de su obtención en el oso pardo (Gomes-Alves et al., 2014b). Si bien en nuestro trabajo sólo se habla de las fracciones no urospérmicas como indicador de la calidad seminal de cada eyaculado, la mejora de las características de estas muestras sometidas a estrés osmótico debido a la presencia de orina supone un avance en el aprovechamiento integral de la muestra obtenida, algo que en el ámbito de las especies en peligro es fundamental. Sin embargo y según nuestro conocimiento, hasta el momento no existía un análisis predictivo de la calidad de los eyaculados frescos que permitiese la mejora de la muestra obtenida en base a la selección del macho y del momento de obtención de los mismos. El trabajo aquí presentado, basado en la comprensión de algunos de los determinantes biológicos de la calidad de los eyaculados, permitirá mejorar la calidad de los gametos obtenidos en el marco de muestreos programados para su preservación en un banco de recursos genéticos, además de anticipar algunos aspectos de la calidad de muestras obtenidas de forma oportunista ante la posibilidad o necesidad de muestrear un oso anestesiado por otras razones (actuaciones no programadas).

9.4.2. Análisis de los factores de variación de la calidad de los eyaculados

9.4.2.1. Estacionalidad

Las muestras seminales obtenidas mediante electroeyaculación en el oso pardo presentan diferencias según los periodos en los que se divide la época reproductiva sólo para algunos de los factores estudiados (volumen de la muestra, VAP, VSL, LIN e iACRO). Hasta ahora, sólo se conocían diferencias estacionales en el semen de oso pardo referentes a la condensación de la cromatina (García-Macías et al., 2006), la cual se encuentra más condensada al final de la época reproductiva (julio y agosto) en comparación con el resto de la época reproductiva (marzo a junio). Información en otras especies de úrsidos había mostrado resultados contrarios a lo encontrado en el oso pardo en este trabajo, ya que no se habían detectado diferencias en las características del semen durante la época reproductiva en oso negro asiático (Okano et al.,

2009) ni en oso panda salvo en la integridad del acrosoma en este último (Aitken-Palmer et al., 2012). En ambos trabajos, el análisis incluyó la división de la época reproductiva en tres y dos periodos, respectivamente. Sin embargo, los resultados en oso panda respecto al estado de los acrosomas no corresponden con los encontrados en este trabajo: mientras que en oso pardo el porcentaje de espermatozoides con los acrosomas intactos es menor al principio de la época reproductiva (EB), en oso panda lo es al final de la misma. Tanto en el oso panda como en el oso negro asiático se observaron diferencias estacionales en parámetros seminales cuantitativos (volumen y concentración) y cualitativos (movilidad y viabilidad) al comparar la época reproductiva con la época no reproductiva.

El estudio de cambios temporales en la calidad seminal en otros carnívoros salvajes con reproducción estacional es escasa y con frecuencia no incluye el análisis de variaciones dentro de la época reproductiva (Byers et al., 1990; Crosier et al., 2007). Incluso el análisis de datos en la totalidad del año resultó en diferencias también en un número limitado de parámetros para el guepardo (Crosier et al., 2007) o no mostró diferencias como sucede en el tigre siberiano (Byers et al., 1990) analizando muestras procedentes de pocos individuos y de muy distinta edad. Los datos presentados para el coyote resultaron más interesantes ya que describieron la variación mensual de algunas características de los eyaculados tanto dentro como fuera de la época reproductiva, las cuales serán comentadas más adelante, pero no los relacionaron con cambios en la biología reproductiva de los machos como pueden ser el comportamiento reproductivo o el perfil hormonal (Minter & DeLiberto, 2008).

El efecto de la estacionalidad reproductiva en el semen de los osos de Cabárceno es menor del que cabría esperar en una especie con ritmo biológico anual y cambios hormonales tan marcados. Sólo se observan valores medios crecientes en el volumen de la fracción rica, VAP, VSL, LIN, iACRO y viabilidad durante los tres periodos que componen la época reproductiva. Estos aumentos son significativos al comparar el comienzo de la época reproductiva con el final de la misma en el volumen ($p < 0,05$), VAP ($p < 0,05$), VSL ($p < 0,01$), LIN ($p < 0,01$), e iACRO ($p < 0,05$), y también existe una tendencia en el mismo sentido para la viabilidad ($p = 0,05$). Otras diferencias o tendencias con PB avalan también esta mejora creciente en la calidad seminal a medida que avanza la época reproductiva ($p < 0,01$ entre EB y PB para iACRO; $p = 0,06$ entre EB y PB para volumen; $p = 0,05$ entre EB y PB para VIAB; $p = 0,09$ entre EB y PB para VAP; $p < 0,05$ entre PB y LB para LIN; $p = 0,07$ entre PB y LB para VSL). Estos datos están en concordancia con las mejoras en los índices de fragmentación del DNA de los espermatozoides en julio y agosto (LB) mostradas por García-Macías et al. (2006). Un mayor volumen de la fracción rica no supone una mejora cualitativa real *per se*, ya que, aunque sea deseable, sólo se traduce en un mayor

número de gametos disponibles para su preservación dependiendo de la concentración de la muestra. En el coyote se han encontrado grandes diferencias en las todas las características seminales estudiadas para el primer mes de su época reproductiva (diciembre hasta abril) (Minter & DeLiberto, 2008). El número de espermatozoides obtenido, su motilidad, viabilidad y porcentaje de normalidad en la morfología espermática fueron significativamente menores en diciembre respecto al resto de la época reproductiva, pero no mostraron diferencias entre meses a partir de enero. Estos datos coinciden por tanto con lo encontrado en oso pardo en el sentido de una mejora de la calidad seminal a lo largo de la época reproductiva, pero ésta fue más progresiva para el caso del oso pardo y muy brusca en el coyote. A pesar de existir disminuciones en algunos parámetros seminales durante la época EB, al principio de la época reproductiva los valores promedio de las diferentes características seminales obtenidos aún pueden considerarse de buena calidad seminal para su uso como material objeto de criopreservación.

Estas diferencias estacionales encontradas para algunas de las características del semen, unidas a los ritmos cíclicos de la testosterona y el volumen testicular previamente descritos en este manuscrito, han hecho necesaria la delimitación temporal de las muestras utilizadas para el análisis de los restantes posibles determinantes de la calidad de los eyaculados. La época reproductiva central, donde sucede el pico de actividad reproductiva y de testosterona circulante de los machos, ha sido escogida para tal fin ya que se considera la etapa de máximo exponente de la función reproductiva en el oso pardo.

9.4.2.2. Edad

La edad es uno de los factores más comúnmente descritos como determinante del éxito reproductivo de los machos de oso pardo en su medio natural. En concreto, se ha descrito mayor probabilidad de obtener descendencia entre los 9 - 18 años para oso grizzly (Craighead et al., 1995b) y 10 - 14 años para oso de Hokkaido (Shimozuru et al., 2020). Existe un estudio en oso pardo escandinavo que reivindica una relación lineal entre edad y éxito reproductivo, pero éste debe ser interpretado con cautela para edades avanzadas, ya que tales resultados se obtuvieron analizando dos poblaciones con rangos de edad muy desplazados hacia osos bastante jóvenes en las que sólo existían 2 individuos de más de 20 años de edad (Zedrosser et al., 2007). Aunque son muchos los factores que influyen en el éxito reproductivo global de un macho, se describe una merma en la calidad seminal a edades avanzadas o a edades tempranas inmediatamente posteriores a la pubertad tanto para el ser humano como para algunas especies domésticas en

general (Corte Pause et al., 2022; Kidd et al., 2001; Martins-Bessa et al., 2021). Por lo tanto, los conocimientos actuales sobre éxito reproductivo en el oso pardo estarían en consonancia con la hipótesis de la existencia de un posible pico de calidad seminal a edades intermedias en la especie.

El estudio del efecto de la edad en las características seminales en la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno muestra diferencias en tan sólo tres de los parámetros estudiados: menor pH, menor concentración espermática y mayor MIT en osos jóvenes de hasta 10 años pero sólo en comparación con osos de entre 10 y 20 años. Ninguna diferencia estadísticamente significativa ha sido detectada en las características seminales en animales de más de 20 años de edad, pero posibles tendencias reales pueden estar sesgadas debido al pequeño tamaño muestral de las muestras pertenecientes a dicha subpoblación, compuesta de un máximo de 5 muestras. El significado de los cambios descritos no indica claramente una mayor calidad seminal en función de la edad. Por un lado, es difícil determinar un posible efecto del pH en la fertilidad cuando siempre se encuentra por encima de 8. La menor concentración espermática en edades intermedias podría indicar un efecto negativo, pero sin embargo esta disminución no estuvo asociada a una diferencia significativa en el número de espermatozoides producidos en la fracción rica. Por último, el grupo de edad intermedia, en el que existe menor concentración de gametos, presenta una mayor proporción de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial, la cual es una característica deseable desde el punto de vista de la fertilidad. Los resultados aquí descritos no apoyan claramente la hipótesis de calidad seminal óptima a edades intermedias en el oso pardo, y por tanto no explican los mayores índices de éxito reproductivo a edades intermedias encontrados en la especie. Una menor concentración espermática en edades intermedias sí podría ser indicativa de una mayor actividad eyaculadora, como ya se ha demostrado en otras especies para el eyaculado completo (Montes-Garrido et al., 2022; Snider et al., 2022).

En oso panda, tampoco se han detectado grandes efectos de la edad en las características de los eyaculados, encontrándose variaciones tan sólo en el pH y en algunos tipos de anomalías morfológicas. No obstante, las diferencias observadas para el pH en oso panda se refieren tan sólo a osos de 5,5 años, cuyos eyaculados tenían mayor pH comparado con los de 6,5 años (Aitken-Palmer, 2010), mientras que en oso pardo ambas edades forman parte del mismo grupo de edad estudiado y las diferencias detectadas se refieren a un menor pH para individuos de entre 10 y 20 años en comparación con aquellos de menos de 10 años. En todo caso, el pH de los eyaculados parece un parámetro sensible a los cambios asociados a la edad en úrsidos. Al contrario que lo encontrado en nuestro trabajo, la concentración de espermatozoides fue uno

de los parámetros estudiados en el oso panda que no se vio afectado por la edad (Aitken-Palmer, 2010), mientras que no existen referencias acerca del potencial de membrana mitocondrial en otros úrsidos. Cambios en la concentración espermática asociados a la edad han sido descartados también en individuos no juveniles en el guepardo, mientras que el factor edad no ha sido estudiado para el pH ni para el potencial de membrana mitocondrial en dicha especie (Crosier et al., 2007). En la hiena no ha podido ser demostrado ningún efecto de la edad en la calidad seminal (Curren et al., 2013). Finalmente, encontramos que los resultados acerca de la concentración espermática en el eyaculado de équidos coinciden con los nuestros, ya que Dowsett & Knott (1996) y Martins-Bessa et al. (2021) también describieron un descenso de la misma en relación a la edad en el caballo y el asno. Por último, cabe reseñar que los leves cambios asociados a la edad detectados no afectan a la movilidad espermática ni en oso pardo ni en otras especies de úrsidos (Aitken-Palmer, 2010) ni en carnívoros silvestres adultos (Crosier et al., 2007; Curren et al., 2013) descritas.

9.4.2.3. Volumen testicular

Parece razonable pensar que el tamaño de los testículos, encargados de la formación de los gametos y de sintetizar testosterona, tuviese una profunda influencia sobre la calidad seminal en cualquier especie. Esta probable relación, sin embargo, ha sido en general escasamente estudiada y hasta la fecha no existen referencias al respecto en el oso pardo. Los únicos estudios en úrsidos que aportan datos sobre tamaño testicular y calidad seminal no analizaron una posible relación entre ellos (Aitken-Palmer et al., 2012; Moore et al., 1984). En otras especies de mamíferos, se ha demostrado que menor volumen testicular está relacionado con menor volumen eyaculado (Curren et al., 2013) o menor producción espermática (Almeida et al., 2006; Berndtson, 2014; Blottner et al., 1996; Gomendio et al., 2006).

En los machos de oso pardo de la población que habita en el Parque de la Naturaleza de Cabárceno, existen diferencias significativas en función del volumen testicular para los siguientes parámetros de la fracción rica: pH, volumen del eyaculado, producción de espermatozoides, velocidad media, y velocidad rectilínea. El número de espermatozoides de la fracción rica está aumentado en los individuos con un volumen testicular mayor (mayor de 80 cm³). Una relación positiva entre el número de espermatozoides totales del eyaculado y el volumen testicular es un hallazgo habitual que ha sido descrito en especies domésticas como el cerdo, toro, carnero y macho cabrío (Berndtson, 2014), ungulados silvestres (Almeida et al., 2006; Blottner et al., 1996) y distintas especies de roedores (Gomendio et al., 2006). Aunque

este hecho podría apoyar nuestros resultados, hay que recordar que en este trabajo sólo hemos analizado el número de espermatozoides de la fracción rica. En el presente trabajo, este incremento en el número de espermatozoides se encuentra explicado por un aumento del volumen de la fracción del eyaculado analizada, junto con una tendencia de la concentración espermática a aumentar en los machos con los testículos más grandes en comparación con los de menor tamaño (hasta 60 cm³). Testículos de mayor tamaño implican por un lado un mayor número de túbulos seminíferos, lugar donde ocurre la síntesis de espermatozoides, a la vez que un incremento en el tejido intersticial que contiene células de Leydig productoras de testosterona, entre cuyas funciones se encuentran estimular la producción espermática (Walker, 2009). Esta relación positiva entre el volumen testicular y el volumen del eyaculado también sucede en los eyaculados obtenidos por electroeyaculación en hienas (Curren et al., 2013), aunque los resultados mostrados para dicha especie no coinciden con los nuestros en la existencia de diferencias en la producción de espermatozoides en función del tamaño testicular. Es importante recalcar de nuevo que, a la hora de comparar nuestros resultados, debemos tener siempre en cuenta que no se refieren a la producción espermática ni volumen total del eyaculado, sino de la fracción rica, debido a las particularidades de la recogida seminal en oso pardo, en la que resulta fundamental minimizar la contaminación con orina de las muestras obtenidas. En todo caso, los mayores volumen de la FR y número de espermatozoides que se observan en los osos con los testículos de mayor tamaño son características deseables para la preservación exitosa en los bancos de recursos genéticos. Las disminuciones detectadas en el pH asociadas a un mayor volumen testicular se refieren a un pH siempre por encima de 8, por lo que su implicación en la calidad seminal es difícil de determinar. Del mismo modo, los parámetros cinéticos VAP y VSL disminuyen al aumentar el tamaño de los testículos, pero de nuevo su implicación en la calidad global de la muestra resulta difícil de establecer ya que no se ha observado un efecto sobre la motilidad individual ni progresiva. Al contrario que en osos, en caballos sí se ha descrito una relación entre tamaño testicular y movilidad, observándose disminuciones concomitantes del tamaño testicular y motilidad progresiva espermática asociadas a animales seniles (Blanchard et al., 2013). Por otra parte, la viabilidad, estado de los acrosomas y potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides no se ven influidos por el volumen testicular, de forma que, durante el periodo de máxima actividad sexual, los espermatozoides parecen ser estructuralmente funcionales por igual en relación a los parámetros estudiados sin importar el tamaño de las gónadas que los han producido.

Finalmente, es necesario destacar la correlación entre el volumen testicular en los osos de este estudio y la edad. Los resultados de White et al. (1998) en oso grizzly secundan estos hallazgos

con un coeficiente de correlación que fue incluso más fuerte que el nuestro ($p < 0,01$, $r = 0,76$; frente a $p < 0,01$, $r = 0,34$). El volumen testicular también estuvo correlacionado con la testosterona sérica. Una relación positiva del tamaño testicular con la testosterona es un hallazgo frecuente en numerosas especies de mamíferos de reproducción estacional, como el ciervo ibérico (Malo et al., 2012), las ovejas silvestres de raza Soay (Preston et al., 2012), o el coyote (Minter & DeLiberto, 2008). Como ya comentábamos anteriormente, mayores cantidades de tejido intersticial testicular y por tanto de células de Leydig significan una mayor secreción de testosterona (Walker, 2009).

9.4.2.4. Testosterona sérica

Los datos aquí presentados muestran que los niveles de T no necesitan ser notoriamente elevados para que existan gametos en las gónadas del oso pardo. Los hallazgos de Tsubota & Kanagawa (1989) ya describieron concentraciones de testosterona por debajo de 1ng/mL concomitantes con la presencia de gametos en el oso de Hokkaido, lo cual ha sido corroborado en la población de osos de Cabárceno. Sin embargo, valores concretos de testosterona sérica o incluso en plasma seminal podrían estar relacionadas con la optimización de la función reproductiva de los machos, como ya ha sido sugerido en cuanto a niveles óptimos de concentraciones de testosterona en el plasma seminal en el ser humano (Thanaboonyawat et al., 2017). De hecho, ya se ha comentado en este manuscrito cómo existe comportamiento sexual en el periodo LB a pesar de que T no difiere estadísticamente con aquella encontrada en la época no reproductiva. Por todo ello, consideramos que la influencia de otras hormonas en el desarrollo de patrones y funciones reproductivas debe ser objeto de futuros estudios en el oso pardo. Además de otras sustancias neuroendocrinas, un efecto estacional mediado por la testosterona podría estar sucediendo. Hipotéticamente, ciertos niveles de T serían necesarios para desencadenar la espermatogénesis, pero la producción de espermatozoides no es inmediata, sino que está sujeta a la duración del ciclo espermatogénico. Del mismo modo, los niveles de testosterona influyen en la producción espermática una vez instaurada la espermatogénesis. Así, y debido asimismo a los profundos cambios que dicha hormona experimenta a lo largo del año, las muestras analizadas en este trabajo para estudiar la relación entre T y la calidad seminal sólo incluyen eyaculados obtenidos durante el periodo comprendido entre la segunda quincena de abril y mayo, época en la cual sucede el pico de T en los osos de Cabárceno. También con la finalidad de disminuir posibles efectos de otros factores, todas las muestras fueron tomadas antes de comenzar el procedimiento de electroeyaculación para evitar posibles influencias de variaciones en el cortisol, cuya concentración ha demostrado

umentar transitoriamente por efecto de la electroeyaculación en el guepardo (Wildt et al., 1984). A pesar del papel controvertido de la concentración de testosterona circulante en el momento de la electroeyaculación sobre aspectos comportamentales y sobre la existencia de gametos, sus niveles sí habían demostrado previamente estar relacionados con cambios en la composición del plasma seminal (Anel-López et al., 2017b). El fluido seminal resulta indispensable para la motilidad, viabilidad y en definitiva la capacidad fertilizante de los gametos masculinos, e incluso es posible que posea funciones relacionadas con el desplazamiento de los espermatozoides de otros machos, es decir, con la competición post-copulatoria entre gametos de diferentes machos (Birkhead & Pizzari, 2002).

Los niveles de T en el momento de la extracción seminal son el factor que ha demostrado afectar a más parámetros indicadores de las características del eyaculado: además del estado acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial, la mayoría de los parámetros cinéticos y relacionados con la movilidad espermática (MI, MP, VAP y VSL) mostraron cambios significativos dependiendo de la concentración de testosterona. En general, los osos pardos con bajas concentraciones de T (menores de 1 ng/mL) produjeron menos espermatozoides móviles, caracterizados por una menor velocidad en su trayectoria, rasgos sugestivos de una inferior calidad seminal. Otras posibles diferencias del grupo de testosterona con concentraciones menores de 1 ng/mL han podido no ser detectadas debido al reducido tamaño muestral en el que se registró una testosterona baja durante el periodo PB, de tan sólo 5 individuos, y a la elevada variabilidad de los datos. Similares resultados se han encontrado en el coyote, donde la testosterona resultó estar correlacionada con la movilidad progresiva (Minter & DeLiberto, 2008). En ciervo ibérico, al contrario que en oso pardo, los resultados no detectaron un efecto de la testosterona sobre VSL (Malo et al., 2012). En oso pardo, anteriores aproximaciones mostradas por Anel-López et al. (2017b) utilizaron muestras de la misma población de estudio en cualquier momento de la época reproductiva y sus resultados fueron contrarios a los aquí expuestos ya que no mostraron diferencias en la motilidad total ni progresiva en función de T. Esto se debe a que, en su caso, sólo dos grupos de animales fueron considerados en función de su concentración de testosterona, utilizando como valor de corte 5 ng/mL. Como ya comentábamos, en oso pardo variaciones de T sólo se relacionan con cambios en la movilidad y cinética de los espermatozoides por debajo de 1ng/mL. Por el contrario, nuestros datos sí quedan apoyados por lo detectado en el estudio de Anel-López et al. (2017b) para el caso de la osmolalidad, pH y recuento de espermatozoides, donde no existieron diferencias. Los osos que en el momento de la recogida del eyaculado presentaban bajos valores de T, sin embargo, mostraron mayor porcentaje de espermatozoides viables con acrosomas intactos en

comparación con aquellos con T entre 1 y 5 ng/mL, así como mayor porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial, siendo ambos parámetros indicadores de un mayor poder fecundante (Buffone, 2016). Estos resultados son de nuevo contrarios en cuanto al estado acrosomal a lo encontrado por Malo et al. (2012) en el ciervo ibérico, donde se ha demostrado una relación positiva de la testosterona con el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos. Nuestros datos tampoco apoyaron una correlación positiva de la viabilidad espermática con la testosterona previamente encontrada en el coyote, en otro mamífero de reproducción estacional (Minter & DeLiberto, 2008). En los osos de la población aquí estudiada, una probable relación entre los cambios en la movilidad y estructura de los espermatozoides en función de T con la composición del plasma seminal se hace patente debido a las ya demostradas diferencias en distintos componentes del plasma en el oso pardo asociadas a la testosterona (Anel-López et al., 2017b), pero queda sujeta a futuros análisis en los que se analice la composición del plasma en individuos con testosterona sérica menor de 1ng/mL. Del mismo modo, y debido a que la testosterona es capaz de regular diversos aspectos del comportamiento, posibles cambios en la frecuencia de actividad sexual relacionados con su nivel sanguíneo podrían modificar las características del eyaculado. Mayores niveles de testosterona podrían significar cambios en la libido, pero también en el tiempo empleado en confrontamientos con otros machos o incluso causar el rechazo por parte de algunas hembras debido a elevados niveles de agresividad en estos machos.

Además de los ya descritos efectos estacionales sobre T, ampliamente apoyados por la literatura científica, durante la época reproductiva la testosterona de los machos de oso pardo de Cabárceno se correlaciona positivamente con la edad y con el volumen testicular de los osos. En oso panda, también se encontraron diferencias en los niveles de testosterona según la edad, pero sólo antes de los 7 años de edad (Aitken-Palmer, 2010). Por otro lado, anteriores estudios realizados sobre los machos de Cabárceno mostraban una correlación entre tamaño testicular y testosterona sólo en la época comprendida entre febrero y el pico de actividad reproductiva (Gomes-Alves et al., 2011); estos nuevos datos suponen la evidencia de que en oso pardo, el tamaño de las gónadas, como órganos responsables de la esteroidogénesis, se encuentra directamente correlacionado con la concentración de testosterona circulante durante la totalidad de la época reproductiva. Esta afirmación se ve apoyada por los numerosos reportes en los que los valores máximos de testosterona coinciden con el momento en el que existe mayor tamaño testicular en el oso pardo (Manrique et al., 2012; Tsubota & Kanagawa, 1989; White et al., 2005).

9.4.2.5. Estatus social

El estatus social puede ser considerado la expresión última de una serie de características fisiológicas y comportamentales con capacidad para ejercer influencia sobre la función reproductiva. La información científica disponible revela que en la mayoría de especies estudiadas existe una relación, positiva o negativa, entre estatus social y calidad seminal, la cual está sujeta a la influencia de aspectos socio-ambientales (Montrose et al., 2008; Reuland et al., 2021). Una influencia negativa, es decir, una calidad seminal superior en animales subordinados, suele interpretarse como una adaptación hacia ventajas post-copulatorias para individuos con desventajas en la competición por las hembras, mientras que en especies en las que los subordinados tienen menor calidad seminal se ha sugerido un mecanismo asociado al estrés en su regulación social (Montrose et al., 2008). Aunque los esfuerzos investigadores al respecto se han incrementado en los últimos años, principalmente en peces, la información disponible sobre especies de mamíferos es limitada y muy frecuentemente dirigida hacia roedores. En el oso pardo, el éxito reproductivo en la especie parece verse sesgado hacia animales con superioridad física (Bellemain et al., 2006b; Zedrosser et al., 2007), pero el papel de los diferentes componentes pre-copulatorios y post-copulatorios de la selección sexual a este nivel aún está por determinar. Por primera vez, la descripción de la estructura social en una población con un número suficiente de machos de características sexuales conocidas ha permitido generar datos al respecto en una especie de úrsido.

Sorprendentemente, los resultados han demostrado que ninguno de los parámetros del eyaculado estudiados variaron en función del rango social al que pertenecía el macho donante. El significado de esta información queda sujeto a discusión, ya que la compleja relación entre las consecuencias del estatus social de los machos y las características de sus eyaculados aún no ha podido ser científicamente determinada (Reuland et al., 2021). Encontramos no obstante un caso interesante de falta de diferencias asociadas al estatus social en la calidad de los eyaculados del pez *Dermogenys collettei*: en un principio fueron detectadas diferencias en la calidad seminal según la jerarquía social, pero la introducción de un refugio que disminuyó el nivel de agresividad entre los machos hizo que desaparecieran y que dominantes y subordinados pasasen a no mostrar variación en las características seminales. La explicación a tal fenómeno se basó en una posible reducción del estrés en los animales subordinados. Las características del régimen de manejo y social del grupo de osos estudiado en este trabajo podrían tener por tanto las claves para la explicación de la falta de influencia del estatus social en la calidad seminal en los machos de oso pardo de Cabárceno, ya que aunque existe una elevada densidad poblacional las características del recinto permiten el comportamiento de huida y de evasión de otros

individuos, y, como ya comentábamos anteriormente, los niveles de cortisol de los machos no son indicativos de un estrés crónico basal. En todo caso, la falta total de diferencias e incluso tendencias nos muestra que el papel del estatus social en la competición espermática podría ser menor del esperado en una especie caracterizada por un elevado nivel de promiscuidad. La presencia de una elevada densidad de hembras, no obstante, podría influir en la calidad seminal de los machos de la población de estudio, a través de los efectos por un lado de una mayor frecuencia de eyaculación o incluso del aumento de oportunidades de monta en animales con desventajas en la competición entre machos por las hembras receptivas. En cualquier caso, aquí se presentan datos pioneros que demuestran que, en el oso pardo, una especie en la que los adultos no conviven en estrecha relación de manera sistemática, el estatus social no determina la calidad seminal de los machos cuando conviven en un grupo cerrado con acceso a hembras reproductoras.

Por último, es necesario resaltar que los machos de oso pardo son potencialmente buenos donantes de material seminal para su uso en bancos de recursos genéticos. La especie se ha consagrado como un referente en el desarrollo de protocolos específicos de congelación de eyaculados obtenidos mediante electroeyaculación, pero hasta ahora se había destinado una reducida atención a la regulación de las características de sus eyaculados en fresco. La identificación de factores de variación en la calidad seminal es fundamental para, por un lado, comprender los procesos evolutivos poblacionales, y, por otro, dotar a los bancos de germoplasma de unos protocolos estandarizados. El estudio de la estacionalidad reproductiva como posible factor de variación ambiental busca la comprensión del momento óptimo de recolección de los gametos, mientras que el estudio de factores dependientes del individuo (edad, volumen testicular, niveles de testosterona, estatus social) permite la caracterización del donante ideal en un programa de electroeyaculación programado. En procedimientos de electroeyaculación no programados, realizados en situaciones excepcionales en las que se accede a un animal por otras razones, tales conocimientos ayudarán a preveer la calidad de la muestra obtenida. El estudio aquí presentado aporta una nueva perspectiva en un campo de investigación en el que existen muy reducidos datos debido a la dificultad de su obtención, no sólo en cuanto a las características seminales en la especie, sino también en cuanto a la comprensión previa de los posibles factores moduladores. En nuestro caso, se ha utilizado la misma población de osos para establecer conocimientos previos sobre estructura social y estacionalidad reproductiva necesarios para el desarrollo del proyecto. Un gran tamaño muestral ha sido el otro ingrediente que ha permitido el análisis de factores de variación en las

características seminales. El estatus de dominancia se ha señalado en otras especies como aspecto positivo o negativo en la calidad seminal, pero en el oso pardo, especie tradicionalmente considerada solitaria pero que establece jerarquías de dominancia en al menos en situación de agregación o convivencia en grupo como en la población estudiada, no se asocia con ninguna variación en las características seminales. La estacionalidad es uno de los factores que se esperaba más influyesen en la calidad seminal, en especial debido a la extensa duración de la época reproductiva estudiada, pero su efecto parece no ser intenso durante la época reproductiva. Aunque existen un menor volumen de la fracción rica del eyaculado, parámetros cinéticos y porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos al comienzo de la época reproductiva, sus valores no suponen una merma importante en dichas características. Por ello, tales variaciones no servirían para descartar la época reproductiva inicial como momento recomendado para llevar a cabo una electroeyaculación en el oso pardo, aunque sí para marcar como preferentes a tal efecto los periodos siguientes, es decir, a partir del aumento de la actividad reproductiva en la segunda quincena de abril. De la misma forma, los factores edad y volumen de los testículos están involucrados en variaciones de ciertos parámetros, pero no implican cambios muy acusados y su significado biológico es difícil de interpretar. La edad también supuso un efecto pequeño o nulo en el oso panda y otros carnívoros salvajes como el guepardo y la hiena. El volumen de los testículos, por su parte, se identifica más a menudo en otras especies con variaciones en parámetros productivos de la totalidad del eyaculado, los cuales no fueron analizados en nuestro caso ya que sólo se utilizó la fracción rica del mismo. El factor concentración de testosterona sérica en el momento de la electroeyaculación es aquel que supone variaciones significativas en un mayor número de parámetros de la fracción rica seminal. Los osos con una concentración baja por debajo de 1 ng/mL muestran menores resultados de movilidad y parámetros cinéticos, pero sin embargo un mayor porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto y con alto potencial de membrana. Las implicaciones de tales resultados en la capacidad fertilizante del eyaculado son de nuevo poco claras y necesitarían otro tipo de estudios para su comprensión. Este trabajo se presenta por tanto como una evaluación de todos los aspectos de la biología reproductiva del oso pardo que podrían aplicarse al diseño de estrategias en relación a los protocolos de criopreservación de gametos destinados a los bancos de recursos genéticos.

10. CONCLUSIONES

A continuación, se enumeran las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral:

1. La optimización del algoritmo I & SI aplicado iterativamente a una matriz de frecuencias de interacciones agonísticas para el estudio de la jerarquía en una población agiliza el proceso de análisis y permite definir situaciones de igualdad en la relación de dominancia entre individuos cuando no es posible determinar una relación lineal entre ellos.
2. Los machos de la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno presentaron una jerarquía social estable durante los dos años del estudio formada por tres clases de dominancia y que ha podido ser explicada en base a la combinación específica de parámetros morfométricos (peso corporal, medidas de colmillos, pies y manos), endocrinos (niveles de testosterona) y etológicos (interrupción de montas).
3. El ritmo reproductivo anual de los machos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno se divide en cinco periodos en base a la intensidad del comportamiento de monta y a los niveles de testosterona sérica: tres periodos reproductivos (temprano —quincenas 5 a 7—, central —quincenas 8 a 10— y tardío —quincenas 11 a 16—) y dos periodos no reproductivos (periodos previo y posterior a la época reproductiva).
4. Existen diferencias entre los periodos de la época reproductiva para todos los parámetros etológicos, morfológicos y de la bioquímica sanguínea, así como en algunos parámetros del hemograma, pero no en los niveles séricos de cortisol. En el periodo reproductivo central los machos presentan los mayores niveles de testosterona, de comportamiento de monta y agresivo y los menores de juego del año.
5. Los machos con una concentración sérica de testosterona inferior a 1 ng/mL durante periodo reproductivo central muestran valores más bajos de movilidad espermática y parámetros cinéticos.
6. Aunque los machos de oso pardo presentan una marcada jerarquía social e importantes variaciones asociadas a la estacionalidad reproductiva en aspectos etológicos, morfológicos y fisiológicos, el estudio de sus características seminales muestra que es posible obtener eyaculados válidos para el banco de recursos genéticos de esta especie en cualquier periodo de la época reproductiva y de cualquier oso sexualmente maduro.

11. CONCLUSIONS

Here follow the conclusions derived from the results obtained in the studies presented in this doctoral dissertation:

1. The optimization of the algorithm I & SI applied to a frequency matrix of agonistic interactions for a population hierarchical analysis speeds up the analysis and allows situations of equality in the dominance relationship between individuals when it is not possible to find a linear relationship between them.
2. The males of the brown bear population at Cabárceno Nature Park had a stable social hierarchy during the two-year study composed of three classes of dominance. This hierarchical order has been explained based on a specific combination of morphometric (body weight, measurements of canine teeth, feet and hands), endocrine (testosterone levels) and ethological (interruption of mating) parameters.
3. The annual reproductive rhythm of brown bear males at Cabárceno Nature Park is divided into five periods based on the intensity of mounting behavior and serum testosterone levels: three reproductive periods (early —fortnights 5 to 7—, central —fortnights 8 to 10— and late —fortnights 11 to 16—) and two non-reproductive periods (before and after the breeding season).
4. There are differences between the reproductive season periods in all ethological, morphological and blood biochemistry parameters, as well as in some blood count parameters, but not in serum cortisol levels. During the central reproductive period males present the highest levels of testosterone, mounting behaviour and aggressive behaviour and the lowest levels of play behaviour of the year.
5. Males with a serum testosterone concentration below 1 ng/mL during PB have lower values of sperm motility and kinetic parameters.
6. Even though brown bear males show a strong social hierarchy and important variations associated to reproductive seasonality on ethological, morphological and physiological aspects, the study of brown bear seminal traits shows that it is possible to obtain valid ejaculates for the species' genetic resource bank in any period within the reproductive season and from any sexually mature bear.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ågmo, A., & Laan, E. (2022). Sexual incentive motivation, sexual behavior, and general arousal: Do rats and humans tell the same story? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *135*, 104595. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104595>
- Aitken-Palmer, C. (2010). *Assessment of Male Giant Panda seasonal reproduction, sexual maturity and sperm comparative cryopreservation*. University of Maryland, College Park.
- Aitken-Palmer, C., Hou, R., Burrell, C., Zhang, Z., Wang, C., Spindler, R., Wildt, D. E., Ottinger, M. A., & Howard, J. G. (2012). Protracted reproductive seasonality in the male giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) reflected by patterns in androgen profiles, ejaculate characteristics, and selected behaviors. *Biology of Reproduction*, *86*(6), 195. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099044>
- Akpovi, C. D., Anago, A. A. E., Segbo, A. G. J., Manindji, C., Medehouenou, T. C. M., Loko, F., Vitale, L. M., & Pelletier, R. M. (2015). Blood biochemical parameters levels vary with spermatogenesis in seasonal reproductive model the mink (*Mustela vison*). *International Journal of Biosciences*, *6*(2), 222–229. <https://doi.org/10.12692/ijb/6.2.222-229>
- Almeida, F. F. L., Leal, M. C., & França, L. R. (2006). Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biology of Reproduction*, *75*(5), 792–799. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053835>
- Almquist, J. O., Branas, R. J., & Barber, K. A. (1976). Postpuberal changes in semen production of Charolais bulls ejaculated at high frequency and the relation between testicular measurements and sperm output. *Journal of Animal Science*, *42*(3), 670–676. <https://doi.org/10.2527/jas1976.423670x>
- Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel-López, L., López-Urueña, E., Manrique, P., Borragán, S., Morrell, J. M., de Paz, P., & Anel, L. (2016). Effect of colloid (Androcoll-Bear, Percoll, and PureSperm) selection on the freezability of brown bear (*Ursus arctos*) sperm. *Theriogenology*, *85*(6), 1097–1105. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.021>
- Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., Holt, W. V., Fazeli, A., de Paz, P., & Anel, L. (2013a). The addition of heat shock protein HSPA8 to cryoprotective media improves the survival of brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa during chilling and after cryopreservation. *Theriogenology*, *79*(3), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.006>
- Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., de Paz, P., & Anel, L. (2011). Quality of frozen-thawed semen in brown bear is not affected by timing of glycerol addition. *Theriogenology*, *75*(8), 1561–1565. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.009>
- Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel-Lopez, L., Martínez-Rodriguez, C., Martínez-Pastor, F., Borragán, S., Anel, L., & de Paz, P. (2013b). The Antioxidant effects of soybean lecithin- or low-density lipoprotein-based extenders for the cryopreservation of brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, *25*(8), 1185–1193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/RD12181>
- Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., López-Urueña, E., Martínez-Rodriguez, C., Borragán, S., Anel-López, L., De Paz, P., & Anel, L. (2013c). Brown bear sperm double freezing: Effect of elapsed

time and use of PureSperm® gradient between freeze-thaw cycles. *Cryobiology*, 67(3), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.10.001>

Álvarez-Rodríguez, M., & Martínez-Pastor, F. (2021). Molecular determinants of seminal plasma on sperm biology and fertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3–5. <https://doi.org/10.3390/ijms22073555>

Álvarez, M., García-Macías, V., Martínez-Pastor, F., Martínez, F., Borragán, S., Mata, M., Garde, J., Anel, L., & De Paz, P. (2008). Effects of cryopreservation on head morphometry and its relation with chromatin status in brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa. *Theriogenology*, 70(9), 1498–1506. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.097>

Álvarez, M., Nicolás, M., Borragán, S., López-Urueña, E., Anel-López, L., Martínez-Pastor, F., Tamayo-Canul, J., Anel, L., & de Paz, P. (2012). The percentage of spermatozoa lost during the centrifugation of brown bear (*Ursus arctos*) ejaculates is associated with some spermatozoa quality and seminal plasma characteristics. *Animal Reproduction Science*, 135(1–4), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.09.009>

Anel-López, L., Ortega-Ferrusola, C., Álvarez, M., Borragán, S., Chamorro, C., Peña, F. J., Morrell, J., Anel, L., & De Paz, P. (2017a). Improving sperm banking efficiency in endangered species through the use of a sperm selection method in brown bear (*Ursus arctos*) thawed sperm. *BMC Veterinary Research*, 13, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1124-2>

Anel-López, L., Ortega-Ferrusola, C., Martínez-Rodríguez, C., Álvarez, M., Borragán, S., Chamorro, C., Peña, F. J., Anel, L., & De Paz, P. (2017b). Analysis of seminal plasma from brown bear (*Ursus arctos*) during the breeding season: Its relationship with testosterone levels. *PLoS ONE*, 12(8), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181776>

Anel, L., Álvarez, M., Anel, E., Martínez-Pastor, F., Martínez, F., Chamorro, C., & de Paz, P. (2011). Evaluation of Three Different Extenders for Use in Emergency Salvaging of Epididymal Spermatozoa from a Cantabric Brown Bear. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), e85–e90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01646.x>

Anel, L., Álvarez, M., Martínez-Pastor, F., Gomes, S., Nicolás, M., Mata, M., Martínez, A., Borragán, S., Anel, E., & De Paz, P. (2008). Sperm cryopreservation in brown bear (*Ursus arctos*): Preliminary aspects. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 9–17. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01248.x>

Anel, L., Gomes-Alves, S., Álvarez, M., Borragán, S., Anel, E., Nicolás, M., Martínez-Pastor, F., & de Paz, P. (2010). Effect of basic factors of extender composition on post-thawing quality of brown bear electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 74(4), 643–651. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)91836-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)91836-8)

Anel, L., Martínez, F., Álvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., Kaabi, M., Paz, P., Chamorro, C., & Herraes, P. (1999). Post-mortem spermatozoa recovery and freezing in a Cantabric brown bear (*Ursus arctos*): a preliminary report. *Theriogenology*, 51(1), 277. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)91836-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)91836-8)

Arinell, K., Blanc, S., Welinder, K. G., Støen, O. G., Evans, A. L., & Frøbert, O. (2018). Physical inactivity and platelet function in humans and brown bears: A comparative study. *Platelets*, 29(1), 87–90. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1336530>

- Arinell, K., Sahdo, B., Evans, A. L., Arnemo, J. M., Baandrup, U., & Fröbert, O. (2012). Brown Bears (*Ursus arctos*) Seem Resistant to Atherosclerosis Despite Highly Elevated Plasma Lipids during Hibernation and Active State. *Clinical and Translational Science*, 5(3), 269–272. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00370.x>
- Barboza, P. S., Hartbauer, D. W., Hauer, W. E., & Blake, J. E. (2004). Polygynous mating impairs body condition and homeostasis in male reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 174(4), 309–317. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0416-6>
- Bekoff, M., & Bekoff, M. (1984). Social Play Behavior. *Bioscience*, 34, 228–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1309460>
- Bellemain, E., Swenson, J. E., & Taberlet, P. (2006a). Mating Strategies in Relation to Sexually Selected Infanticide in a Non-Social Carnivore: the Brown Bear. *Ethology*, 112(3), 238–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2006.01152.x>
- Bellemain, E., Zedrosser, A., Manel, S., Waits, L. P., Taberlet, P., & Swenson, J. E. (2006b). The dilemma of female mate selection in the brown bear, a species with sexually selected infanticide. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1584), 283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3331>
- Berndtson, W. E. (2014). Sperm production and its harvest. In *Animal Andrology. Theories and Applications* (pp. 11–33). Wallingford UK: CABI.
- Birkhead, T. R., & Pizzari, T. (2002). Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 262–273. <https://doi.org/10.1038/nrg774>
- Blanchard, T. L., Brinsko, S. P., Varner, D. D., & Love, C. C. (2013). Progression of Reproductive Changes Accompanying Testicular Dysfunction in Aging Thoroughbred Stallions: Case Studies. *Proceedings 59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 59, 532–536.
- Blanco, J. C., Palomero, G., Ballesteros, F., & López-Bao, J. V. (2022). Late mating behaviour in European brown bears. *European Journal of Wildlife Research*, 68(6), 2–5. <https://doi.org/10.1007/s10344-022-01617-3>
- Blottner, S., Hingst, O., & Meyer, H. H. D. (1996). Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 108, 299–305. <https://doi.org/10.2307/3504309>
- Boone, W. R., Keck, B. B., Catlin, J. C., Casey, K. J., Boone, E. T., Dye, P. S., Schuett, R. J., Tsubota, T., & Bahr, J. C. (2004). Evidence that bears are induced ovulators. *Theriogenology*, 61(6), 1163–1169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.016>
- Bouissou, M. F. (1983). Androgens, aggressive behaviour and social relationships in higher mammals. *Hormone Research*, 18, 43–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000179778>
- Brito, L. F. C., Sertich, P. L., Stull, G. B., Rives, W., & Knobbe, M. (2010). Sperm ultrastructure, morphometry, and abnormal morphology in American black bears (*Ursus americanus*). *Theriogenology*, 74(8), 1403–1413. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.012>

- Bryan, H. M., Darimont, C. T., Paquet, P. C., Wynne-Edwards, K. E., & Smits, J. E. G. (2013). Stress and reproductive hormones in grizzly bears reflect nutritional benefits and social consequences of a salmon foraging niche. *PLoS ONE*, 8(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080537>
- Bryan, H. M., Darimont, C. T., Paquet, P. C., Wynne-Edwards, K. E., & Smits, J. E. G. (2014). Stress and reproductive hormones reflect inter-specific social and nutritional conditions mediated by resource availability in a bear-salmon system. *Conservation Physiology*, 2(1), 1–18. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou010>
- Byers, A. P., Hunter, A. G., Seal, U. S., Graham, E. F., & Tilson, R. L. (1990). Effect of season on seminal traits and serum hormone concentrations in captive male Siberian tigers (*Panthera tigris*). *J. Reprod. Fert.*, 90, 119–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900119>
- Cattet, M. R. L., Christison, K., Caulkett, N. A., & Stenhouse, G. B. (2003). Physiologic responses of Grizzly bears to different methods of capture. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), 649–654. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.3.649>
- Cattet, M., Stenhouse, G. B., Boulanger, J., Janz, D. M., Kapronczai, L., Swenson, J. E., & Zedrosser, A. (2018). Can concentrations of steroid hormones in brown bear hair reveal age class? *Conservation Physiology*, 6(1), 1–20. <https://doi.org/10.1093/conphys/coy001>
- Cattet, M., Stenhouse, G. B., Janz, D. M., Kapronczai, L., Anne Erlenbach, J., Jansen, H. T., Nelson, O. L., Robbins, C. T., & Boulanger, J. (2017). The quantification of reproductive hormones in the hair of captive adult brown bears and their application as indicators of sex and reproductive state. *Conservation Physiology*, 5(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/conphys/cox032>
- Chauhan, V., Sheikh, A., Chauhan, A., Tsiouris, J., Malik, M., & Vaughan, M. (2002). Changes during hibernation in different phospholipid and free and esterified cholesterol serum levels in black bears. *Biochimie*, 84(10), 1031–1034. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)00006-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)00006-8)
- Chen, L. M., Hou, R., Zhang, Z. H., Wang, J. S., An, X. R., Chen, Y. F., Zheng, H. P., Xia, G. L., & Zhang, M. J. (2007). Electroejaculation and semen characteristics of Asiatic Black bears (*Ursus thibetanus*). *Animal Reproduction Science*, 101(3–4), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.011>
- Cherry, S. G., Derocher, A. E., Stirling, I., & Richardson, E. S. (2009). Fasting physiology of polar bears in relation to environmental change and breeding behavior in the Beaufort Sea. *Polar Biology*, 32(3), 383–391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00300-008-0530-0>
- Clapham, M., & Kitchin, J. (2016). Social play in wild brown bears of varying age-sex class. *Acta Ethologica*, 19(3), 181–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10211-016-0237-0>
- Clapham, M., Nevin, O. T., Ramsey, A. D., & Rosell, F. (2012). A hypothetico-deductive approach to assessing the social function of chemical signalling in a non-territorial solitary carnivore. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035404>
- Clevenger, A. P., Purroy, F. J., & Pelton, M. R. (1990). Movement and Activity Patterns of a European Brown Bear in the Cantabrian Mountains, Spain. *Bears*, 8, 205–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872920>

- Colmenares, F., & Rivero, H. (1983). Male-male tolerance, mate sharing and social bonds among adult male brown bears living under group conditions in captivity. In *Acta Zoologica Fennica* (Vol. 174, pp. 149–151).
- Corte Pause, F., Crociati, M., Urli, S., Monaci, M., Degano, L., & Stradaoli, G. (2022). Environmental Factors Affecting the Reproductive Efficiency of Italian Simmental Young Bulls. *Animals*, 12(18), 2476. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani12182476>
- Craighead, J. J., Sumner, J. S., & Mitchell, J. A. (1995a). *The Grizzly Bears of Yellowstone: their ecology in the Yellowstone Ecosystem, 1959-1992*. Island Press.
- Craighead, L., Paetkau, D., Reynolds, H. V., Vyse, E. R., & Strobeck, C. (1995b). Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Arctic grizzly bears. *Journal of Heredity*, 86(4), 255–261. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111578>
- Creel, S. (2001). Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(9), 491–497. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02227-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02227-3)
- Cronin, M. A., Shideler, R., Waits, L., & Nelson, R. J. (2005). Genetic variation and relatedness in grizzly bears in the Prudhoe Bay region and adjacent areas in northern Alaska. *Ursus*, 16(1), 70–84. [https://doi.org/10.2192/1537-6176\(2005\)016\[0070:GVARIG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2192/1537-6176(2005)016[0070:GVARIG]2.0.CO;2)
- Crosier, A. E., Marker, L., Howard, J. G., Pukazhenth, B. S., Henghali, J. N., & Wildt, D. E. (2007). Ejaculate traits in the Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*): Influence of age, season and captivity. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(2), 370–382. <https://doi.org/10.1071/RD06057>
- Curren, L. J., Weldele, M. L., & Holekamp, K. E. (2013). Ejaculate quality in spotted hyenas: Intraspecific variation in relation to life-history traits. *Journal of Mammalogy*, 94(1), 90–99. <https://doi.org/10.1644/12-MAMM-A-057.1>
- De Barba, M., Waits, L. P., Garton, E. O., Genovesi, P., Randi, E., Mustoni, A., & Groff, C. (2010). The power of genetic monitoring for studying demography, ecology and genetics of a reintroduced brown bear population. *Molecular Ecology*, 19(18), 3938–3951. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04791.x>
- De Paz, P., Álvarez-Rodríguez, M., Nicolás, M., Álvarez, M., Chamorro, C. A., Borrarán, S., Martínez-Pastor, F., & Anel, L. (2012). Optimization of glycerol concentration and freezing rate in the cryopreservation of ejaculate from brown bear (*Ursus arctos*). *Reproduction in Domestic Animals*, 47(1), 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01808.x>
- De Vries, H. (1998). Finding a dominance order most consistent with a linear hierarchy: a new procedure and review. *Animal Behaviour*, 55(4), 827–843. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.08.019>
- De Vries, H., Stevens, J. M. G., & Vervaecke, H. (2006). Measuring and testing the steepness of dominance hierarchies. *Animal Behaviour*, 71(3), 585–592. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.05.015>
- Derocher, A. E., & Stirling, I. (1990). Observations of aggregating behaviour in adult male polar bears (*Ursus maritimus*). *Canadian Journal of Zoology*, 68(7), 1390–1394. <https://doi.org/10.1139/z90-207>

- Díaz, S., Settele, J., & Brondízio, E. (2019). Report of the Plenary of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on the work of its seventh session. *Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES)*, 7(1), 45.
- Dowsett, K. F., & Knott, L. M. (1996). The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, 46(3), 397–412. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00162-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00162-8)
- Egbert, A. L., Stokes, A. W., & Egbert, A. L. (1976). The social behaviour of brown bears on an Alaskan salmon stream. *Bears: Their Biology and Management*, 3, 41–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872753>
- Ellis, L. (1995). Dominance and reproductive success among nonhuman animals: A cross-species comparison. *Ethology and Sociobiology*, 16(4), 257–333. [https://doi.org/10.1016/0162-3095\(95\)00050-U](https://doi.org/10.1016/0162-3095(95)00050-U)
- Engh, A. L., Funk, S. M., Van Horn, R. C., Scribner, K. T., Bruford, M. W., Libants, S., Szykman, M., Smale, L., & Holekamp, K. E. (2002). Reproductive skew among males in a female-dominated mammalian society. *Behavioral Ecology*, 13(2), 193–200. <https://doi.org/10.1093/beheco/13.2.193>
- Erickson, A. W., Mossman, H. W., Hensel, R. J., & Troyer, W. A. (1968). The breeding biology of the male brown bear. *Zoologica*, 53, 85–105.
- Erickson, A. W., & Youatt, W. G. (1961). Seasonal Variations in the Hematology and Physiology of Black Bears. *Journal of Mammalogy*, 42(2), 198. <https://doi.org/10.2307/1376829>
- Eskenazi, B., Wyrobek, A. J., Slotter, E., Kidd, S. A., Moore, L., Young, S., & Moore, D. (2003). The association of age and semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, 18(2), 447–454. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg107>
- Esteruelas, N. F., Cattet, M., Zedrosser, A., Stenhouse, G. B., Küker, S., Evans, A. L., & Arnemo, J. M. (2017). A double-blinded, randomized comparison of medetomidine-tiletamine-zolazepam and dexmedetomidine-tiletamine-zolazepam anesthesia in free-ranging brown bears (*Ursus arctos*). *PLoS ONE*, 12(1), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170764>
- Evans, A. L., Sahlén, V., Støen, O. G., Fahlman, Å., Brunberg, S., Madslén, K., Frøbert, O., Swenson, J. E., & Arnemo, J. M. (2012). Capture, anesthesia, and disturbance of free-ranging brown bears (*Ursus arctos*) during hibernation. *PLoS ONE*, 7(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040520>
- Fagen, R., & Fagen, J. (1990). Play Behavior of Brown Bears (*Ursus arctos*) and Human Presence at Pack Creek, Admiralty Island, Alaska. *Bears: Their Biology and Management*, 8, 315. <https://doi.org/10.2307/3872934>
- Fagen, R., & Fagen, J. (2004). Juvenile survival and benefits of play behaviour in brown bears, *Ursus arctos*. *Evolutionary Ecology Research*, 6, 89–102.
- Fagen, R., & Fagen, J. (2009). Play behaviour and multi-year juvenile survival in free-ranging brown bears, *Ursus arctos*. *Evolutionary Ecology Research*, 11, 1–15.
- Fagen, R., & Fagen, J. M. (1996). Individual distinctiveness in brown bears, *Ursus arctos* L. *Ethology*, 102(2), 212–226. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1996.tb01119.x>

- Fahlman, Å., Arnemo, J. M., Swenson, J. E., Pringle, J., Brunberg, S., & Nyman, G. (2011). Physiologic evaluation of capture and anesthesia with medetomidine- zolazepam-tiletamine in brown bears (*Ursus arctos*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42(1), 1–11. <https://doi.org/10.1638/2008-0117.1>
- Fernández-Gil, A., Naves, J., & Delibes, M. (2006). Courtship of brown bears *Ursus arctos* in northern Spain: phenology, weather, habitat and durable mating areas. *Wildlife Biology*, 12(4), 367–373. [https://doi.org/https://doi.org/10.2981/0909-6396\(2006\)12\[367:COBBUA\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.2981/0909-6396(2006)12[367:COBBUA]2.0.CO;2)
- Fickel, J., Wagener, A., & Ludwig, A. (2007). Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research*, 53(2), 81–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10344-007-0089-z>
- Finn, C., Grattarola, F., & Pincheira-Donoso, D. (2023). More losers than winners: investigating Anthropocene defaunation through the diversity of population trends. *Biological Reviews*, 4. <https://doi.org/10.1111/brv.12974>
- Friebe, A., Swenson, J. E., & Sandegren, F. (2001). Denning chronology of female brown bears in central Sweden. *Ursus*, 12, 37–45.
- Fundación Oso Pardo. (2023). *Cuántos osos hay y dónde viven*. https://fundacionosopardo.org/wp-content/uploads/2023/03/ficha1_2023_ESP_Marzo.pdf
- Galbany, J., Tung, J., Altmann, J., & Alberts, S. C. (2015). Canine Length in Wild Male Baboons: Maturation, Aging and Social Dominance Rank. *PloS One*, 10(5), e0126415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126415>
- García-Macías, V., Martínez-Pastor, F., Álvarez, M., Borragan, S., Chamorro, C. A., Soler, A. J., De Paulino, P., & Rodríguez, L. A. (2006). Seasonal changes in sperm chromatin condensation in ram (*Ovis aries*), Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and brown bear (*Ursus arctos*). *Journal of Andrology*, 27(6), 837–846. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000315>
- García-Rodríguez, A., Rigg, R., Elguero-Claramunt, I., Bojarska, K., Krofel, M., Parchizadeh, J., Pataky, T., Seryodkin, I., Skuban, M., Wabakken, P., Zięba, F., Zwijacz-Kozica, T., & Selva, N. (2020). Phenology of brown bear breeding season and related geographical cues. *European Zoological Journal*, 87(1), 552–558. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1801866>
- García, J. L., Rey, I., & Doadrio, I. (2003). *Estudio Genético Del Oso Pardo Cantábrico en Asturias*.
- Garshelis, D. L., & Hellgren, E. C. (1994). Variation in reproductive biology of male black bears. *Journal of Mammalogy*, 75(1), 175–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1382249>
- Gende, S. M., & Quinn, T. P. (2004). The relative importance of prey density and social dominance in determining energy intake by bears feeding on Pacific salmon. *Canadian Journal of Zoology*, 82(1), 75–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/z03-226>
- Giammanco, M., Tabacchi, G., Giammanco, S., Di Majo, D., & La Guardia, M. (2004). Testosterone and aggressiveness. *Medical Science Monitor*, 10(10), 60–63.
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>

- Gocinski, B. L., Knott, K. K., Roberts, B. M., Brown, J. L., Vance, C. K., & Kouba, A. J. (2018). Changes in urinary androgen concentration indicate that male giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) respond to impending female oestrus during and outside the typical spring breeding season. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(2), 399–408. <https://doi.org/10.1071/RD16345>
- Gomendio, M., Martin-coello, J., Crespo, C., Magaña, C., & Roldan, E. R. S. (2006). Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *Pnas*, 103(41), 15113–15117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0605795103>
- Gomes-Alves, S., Álvarez, M., Nicolás, M., López -Urueña, E., Martínez-Rodríguez, C., Borragán, S., de Paz, P., & Anel, L. (2014a). Use of commercial extenders and alternatives to prevent sperm agglutination for cryopreservation of brown bear semen. *Theriogenology*, 82(3), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.015>
- Gomes-Alves, S., Alvarez, M., Nicolás, M., Martinez-Rodriguez, C., Borragán, S., Chamorro, C. A., Anel, L., & de Paz, P. (2014b). Salvaging urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). *Animal Reproduction Science* 150(3-4), 148-157.
- Gomes-Alves, S., Nicolás, M., Borragán, S., Martínez, F., de Paz, P., Anel, L., & Álvarez, M. (2011). Seasonal variation in testicular volume and serum testosterone concentrations in the brown bear. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 108–109.
- González-Bernardo, E., Russo, L. F., Valderrábano, E., Fernández, Á., & Penteriani, V. (2020). Denning in brown bears. *Ecology and Evolution*, 10(13), 6844–6862. <https://doi.org/10.1002/ece3.6372>
- Goymann, W., East, M. L., & Hofer, H. (2003). Defense of females, but not social status, predicts plasma androgen levels in male spotted hyenas. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(4), 586–593. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/375659>
- Goymann, W., & Wingfield, J. C. (2004). Allostatic load, social status and stress hormones: The costs of social status matter. *Animal Behaviour*, 67(3), 591–602. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.08.007>
- Græsli, A. R., Evans, A. L., Fahlman, Å., Bertelsen, M. F., Blanc, S., Arnemo, J. M., Fahlman, A., Bertelsen, M. F., Blanc, S., & Arnemo, J. M. (2015). Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0615-2>
- Græsli, A. R., Fahlman, Å., Evans, A. L., Bertelsen, M. F., Arnemo, J. M., & Nielsen, S. S. (2014). Haematological and biochemical reference intervals for free-ranging brown bears (*Ursus arctos*) in Sweden. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0183-x>
- Halikas, G. C., & Bowers, K. (1972). Seasonal Variation in Blood Viscosity of the black bear. *Comparative Biochemistry And Physiology*, 41(A), 433–436. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9629\(72\)90074-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9629(72)90074-6)
- Halloran, D. W., & Pearson, A. M. (1972). Blood chemistry of the brown bear (*Ursus arctos*) from southwestern Yukon Territory, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 50(6), 827–833. <https://doi.org/10.1139/z72-112>

- Hamer, D., & Herrero, S. (1990). Courtship and use of mating areas by grizzly bears in the Front Ranges of Banff National Park, Alberta. *Canadian Journal of Zoology*, 68(12), 2695–2697. <https://doi.org/10.1139/z90-373>
- Harlow, H. J., Beck, T. D. I., Walters, L. M., & Greenhouse, S. S. (1990). Seasonal serum glucose, progesterone, and Cortisol levels of black bears (*Ursus americanus*). *Canadian Journal of Zoology*, 68(1), 183–187. <https://doi.org/10.1139/z90-025>
- Hellgren, E. C., Rogers, L. L., & Seal, U. S. (1993). Serum Chemistry and Hematology of Black Bears: Physiological Indices of Habitat Quality or Seasonal Patterns? *Journal of Mammalogy*, 74(2), 304–315. <https://doi.org/10.2307/1382385>
- Hellgren, E. C., Vaughan, M. R., & Kirkpatrick, R. L. (1989). Seasonal patterns in physiology and nutrition of black bears in Great Dismal Swamp, Virginia-North Carolina. *Canadian Journal of Zoology*, 67(8), 1837–1850. <https://doi.org/10.1139/z89-262>
- Hellgren, E. C. (1995). Physiology of hibernation in bears. *Ursus*, 10, 467–477.
- Herrero, S. (1983). Social Behaviour of Black Bears at a Garbage Dump in Jasper National Park. *Bears: Their Biology and Management*, 5, 54–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872520>
- Hilderbrand, G. V., Schwartz, C. C., Robbins, C. T., & Hanley, T. A. (2000). Effect of Hibernation and Reproductive Status on Body Mass and Condition of Coastal Brown Bears. *The Journal of Wildlife Management*, 64(1), 178. <https://doi.org/10.2307/3802988>
- Himelright, B. M., Moore, J. M., Gonzales, R. L., Mendoza, A. V., Dye, P. S., Schuett, R. J., Durrant, B. S., Read, B. A., & Spady, T. J. (2014). Sequential ovulation and fertility of polyoestrus in American black bears (*Ursus americanus*). *Conservation Physiology*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.1093/conphys/cou051>
- Hissa, R., Hohtola, E., Tuomala-Saramaki, T., Laine, T., & Kallio, H. (1998a). Seasonal changes in fatty acids and leptin contents in the plasma of the European brown bear (*Ursus arctos arctos*). *Annales Zoologici Fennici*, 35, 215–224. <http://www.sekj.org/PDF/anzf35/anzf35-215p.pdf>
- Hissa, R., Puukka, M., Hohtola, E., Sassi, M. L., & Risteli, J. (1998b). Seasonal changes in plasma nitrogenous compounds of the European brown bear (*Ursus arctos arctos*). *Annales Zoologici Fennici*, 35, 205–214.
- Hissa, R., Siekkinen, J., Hohtola, E., Saarela, S., Hakala, A., & Pudas, J. (1994). Seasonal patterns in the physiology of the European brown bear (*Ursus arctos arctos*) in Finland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(3), 781–791. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90222-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90222-4)
- Holt, W. V., & Pickard, A. R. (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reproduction*, 4(3), 143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1530/revreprod/4.3.143>
- Horan, K. T., Nelson, R. A., Palmer, S. S., & Bahr, J. M. (1993). Seasonal response of the pituitary and testes to gonadotropin-releasing hormone in the black bear (*Ursus americanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(2), 175–182. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90498-S](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90498-S)

- Hornocker, M. G. (1962). *Population characteristics and social and reproductive behavior of the grizzly bear in Yellowstone National Park*. University of Montana.
- Howell-Skalla, L. A., Cattet, M. R., Ramsay, M. A., & Bahr, J. M. (2002). Seasonal changes in testicular size and serum LH, prolactin and testosterone concentrations in male polar bears (*Ursus maritimus*). *Reproduction*, 123(5), 729. <https://doi.org/https://doi.org/10.1530/rep.0.1230729>
- Huber, D., Kusak, J., Zvorc, Z., & Rafaj, R. B. (1997). Effects of sex, capturing method, and season on serum chemistry values of brown bears in Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(4), 790. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872642>
- Ibrahim, S. A. (1997). Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Animal Reproduction Science*, 49(2–3), 161–167. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00063-8)
- Ishikawa, A., Sakamoto, H., Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2003). Changes in sexual behavior and fecal steroid hormone concentrations during the breeding season in female Hokkaido brown bears (*Ursus arctos yesoensis*) under captive condition. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 65(1), 99–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1292/jvms.65.99>
- Ishikawa, A., Matsui, M., Sakamoto, H., Katagiri, S., & Takahashi, Y. (2002). Cryopreservation of the semen collected by electroejaculation from the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(4), 373–376. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.373>
- Ishikawa, A., Matsui, M., Tsuruga, H., Sakamoto, H., Takahashi, Y., & Kanagawa, H. (1998). Electroejaculation and Semen Characteristics of the Captive Hokkaido Brown Bear (*Ursus arctos yesoensis*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 60(8), 965–968. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.965>
- Jamnicky, B., Huber, D., & Roth, H. U. (1987). On Serum Chemistry of Brown Bears in Croatia, Yugoslavia. *Bears: Their Biology and Management*, 7, 351. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872642>
- Jeong, D. H., Yang, J. J., Seo, M. K., Lee, A. N., & Lim, Y. K. (2019). Effectiveness of urethral catheterization under ultrasound guidance for semen collection from Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*). *Theriogenology*, 129, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.032>
- Jonkel, J. J. (1993). *A manual for handling bears for managers and researchers*.
- Karjalainen, M., Surcel, H. M., & Hissa, R. (1995). Quantitative and functional analysis of peripheral blood mononuclear cells in European brown bear (*Ursus arctos arctos*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112(3–4), 495–501. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)02018-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)02018-7)
- Kersey, D. C., Wildt, D. E., Brown, J. L., Huang, Y., Snyder, R. J., & Monfort, S. L. (2010). Parallel and seasonal changes in gonadal and adrenal hormones in male giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Mammalogy*, 91(6), 1496–1507. <https://doi.org/10.1644/09-MAMM-A-404.1>

- Kidd, S. A., Eskenazi, B., & Wyrobek, A. J. (2001). Effects of male age on semen quality and fertility: A review of the literature. *Fertility and Sterility*, 75(2), 237–248. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01679-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01679-4)
- Kingsley, M. C. S., Nagy, J. A., & Russell, R. H. (1983). Patterns of Weight Gain and Loss for Grizzly Bears in Northern Canada. *Bears: Their Biology and Management*, 5, 174. <https://doi.org/10.2307/3872535>
- Klass, K., & Cords, M. (2011). Effect of unknown relationships on linearity, steepness and rank ordering of dominance hierarchies: Simulation studies based on data from wild monkeys. *Behavioural Processes*, 88(3), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2011.09.003>
- Knauf, T., Jewgenow, K., Hildebrandt, T. B., Blottner, S., Ochs, A., Eulenberger, K., Bernhard, A., Osmann, C., & Göritz, F. (2002). Reproductive health assessment in male bears using ultrasonography. *Proc. EAZWV 4th Scientific Meeting Joint with EWDA*, 443–450.
- Koene, P. (1998). Adaptation of blind brown bears to a new environment and its residents: Stereotypy and play as welfare indicators. *Ursus*, 10, 579–587. <https://doi.org/10.2307/3873172>
- Koene, P., Ardesch, J., Ludriks, A., Urff, E., Wenzelides, L., & Wittenberg, V. (2002). Interspecific and intraspecific social interactions among brown bears and wolves in an enclosure. *Ursus*, 13, 85–93.
- Koene, P., & Ipema, B. (2014). Social networks and welfare in future animal management. *Animals*, 4(1), 93–118. <https://doi.org/10.3390/ani4010093>
- Kohira, M., & Mori, S. (2010). Reported mating of Hokkaido brown bear in autumn. *Ursus*, 21(2), 192–194. <https://doi.org/https://doi.org/10.2192/09SC030.1>
- Kovach, A. I., & Powell, R. A. (2003). Effects of body size on male mating tactics and paternity in black bears, *Ursus americanus*. *Canadian Journal of Zoology*, 81(7), 1257–1268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/z03-111>
- Kuduk, K., Babik, W., Bellemain, E., Valentini, A., Zedrosser, A., Taberlet, P., Kindberg, J., Swenson, J. E., & Radwan, J. (2014). No evidence for the effect of MHC on male mating success in the brown bear. *PLoS ONE*, 9(12), 2–4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113414>
- Kusak, J., Rafaj, R. B., Žvorc, Z., Huber, D., Foršek, J., & Bedrica, L. (2005). Effects of sex, age, body mass, and capturing method on hematologic values of brown bears in Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 843–847. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.4.843>
- Latour, P. B. (1981a). Interactions between free-ranging, adult male polar bears (*Ursus maritimus Phipps*): a case of adult social play. *Canadian Journal of Zoology*, 59(9), 1775–1783. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajhb.23751>
- Latour, P. B. (1981b). Spatial relationships and behavior of polar bears (*Ursus maritimus Phipps*) concentrated on land during the ice-free season of Hudson Bay. *Canadian Journal of Zoology*, 59(9), 1763–1774. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/z81-242>
- Lee, J. H., Choi, J. D., Kang, J. Y., Yoo, T. K., & Park, Y. W. (2022). Testosterone deficiency and the risk of anemia: A propensity score–matched analysis. *American Journal of Human Biology*, 34(8), e23751. <https://doi.org/10.1002/ajhb.23751>

Ligot, E. (2019). *Age and seasonal influences on the body mass and the testicular morphology of brown bears (Ursus arctos) in Croatia*. Université de Liège.

Lindsjö, H. J. A. (2010). *Development and application of a health function score system for grizzly bears (Ursus arctos) in western Alberta*. University of Saskatchewan. <https://doi.org/10.7868/s0044513414050079>

López-Urueña, E., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Manrique, P., Anel-López, L., Chamorro, C. A., Borragán, S., de Paz, P., & Anel, L. (2014a). Alternative procedures for the cryopreservation of brown bear ejaculates depending on the flexibility of the “in cooling” period (5°C). *Cryobiology*, *69*(3), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.001>

López-Urueña, E., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Martínez-Rodríguez, C., Borragán, S., Anel-López, L., De Paz, P., & Anel, L. (2014b). Tolerance of brown bear spermatozoa to conditions of pre-freezing cooling rate and equilibration time. *Theriogenology*, *81*(9), 1229–1238. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.004>

López-Urueña, E., Anel-López, L., Borragán, S., Ortega Ferrusola, C., Manrique, P., de Paz, P., Anel, L., & Álvarez, M. (2016). The use of gelatine in long-term storage (up to 48 hr) at 5°C preserves the pre-freezing and post-thawing quality of brown bear sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, *51*(5), 700–707. <https://doi.org/10.1111/rda.12734>

López-Urueña, E., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Anel-López, L., Martínez-Rodríguez, C., Manrique, P., Borragán, S., Anel, L., & de Paz, P. (2015). Optimization of conditions for long-term prefreezing storage of brown bear sperm before cryopreservation. *Theriogenology*, *84*, 1161–1171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.017>

Macbeth, B. J., Cattet, M. R. L., Stenhouse, G. B., Gibeau, M. L., & Janz, D. M. (2010). Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging grizzly bears (*Ursus arctos*): Considerations with implications for other wildlife. *Canadian Journal of Zoology*, *88*(10), 935–949. <https://doi.org/10.1139/Z10-057>

MacDonald, E., Czekala, N., Gual-Sil, F., Nakao, T., Wang, P.-Y., Gual-Sill, F., & Nakao, T. (2006). Urinary testosterone and cortisol metabolites in male giant pandas *Ailuropoda melanoleuca* in relation to breeding, housing, and season. *Acta Zoologica Sinica*, *52*(2), 242–249.

Malo, A. F., Roldan, E. R. S., Garde, J. J., Soler, A. J., Vicente, J., Gortazar, C., & Gomendio, M. (2012). What does testosterone do for red deer males? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1658), 971–980. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1367>

Mann, T., & Lutwak-Mann, C. (1981). Male Reproductive Function and the Composition of Semen: General Considerations. In *Male Reproductive Function and Semen* (pp. 1–37).

Manrique-Revuelta, P. (2010). *Variaciones de parámetros sanguíneos y urinarios en función del cronograma biológico en machos*. University of Leon.

Manrique-Revuelta, P., De Paz, P., Borragán, S., López-Urueña, E., Zavala, V., Anel-López, L., Anel, L., & Álvarez, M. (2023). Spermatozoa recovery beyond the breeding season in brown bears (*Ursus arctos*): every germplasm sample counts. *Zoo and Wildlife Health Conference 2023*, 115.

- Manrique, P., López-Urueña, E., Álvarez, M., Borragán, S., Gomes-Alves, S., Nicolás, M., de Paz, P., Martínez-Pastor, F., & Anel, L. (2012). Effects of season and male's age on brown bear mating length. *Reproduction in Domestic Animals*, *47*(5), 95–96.
- Marshall, S. M. (2008). *Behavioural effects of viewing and social dynamics of grizzly bears along the Fishing Branch River, Yukon*. Simon Fraser University.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., & de Paz, P. (2010). Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, *45*(SUPPL. 2), 67–78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>
- Martins-Bessa, A., Quaresma, M., Leiva, B., Calado, A., Arando, A., Marín, C., & Navas, F. J. (2021). Age-related linear and nonlinear modelling of semen quality parameters in Miranda donkeys. *Italian Journal of Animal Science*, *20*(1), 1029–1041. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1933629>
- McMillin, J. M., Seal, U. S., Rogers, L., & Erickson, A. W. (1976). Annual Testosterone Rhythm in the Black Bear (*Ursus americanus*). *Biology of Reproduction*, *167*, 163–167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod15.2.163>
- Mehta, P. H., Jones, A. C., & Josephs, R. A. (2008). The social endocrinology of dominance: basal testosterone predicts cortisol changes and behavior following victory and defeat. *Journal of Personality and Social Psychology*, *94*(6), 1078. <https://doi.org/https://doi.org/10.1037/0022-3514.94.6.1078>
- Mehta, P. H., & Josephs, R. A. (2010). Testosterone and cortisol jointly regulate dominance: Evidence for a dual-hormone hypothesis. *Hormones and Behavior*, *58*(5), 898–906. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.020>
- Millán, M. F., Carranza, J., Seoane, J. M., & Pérez-González, J. (2022). Forage quality of consecutive years interact to affect body condition, reproductive rate and rut phenology in Iberian red deer. *PLoS ONE*, *17*(12), e0278367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278367>
- Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas, 46 Boletín Oficial del Estado 20912 (2011). <http://www.boe.es/boe/dias/2011/02/23/pdfs/BOE-A-2011-3582.pdf>
- Minter, L. J., & DeLiberto, T. J. (2008). Seasonal variation in serum testosterone, testicular volume, and semen characteristics in the coyote (*Canis latrans*). *Theriogenology*, *69*(8), 946–952. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.010>
- Mominoki, K., Morimatsu, M., Karjalainen, M., Hohtola, E., Hissa, R., & Saito, M. (2005). Elevated plasma concentrations of haptoglobin in European brown bears during hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *142*(4), 472–477. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.09.017>
- Montaudouin, S., & Pape, G. L. (2005). Comparison between 28 zoological parks: stereotypic and social behaviours of captive brown bears (*Ursus arctos*). *Applied Animal Behaviour Science*, *92*(1–2), 129–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.10.015>

Montes-Garrido, R., Riesco, M. F., Anel-Lopez, L., Neila-Montero, M., Palacin-Martinez, C., Boixo, J. C., de Paz, P., Ortega-Ferrusola, C., Hassan, M. A. A., Anel, L., & Alvarez, M. (2022). Application of ultrasound technique to evaluate the testicular function and its correlation to the sperm quality after different collection frequency in rams. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 1035036. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1035036>

Montrose, V. T., Edwin Harris, W., Moore, A. J., & Moore, P. J. (2008). Sperm competition within a dominance hierarchy: Investment in social status vs. investment in ejaculates. *Journal of Evolutionary Biology*, *21*(5), 1290–1296. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01570.x>

Moore, H. D. M., Bush, M., Celma, M., Garcia, A.-L., Hartman, T. D., Hearn, J. P., Hodges, J. K., Jones, D. M., Knight, J. A., Monsalve, L., & Wildt, D. E. (1984). Artificial insemination in the Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Zoology*, *203*(2), 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1984.tb02332.x>

Morehouse, A. T., Loosen, A. E., Graves, T. A., & Boyce, M. S. (2021). The smell of success: Reproductive success related to rub behavior in brown bears. *PLoS ONE*, *16*, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247964>

Nelson, O. L., & Robbins, C. T. (2010). Cardiac function adaptations in hibernating grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*). *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, *180*(3), 465–473. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0421-x>

Nelson, R. A., Folk, G. E., Pfeiffer, E. W., Craighead, J. J., Jonkel, C. J., & Steiger, D. L. (1983). Behavior, Biochemistry, and Hibernation in Black, Grizzly, and Polar Bears. *Bears: Their Biology and Management*, *5*, 284. <https://doi.org/10.2307/3872551>

Nevin, O. T., & Gilbert, B. K. (2005). Observations of autumn courtship and breeding in Brown Bears, *Ursus arctos*, from coastal British Columbia. *Canadian Field-Naturalist*, *119*(3), 449–450. <https://doi.org/10.22621/cfn.v119i3.159>

Nicolás, M., Álvarez, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., Chamorro, C. A., Álvarez-Rodríguez, M., de Paz, P., & Anel, L. (2012a). Evaluation of the qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (Maxifreeze, Cushion Fluid Equine, and PureSperm 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa. *Theriogenology*, *77*(6), 1119–1128. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.016>

Nicolás, M., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Mata-Campuzano, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., de Paz, P., & Anel, L. (2011). Effects on brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation. *European Journal of Wildlife Research*, *57*, 259–266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10344-010-0420-y>

Nicolás, M., Álvarez, M., Anel, E., Martínez, F., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., de Paz, P., & Anel, L. (2012b). Spermatozoa recovery and post-thawing quality of brown bear ejaculates is affected for centrifugation regimes. *European Journal of Wildlife Research*, *58*(1), 77–84. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0544-8>

Nie, Y., Swaisgood, R. R., Zhang, Z., Liu, X., & Wei, F. (2012). Reproductive competition and fecal testosterone in wild male giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *66*(5), 721–730. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00265-012-1320-9>

- Nores, C., Ballesteros, F., Blanco, J. C., Garcia-Serrano, A., Herrero, J., & Palomero, G. (2010). Evidence of non-hibernation in Cantabrian brown bears. *Acta Theriologica*, *55*(3), 203–209. <https://doi.org/10.4098/j.at.0001-7051.085.2008>
- Noyce, K. V., & Garshelis, D. L. (1994). Body Size and Blood Characteristics as Indicators of Condition and Reproductive Performance in Black Bears. *Bears: Their Biology and Management*, *9*, 481. <https://doi.org/10.2307/3872736>
- Okano, T., Murase, T., Nakamura, S., Komatsu, T., Tsubota, T., & Asano, M. (2009). Normal sperm morphology and changes of semen characteristics and abnormal morphological spermatozoa among peri-mating seasons in captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Journal of Reproduction and Development*, *55*(2), 194–199. <https://doi.org/10.1262/jrd.20125>
- Ordiz, A., Støen, O.-G. G., Swenson, J. E., Kojola, I., & Bischof, R. (2008). Distance-dependent effect of the nearest neighbor: spatiotemporal patterns in brown bear reproduction. *Ecology*, *89*(12), 3327–3335. <https://doi.org/10.1890/07-1921.1>
- Otis, J. P., Sahoo, D., Drover, V. A., Yen, C. L. E., & Carey, H. V. (2011). Cholesterol and lipoprotein dynamics in a hibernating mammal. *PLoS ONE*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029111>
- Ottewell, L. (2016). Factors affecting the quantity of social interactions and aggression in captive group-housed Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*). *The Plymouth Student Scientist*, *9*(2), 29–48.
- Owen, M. A., Czekala, N. M., Swaisgood, R. R., Steinman, K., & Lindburg, D. G. (2005). Seasonal and diurnal dynamics of glucocorticoids and behavior in giant pandas. *Ursus*, *16*(2), 208–221. [https://doi.org/10.2192/1537-6176\(2005\)016\[0208:SADDOG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2192/1537-6176(2005)016[0208:SADDOG]2.0.CO;2)
- Palacín-Martínez, C., Álvarez, M., Montes-Garrido, R., Neila-Montero, M., Anel-López, L., de Paz, P., Anel, L., & Riesco, M. F. (2022). Frequency of Semen Collection Affects Ram Sperm Cryoresistance. *Animals*, *12*(12), 1492. <https://doi.org/10.3390/ani12121492>
- Palazón, S., Batet, A., Afonso, I., Camps, D., Quenette, P.-Y., Decaluwe, F., & Ruiz-Olmo, J. (2012). Space use patterns and genetic contribution of a reintroduced male Brown bear (*Ursus arctos*) in the Pyrenees between 1997 and 2011: the risk of genetic dominance of few males in reintroduced populations. *Galemys*, *24*, 93–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.7325/Galemys.2012.N11>
- Palmer, S. S., Nelson, R. A., Ramsay, M. A., Stirling, I., & Bahr, J. M. (1988). Annual Changes in Serum Sex Steroids in Male and Female Black and Polar Bears. *Biology of Reproduction*, *38*, 1044–1050. <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1044>
- Palomero, G., Ballesteros, F., Blanco, J. C., Garcia-Serrano, A., Herrero, J., & Nores, C. (2011). *Osas. El comportamiento de las osas y sus crías en la Cordillera Cantábrica* (Segunda ed). Fundación Oso Pardo y Fundación Biodiversidad.
- Palomero, G., Fernandez, A., Naves, J., Fernández, A., & Naves, J. (2006). Demografía del oso pardo en la Cordillera Cantábrica. In *Oso pardo en España*. Ministerio de Medio Ambiente. Gobierno de España.

- Palumbo, P. J., Wellik, D. L., Bagley, N. A., & Nelson, R. A. (1983). Insulin and glucagon responses in the hibernating black bear. *Bears: Their Biology and Management*, 219–296. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872552>
- Pearson, A. M., & Halloran, D. W. (1972). Hematology of the brown bear (*Ursus arctos*) from southwestern Yukon territory, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 50(3), 279–286. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/z72-038>
- Pearson, A. M. (1975). The northern interior grizzly bear *Ursus arctos* L. In *Canadian Wildlife Service Report Series* (Vol. 34). Canadian Wildlife Service.
- Peirce, K. N., & Daele, L. J. Van. (2006). Use of a garbage dump by brown bears in Dillingham, Alaska. *Ursus*, 17(2), 165–177. [https://doi.org/https://doi.org/10.2192/1537-6176\(2006\)17\[165:UOAGDB\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.2192/1537-6176(2006)17[165:UOAGDB]2.0.CO;2)
- Penteriani, V., Etchart, L., González-Bernardo, E., Hartasánchez, A., Falcinelli, D., & Ruiz-Villar, H Morales-González, A Delgado, M. (2023). Sex-, age- and time-specific visual communication in brown bears. *Journal of Mammalogy*, 104(2), 279–291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jmammal>
- Pérez, T., Naves, J., Vázquez, J. F., Fernández-gil, A., Seijas, J., Albornoz, J., Revilla, E., Delibes, M., Domínguez, A., Trinidad, P., Naves, J., Fernando, V., Fern, A., Seijas, J., Revilla, E., Delibes, M., & Dom, A. (2014). Estimating the population size of the endangered Cantabrian brown bear through genetic sampling. *Wildlife Biology*, 20(5), 300–309. <https://doi.org/10.2981/wlb.00069>
- Pérez, T., Naves, J., Vázquez, J. F., Seijas, J., Corao, A., Albornoz, J. J., & Domínguez, A. (2010). Evidence for improved connectivity between Cantabrian brown bear subpopulations. *Ursus*, 21(1), 104–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.2192/09SC018.1>
- Preston, B. T., Stevenson, I. R., Lincoln, G. A., Monfort, S. L., Pilkington, J. G., & Wilson, K. (2012). Testes size, testosterone production and reproductive behaviour in a natural mammalian mating system. *Journal of Animal Ecology*, 81(1), 296–305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01907.x>
- Preston, B. T., Stevenson, I. R., Pemberton, J. M., & Wilson, K. (2001). Dominant rams lose out by sperm depletion. *Nature*, 409(6821), 681–682. <https://doi.org/10.1038/35055617>
- Pulliainen, E., Luukkonen, Y., & Hietajärvi, T. (1984). Formation of a dominance hierarchy among wild brown bears (*Ursus arctos*). *Zeitschrift Für Säugetierkunde*, 49(1), 58–59.
- Purroy, F. J. (2008). Oso pardo—*Ursus arctos* Linnaeus, 1758. In *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Quinn, T. P., Wirsing, A. J., Smith, B., Cunningham, C. J., & Ching, J. (2014). Complementary use of motion-activated cameras and unbaited wire snares for DNA sampling reveals diel and seasonal activity patterns of brown bears (*Ursus arctos*) foraging on adult sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Zoology*, 92(10), 893–903. <https://doi.org/10.1139/cjz-2014-0114>
- Qvarnström, A., & Forsgren, E. (1998). Should females prefer dominant males? *Trends in Ecology and Evolution*, 13(12), 498–501. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01513-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01513-4)
- Rees, P. A. (2011). *An introduction to zoo biology and management*. Wiley-Blackwell.

- Reuland, C., Culbert, B. M., Fernlund Isaksson, E., Kahrl, A. F., Devigili, A., & Fitzpatrick, J. L. (2021). Male-male behavioral interactions drive social-dominance-mediated differences in ejaculate traits. *Behavioral Ecology*, *32*(1), 168–177. <https://doi.org/10.1093/beheco/araa118>
- Richardson, E. S., Davis, C., Stirling, I., Derocher, A. E., Lunn, N. J., & Malenfant, R. M. (2020). Variance in lifetime reproductive success of male polar bears. *Behavioral Ecology*, *31*(5), 1224–1232. <https://doi.org/10.1093/beheco/araa074>
- Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., Calvete, J. J., Peña Vega, F. J., & Roca, J. (2021). Seminal plasma: Relevant for fertility? *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijms22094368>
- Roth, H. U. (1983). Diel activity of a remnant population of European brown bears. *Bears: Their Biology and Management*, *5*, 223–229.
- Roth, H. U., & Huber, D. (1986). Diel Activity of Brown Bears in Plitvice Lakes National Park, Yugoslavia. *Bears: Their Biology and Management*, *6*, 177–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872822>
- Rouvinen-Watt, K., Mustonen, A. M., Conway, R., Pal, C., Harris, L., Saarela, S., Strandberg, U., & Nieminen, P. (2010). Rapid development of fasting-induced hepatic lipidosis in the American mink (*Neovison vison*): Effects of food deprivation and re-alimentation on body fat depots, tissue fatty acid profiles, hematology and endocrinology. *Lipids*, *45*(2), 111–128. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3377-4>
- Rudolfson, G., Figenschou, L., Folstad, I., Tveiten, H., & Figenschou, M. (2006). Rapid adjustments of sperm characteristics in relation to social status. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1584), 325–332. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3305>
- Ruiz-Villar, H., Morales-González, A., Bombieri, G., Zarzo-Arias, A., & Penteriani, V. (2019). Characterization of a brown bear aggregation during the hyperphagia period in the Cantabrian Mountains, NW Spain. *Ursus*, *29*(2), 93–100. <https://doi.org/10.2192/URSU-D-29-1.1>
- Sabés-Alsina, M. (2016). *Climate change and male animal reproduction: effects of heat stress and season*. Universitat Auònoma de Barcelona.
- Sahlén, V., Friebe, A., Sæbø, S., Swenson, J. E., & Støen, O. G. (2015). Den entry behavior in Scandinavian brown bears: Implications for preventing human injuries. *Journal of Wildlife Management*, *79*(2), 274–287. <https://doi.org/10.1002/jwmg.822>
- Schmid, V. S., & de Vries, H. (2013). Finding a dominance order most consistent with a linear hierarchy: an improved algorithm for the I&SI method. *Animal Behaviour*, *86*(5), 1097–1105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.08.019>
- Schroeder, M. T. (1987). Blood Chemistry, Hematology, and Condition Evaluation of Black Bears in Northcoastal California. *Bears: Their Biology and Management*, *7*, 333. <https://doi.org/10.2307/3872641>
- Schwartz, C. C., Miller, S. D., & Haroldson, M. A. (2003). Grizzly bear. In *Wild Mammals of North America: Biology, Management, and Conservation* (Second). Johns Hopkins University Press.

- Seal, U. S., Swaim, W. R., & Erickson, A. W. (1967). Hematology of the Ursidae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 22(2), 451–458. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0010-406X\(67\)90607-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0010-406X(67)90607-X)
- Shanmugam, A. A., Kumar, J. K., Selvaraj, I., & Selvaraj, V. (2011). Effects of body weight and season on serum lipid concentrations in sloth bears (*Melursus ursinus ursinus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42(3), 373–381. <https://doi.org/10.1638/2008-0213.1>
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166(4), 869–887. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>
- Shimozuru, M., Shirane, Y., Jimbo, M., Yamanaka, M., Nakanishi, M., Ishinazaka, T., Kasai, S., Nose, T., Fujimoto, Y., Tsuruga, H., Mano, T., & Tsubota, T. (2020). Male reproductive input, breeding tenure, and turnover in high-density brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) populations on the Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan. *Canadian Journal of Zoology*, 98(3), 175–185. <https://doi.org/10.1139/cjz-2019-0061>
- Simon, D., Charles, M.-A., Lahlou, N., Oppert, J.-M., Gouault-Heilmann, M., Lemort, N., Thibult, N., Joubert, E., Balkau, B., & Eschwege, E. (2001). Androgen therapy improves insulin sensitivity and decreases leptin level in healthy adult men with low plasma total testosterone. *Diabetes Care*, 24(12). <https://doi.org/10.2337/diacare.24.12.2155>
- Snider, A. P., McCarthy, K. L., Wright-Johnson, E. C., Ondrak, J. D., Oliver, W. T., Dahlen, C. R., Cushman, R. A., & Crouse, M. S. (2022). Yearling bulls have reduced sperm concentration and increased seminal plasma interleukin-8 after a 28-day breeding season. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(11), 1465–1473. <https://doi.org/10.1111/rda.14223>
- Sommer, F., Ståhlman, M., Ilkayeva, O., Arnemo, J. M., Kindberg, J., Josefsson, J., Newgard, C. B., Fröbert, O., & Bäckhed, F. (2016). The Gut Microbiota Modulates Energy Metabolism in the Hibernating Brown Bear *Ursus arctos*. *Cell Reports*, 14(7), 1655–1661. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.026>
- Soulé, M. E. (1991). Conservation: Tactics for a Constant Crisis. *Science, New Series*, 253(5021), 744–750. <https://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.253.5021.744>
- Spady, T. J., Lindburg, D. G., & Durrant, B. S. (2007). Evolution of reproductive seasonality in bears. *Mammal Review*, 37(1), 21–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2007.00096.x>
- Squires, E. L., Berndtson, W. E., Hoyer, J. H., Pickett, B. W., & Wallach, S. J. (1981). Restoration of reproductive capacity of stallions after suppression with exogenous testosterone. *Journal of Animal Science*, 53(5), 1351–1359. <https://doi.org/10.2527/jas1981.5351351x>
- Stelmock, J. J., & Frederick, C. D. (1980). Brown bear activity and habitat use, Denali National Park. *Bears: Their Biology and Management*, 6, 155–167. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872820>
- Stenhouse, G., Boulanger, J., Lee, J., Graham, K., Duval, J., & Cranston, J. (2005). Grizzly bear associations along the eastern slopes of Alberta. *Ursus*, 16(1), 31–40. [https://doi.org/10.2192/1537-6176\(2005\)016\[0031:GBAATE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2192/1537-6176(2005)016[0031:GBAATE]2.0.CO;2)

- Stenset, N. E., Lutnæs, P. N., Bjarnadóttir, V., Dahle, B., Fossum, K. H., Jigsved, P., Johansen, T., Neumann, W., Opseth, O., Rønning, O., Steyaert, S. M. J. G., Zedrosser, A., Brunberg, S., & Swenson, J. E. (2016). Seasonal and annual variation in the diet of brown bears *Ursus arctos* in the boreal forest of southcentral Sweden. *Wildlife Biology*, 22(3), 107–116. <https://doi.org/10.2981/wlb.00194>
- Stenvinkel, P., Fröbert, O., Anderstam, B., Palm, F., Eriksson, M., Bragfors-Helin, A. C., Qureshi, A. R., Larsson, T., Friebe, A., Zedrosser, A., Josefsson, J., Svensson, M., Sahdo, B., Bankir, L., & Johnson, R. J. (2013). Metabolic Changes in Summer Active and Anuric Hibernating Free-Ranging Brown Bears (*Ursus arctos*). *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072934>
- Steyaert, S. M. J. G., Endrestøl, A., Hacklaender, K., Swenson, J. E., & Zedrosser, A. (2012). The mating system of the brown bear *Ursus arctos*. *Mammal Review*, 42(1), 12–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00184.x>
- Steyaert, S. M. J. G., Swenson, J. E., & Zedrosser, A. (2014). Litter loss triggers estrus in a nonsocial seasonal breeder. *Ecology and Evolution*, 4(3), 300–310. <https://doi.org/10.1002/ece3.935>
- Steyaert, S. M. J. G., Zedrosser, A., Swaisgood, R. R., Filipczykova, E., Crudge, B., Dutta, T., Sharma, S., Ratnayeke, S., Koike, S., Leclerc, M., Derocher, A. E., Clapham, M., Spady, T., McLellan, B., Ordiz, A., Fernández-Gil, A., Delibes, M., & Swenson, J. E. (2020). Mating Strategies. In *Bears of the World: Ecology, Conservation and Management* (pp. 21–35). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108692571.003>
- Støen, O. G., Zedrosser, A., Wegge, P., & Swenson, J. E. (2006). Socially induced delayed primiparity in brown bears *Ursus arctos*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0231-z>
- Stonorov, D., & Stokes, A. W. (1972). Social behavior of the Alaska brown bear. *Bears: Their Biology and Management*, 2, 232–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872587>
- Strzeżek, J., Korda, W., Glogowski, J., Wysocki, P., & Borkowski, K. (1995). Influence of Semen-collection Frequency on Sperm Quality in Boars, with Special Reference to Biochemical Markers. *Reproduction in Domestic Animals*, 30(2), 85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00609.x>
- Taberlet, P., & Bouvet, J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings: Biological Sciences*, 255, 195–200. <https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0028>
- Thanaboonyawat, I., Chantrapanichkul, P., Petyim, S., Kaewjunun, C., Laokirkkiat, P., & Choavaratana, R. (2017). Application of testosterone supplementation in semen to improve sperm motility in asthenozoospermic males. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 296(3), 589–596. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4451-4>
- Thiel, A., Giroud, S., Hertel, A. G., Friebe, A., Devineau, O., Fuchs, B., Blanc, S., Støen, O. G., Laske, T. G., Arnemo, J. M., & Evans, A. L. (2022). Seasonality in Biological Rhythms in Scandinavian brown Bears. *Frontiers in Physiology*, 13, 518. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.785706>

- Thomas, M. L., & Simmons, L. W. (2009). Male dominance influences pheromone expression, ejaculate quality, and fertilization success in the Australian field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. *Behavioral Ecology*, 20(5), 1118–1124. <https://doi.org/10.1093/beheco/arp105>
- Tomiyasu, J., Kayano, M., Hazano, K., Matsui, M., Nemoto, Y., Naganuma, T., Koike, S., & Yamazaki, K. (2021). Associations between plasma testosterone levels and season, nutritional status, age, and body size in free-ranging male Asian black bears (*Ursus thibetanus*) in central Honshu, Japan. *General and Comparative Endocrinology*, 309, 113794. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113794>
- Tomiyasu, J., Yanagawa, Y., Sato, Y., Shimozuru, M., Nagano, M., Sasaki, M., Sakamoto, H., Matsumoto, N., Kobayashi, K., Kayano, M., Haneda, S., & Matsui, M. (2018). Testosterone-related and seasonal changes in sebaceous glands in the back skin of adult male brown bears. *Canadian Journal of Zoology*, 96(3), 205–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/cjz-2017-0028>
- Tosoni, E., Palozzi, G., Trella, E., Boitani, L., & Ciucci, P. (2011). A case of autumn mating in the Apennine brown bear (*Ursus arctos marsicanus*). *Hystrix*, 22(2), 349–353. <https://doi.org/10.4404/Hystrix-22.2-4563>
- Tryland, M., Brun, E., Derocher, A. E., Arnemo, J. M., Kierulf, P., Olberg, R. A., Wiig, O., Ølberg, R., & Wiig, Ø. (2002). Plasma Biochemical Values From Apparently Healthy Free-Ranging Polar Bears From Svalbard. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(3), 566–575. <https://doi.org/https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.3.566>
- Tsubota, T., Howell-Skalla, L., Nitta, H., Osawa, Y., Mason, J. I., Meiers, P. G., Nelson, R. A., & Bahr, J. M. (1997). Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *Reproduction*, 109(1), 21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090021>
- Tsubota, T., & Kanagawa, H. (1989). Annual Changes in Serum Testosterone Levels and Spermatogenesis in the Hokkaido Brown Bear, *Ursus ayctos yesoensis*. *Journal of the Mammalogical Society of Japan*, 14(1), 11–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.11238/jmammsocjapan1987.14.11>
- Tsubota, T., Kanagawa, H., Mano, T., & Aoi, T. (1990). Corpora Albicantia and Placental Scars in the Hokkaido Brown Bear. *Bears: Their Biology and Management*, 8, 125–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3872910>
- Tsubota, T., Kanagawa, H., Yamamoto, K., Mano, T., Yamanaka, M., Kita, I., & Tiba, T. (1992). Serum progesterone concentrations using P-EIA kit in captive and free-ranging Hokkaido brown bears, *Ursus arctos yesoensis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54(1), 1–5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1292/jvms.54.1>
- Von Der Ohe, C. G., Wasser, S. K., Hunt, K. E., & Servheen, C. (2004). Factors associated with fecal glucocorticoids in Alaskan brown bears (*Ursus arctos horribilis*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(2), 313–320. <https://doi.org/10.1086/378139>
- Walker, W. H. (2009). Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids*, 74(7), 602–607. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.11.017>

- Ware, J. V., Nelson, O. L., Robbins, C. T., & Jansen, H. T. (2011). Split parturition observed in a captive North American brown bear (*Ursus arctos*). *Zoo Biology*, *30*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/zoo.20424>
- Ware, J. V., Nelson, O. L., Robbins, C. T., Carter, P. A., Sarver, B. A. J., & Jansen, H. T. (2013). Endocrine rhythms in the brown bear (*Ursus arctos*): Evidence supporting selection for decreased pineal gland size. *Physiological Reports*, *1*(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/phy2.48>
- Watts, P. D., & Jonkel, C. (1988). Energetic Cost of Winter Dormancy in Grizzly Bear. *The Journal of Wildlife Management*, *52*(4), 654–656. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3800925>
- White, D., Berardinelli, J. G., & Aune, K. E. (1998). Reproductive characteristics of the male Grizzly Bear in the continental United States. *Ursus*, *10*(1), 497–501. <https://doi.org/10.2307/3873161>
- White, D., Berardinelli, J. G., & Aune, K. E. (2005). Seasonal differences in spermatogenesis, testicular mass and serum testosterone concentrations in the grizzly bear. *Ursus*, *16*(2), 198–207. [https://doi.org/10.2192/1537-6176\(2005\)016\[0198:SDISTM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2192/1537-6176(2005)016[0198:SDISTM]2.0.CO;2)
- Wiegand, T., Naves, J., Stephan, T., & Fernández, A. (1998). Assessing the risk of extinction for the brown bear (*Ursus arctos*) in the Cordillera Cantábrica, Spain. *Ecological Applications*, *68*(4), 539–570. [https://doi.org/https://doi.org/10.1890/0012-9615\(1998\)068\[0539:ATROEF\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1890/0012-9615(1998)068[0539:ATROEF]2.0.CO;2)
- Wildt, D. E., Meltzer, D., Chakraborty, P. K., & Bush, M. (1984). Adrenal-Testicular-Pituitary Relationships in the Cheetah Subjected to Anesthesia / Electroejaculation. *Biology of Reproduction*, *30*(3), 665–672. <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod30.3.665>
- Wildt, D. E. (1992). Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Animal Reproduction Science*, *28*(1–4), 247–257. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90111-P](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90111-P)
- Wildt, D. E., Rall, W. F., Critser, J. K., Monfort, S. L., & Seal, U. S. (1997). Genome resource banks: Living collections for biodiversity conservation. *BioScience*, *47*(10), 689–698. <https://doi.org/10.2307/1313209>
- Wingfield, J. C., Hegner, R. E., Dufty Jr, A. M., & Ball, G. F. (1990). The "challenge hypothesis": theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *The American Naturalist*, *136*(6), 829–846. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1086/285134>
- Zedrosser, A., Bellemain, E., Taberlet, P., & Swenson, J. E. (2007). Genetic estimates of annual reproductive success in male brown bears: the effects of body size, age, internal relatedness and population density. *Journal of Animal Ecology*, *76*(2), 368–375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2006.01203.x>

13. APÉNDICE A

MATERIAL COMPLEMENTARIO

Figura A1. Algoritmo para la ordenación jerárquica poblacional.

```

"""
Dominance Analysis
-----

Example of input data:
, a, v, b, h, g, w, e, k, c, y
a, *, 5, 4, 6, 3, 0, 2, 2, 3, 1
v, 0, *, 0, 0, 2, 1, 2, 0, 7, 7
b, 0, 0, *, 0, 1, 1, 1, 2, 2, 2
h, 0, 3, 0, *, 0, 0, 6, 0, 2, 5
g, 0, 0, 0, 1, *, 2, 4, 0, 3, 0
w, 2, 0, 0, 3, 0, *, 0, 0, 2, 1
e, 0, 0, 0, 0, 0, 0, *, 0, 0, 4
k, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, *, 2, 1
c, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 0, 2, *, 6
y, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, *

- Note the first comma in the first row
- Only integer values are valids
- The rows are for winners and the columns are for losers
  e.g. 'c' wins 6 times to 'y', and 'y' wins 2 times to 'c'

Read data from file using:
>>> names, data = read (filename)

the return variables are:
- names: list of individual names (first row)
- data: data matrix for compute index (rest of data)

To readable output:
>>> show(data)

Usefull functions:
- proportions
- prop_corrected_v1 (de Vries, 1998)
- prop_corrected_v2 (de Vries, 2006)
- scores
- schmid_scores (Schmid & de Vries, 2013: page 1098)

Dominance index functions:
- encounters
- relations
- cbi
- ds
- fdi
- bbi
- wins
- prop_wins
- prop_dom
- netto
- dom_sub
- isi

All return a list of values according with the order of names

```

```

    use as: a = fun(data)

Algorithm for I&SI method:
- all_perm
- de_vries (Han de Vries, 1998)
- schmid_de_vries (Schmid and de Vries, 2013)

    All return two values: best ordination and additional info,
    use as: a, b = fun(data)
"""

from copy import deepcopy
from random import randint, choice
from itertools import permutations

# read a standard file with NaN in diagonals
def read( fname ):
    """
    Read data from file using CSV format

    Return: list of individual names and matrix of data
    """
    nameid = ""
    matrix = []
    rowname = []
    with open( fname, "r" ) as fin:
        line = fin.readline()
        nameid = line.strip().split(',')[1:]
        for line in fin:
            item = line.strip().split(',')
            name = item.pop(0)
            data = [ int(i) if (i[0] >= '0' and i[0] <= '9') else '.' for i in
item ]
                data.append(name)
                matrix.append(data)
                rowname.append(name)
    if rowname != nameid:
        raise Exception("row and column names do not match!")
    return nameid, matrix

# sugar: readable presentation of data
def show( data ):
    for i in data: print(i)

''' -----
Tools
-----'''

# unique pairs (items of the upper triangular matrix)
def _pairs( n ):
    return [ (i,j) for i in range(0,n) for j in range(i+1,n)]

# sign of a numberiterations
def _sign( x ):

```

```

    if x > 0: return 1
    if x < 0: return -1
    return 0

# swap items i and j
def _swap( data, i, j ):
    for row in data: row[i], row[j] = row[j], row[i]
    data[i], data[j] = data[j], data[i]

# _move item i to j position
def _move( data, i, j ):
    for row in data: row.insert(j, row.pop(i))
    data.insert(j, data.pop(i))

# _randomize the items of data by tries
def _randomize(data, tries=1000):
    n = len(data)
    for t in range(tries):
        i = randint(0, n-1)
        j = randint(0, n-1)
        if i != j: _swap(data, i, j)

# factorial of a number
def _fact(x):
    if x <= 1: return 1
    return x * _fact(x-1)

# binomial coefficients
def _binomial(n, r):
    c = 1
    for i in range(1, min(r, n-r) + 1):
        c *= n
        c //= i
        n -= 1
    return c

''' -----
    Transformation of the data matrix
    ----- '''

def isi( data ):
    """
    Dominance index: Inconsistence and Strength of Inconsistence (I&SI)
    """
    n = len(data)
    ii = si = 0
    for (i,j) in _pairs(n):
        if data[i][j] >= data[j][i]: continue
        ii += 1
        si += abs(i-j)
    return ii, si

```

```

''' -----
    Algorithms for I&SI minimization
----- '''

def isi_min( data, mode=1, tmax=10):
    """
    I&SI dominance index using 10000 random ordinations

    Params:
    mode: 1 to Han de Vries (1998) algorithm else Schmid and de Vries (2013)
algorithm
    tmax: maximum number of iterations (default: 10)
    """
    best = deepcopy(data)
    imin, simin = isi(best)
    same = []
    # First Stage: I&SI minimization
    t = 0
    while True:
        other = []
        if mode == 1:
            data, other = de_vries(data)
        else:
            data, other = schmid_de_vries(data)
        # -----
        ii, si = isi(data)
        if (ii < imin) or (ii == imin and si < simin):
            best = deepcopy(data)
            imin, simin = ii, si
            same = deepcopy(other)
        elif (ii == imin and si == simin):
            same += [i for i in other if i not in same]
        if t > tmax: break
        _randomize(data)
        t += 1
    print(f" {t} tries")
    if mode != 1:
        print( ">> Undefined groups:")
        out = []
        for item in same:
            exist = False
            for group in out:
                if len([i for i in item if i in group]) > 0:
                    group += [i for i in item if i not in group]
                    exist = True
                    break
            if not exist: out.append(list(item))
        for i in out: print(i)
        print("")
    # Second stage: Search optimized order
    # ... not implemented
    return best, same

```

```

def all_perm( data ):
    """
    Minimal I&SI using all possible permutations

    Print: total number of permutations
    Print: I&SI values of the output ordinations

    Return: best ordination, other I&SI equivalent ordinations

    Use:
    best, more = all_perm(data)
    for i in best: print(i)
    for j in more: print(j)
    """
    n = len(data)
    p = _fact(n)
    print(f"{p} possibilities to compute")
    if n > 10:
        print("Too many: not calculated!")
        return [], []
    best = deepcopy(data)
    imin, simin = isi(best)
    more = []
    t = 0
    for item in permutations(range(n)):
        newdata = []
        for i in item:
            newdata.append( [data[i][j] for j in item] + [data[i][-1]] )
        ii, si = isi(newdata)
        if (ii < imin) or (ii == imin and si < simin):
            best = deepcopy(newdata)
            imin, simin = ii, si
            more = [ [name[-1] for name in best] ]
        elif (ii == imin and si == simin):
            more.append([name[-1] for name in newdata])
        t += 1
    print(f"{t} ordinations")
    print(f"best ordination: I = {imin} SI = {simin}")
    return best, more

def de_vries( data, tmax=10000 ):
    """
    I&SI algorithm from Han de Vries, 1998

    Return: best ordination, other I&SI equivalent ordinations
            without consider SI increment

    Use:
    best, more = de_vries(data)
    for i in best: print(i)
    for j in more: print(j)
    """

```

```

n = len(data)
data = deepcopy(data)
# First step (Appendix 1)
t = 0
best = deepcopy(data)
imin, simin = isi(best)
while True:
    while True:
        stop = True
        for (i,j) in _pairs(n):
            if data[i][j] >= data[j][i]: continue
            net = [ _sign(data[j][k] - data[k][j]) for k in range(i,j) ]
            if sum(net) > 0:
                _swap(data, i, j)
                stop = False
        if stop: break
    ii, si = isi(data)
    if (ii < imin) or (ii == imin and si < simin):
        best = deepcopy(data)
        imin, simin = ii, si
        stop = False
    else:
        t += 1
        if (simin > 0) and (t < tmax):
            for (i,j) in _pairs(n):
                if data[i][j] >= data[j][i]: continue
                _swap(data, i, randint(i+1,n-1))
                stop = False
                break
            else:
                stop = True # unnecessary: just True from out of first loop
        if stop: break
    imin, simin = isi(best)
    data = deepcopy(best)
# Second step (page 831)
more = [ [name[-1] for name in best] ]
for i in range(1,n):
    j = i - 1
    if best[i][j] != best[j][i]: continue
    dsi = dsj = 0
    for k in range(0,n):
        if i != k: dsi += _sign(best[i][k] - best[k][i])
        if j != k: dsj += _sign(best[j][k] - best[k][j])
    if dsi <= dsj: continue
    _swap(best, i, j)
    ii, si = isi(best)
    more.append( [name[-1] for name in best] )
    if (ii < imin) or (ii == imin and si < simin):
        imin, simin = ii, si
        more = [ [name[-1] for name in best] ]
    else:
        best = deepcopy(data)
print(t, end="..", flush=True) # minimizing tries
#print(f'{t} minimizing tries')

```



```

return best, more

def schmid_de_vries( data ):
    """
    I&SI algorithm modified from Schmid and de Vries, 2013

    Return: best ordination, interchangeable individuals

    Use:
    best, more = schmid_de_vries(data)
    for i in best: print(i)
    for j in more: print(j)
    """
    n = len(data)
    data = deepcopy(data)
    # From approach 6, page 1100
    t = 0
    while True:
        # simple scores
        ss = [ [0]*n for j in range(n) ]
        for (i,j) in _pairs(n):
            if data[i][j] == data[j][i]: continue
            ss[i][j] = ss[j][i] = 1 if data[i][j] > data[j][i] else -1
        # looking for minimum iI
        mn = (0, [])
        for i in range(n):
            for j in range(n):
                if i == j: continue
                sm = sum(ss[i][j:i+1]) if j < i else sum(ss[i][i:j+1])
                if sm > mn[0]: continue
                if sm < mn[0]: mn = (sm, [])
            mn[1].append((i,j))
        # decisions
        imin, ij = mn
        if len(ij) == 0: # no more changes (loop exit)
            other = []
            break
        if len(ij) == 1: # only one change
            i,j = ij[0]
        else: # many changes, select by SI increment
            si = []
            for (a,b) in ij:
                if a == b:
                    inc = 0
                else:
                    z = abs(a - b)
                    sg = 1 if a < b else -1
                    if a < b:
                        r1 = range(a)
                        r2 = range(b+1,n)
                        r3 = range(a+1,b+1)
                    else: # b < a
                        r1 = range(b)

```

```

        r2 = range(a+1,n)
        r3 = range(b,a)
        ssx = [ ss[i][a] for i in r1 if ss[i][a] == -1 ]
        ssv = [ ss[a][j] for j in r2 if ss[a][j] == -1 ]
        ssu = [ ss[i][j] for i in r1 for j in r3 if ss[i][j] == -1
]
        ssw = [ ss[i][j] for i in r3 for j in r2 if ss[i][j] == -1
]
        tmp = [ ss[a][j] for j in r3 ]
        ssy = [ y*(z-i) if y == sg else y*(i+1) for (i,y) in
enumerate(tmp) ]
        inc = sum(ssy) + sg * (len(ssw)-len(ssu) + z * (len(ssx) -
len(ssv)))
        si.append( (inc, a, b) )
        simin = min([i[0] for i in si])
        if imin == 0 and simin >= 0: # any possible i or si decrement (loop
exit)
            other = [ (i,j) for (sm,i,j) in si if sm == 0 ]
            break
        else:
            i,j = choice([(i,j) for (sm,i,j) in si if sm == simin])
        t += 1
        _move(data, i, j)
    print("", end=".", flush=True) # minimizing _movements
    #print(t, end="..", flush=True) # minimizing _movements
    #print(f'{t} minimizing _movements')
    alternate = [ [ data[j][-1] for j in item] for item in other]
    return data, alternate

```

Figura A2. Número total de osos en el área de observación, por quincenas, al comienzo (8 a.m.) y final (10 a.m.) de cada día de observación incluida en el estudio de los ritmos anuales en el comportamiento (N = 314) (media \pm SEM).

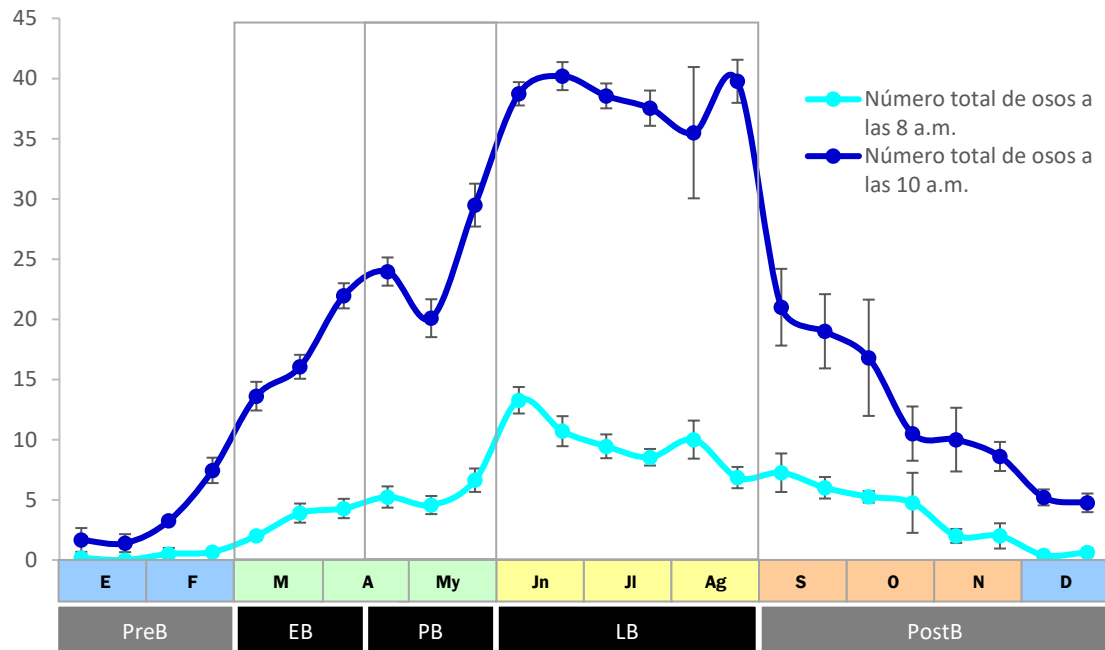


Tabla A1. Variaciones anuales en el comportamiento asociadas a la estacionalidad reproductiva para la población de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. $ICS = (S / (M+H)) / (M / H)$. $ICA_M = A_M / M$; $ICA_{m-m} = A_{m-m} / M$. M : $ICJ_M = J_M / M$; $ICJ_{m-m} = J_{m-m} / M$. S : Número de montas; M : Número de machos; H : Número de hembras. A_M : Número de interacciones agresivas en las que participa al menos un macho; A_{m-m} : Número de interacciones agresivas en las que los dos participantes son machos; J_M = Número de interacciones de juego en las que participa al menos un macho; J_{m-m} = Número de interacciones de juego en las que los dos participantes son machos. M y H se refieren al número de individuos presentes en el área de estudio a las 10 a.m. S , A_M , A_{m-m} , J_M , y J_{m-m} se refieren al número de interacciones sucedidas en el área de estudio entre las 8 a.m. y las 10 a.m. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

		PreB	EB	PB	LB	PostB
Número total de osos	N	24	57	76	118	39
	Media ± SEM	4,04 ± 0,73 ^a	17,25 ± 0,77 ^b	24,75 ± 0,98 ^c	38,66 ± 0,57 ^d	11,33 ± 1,26 ^e
	Mín. – Máx.	0 - 14	3 - 32	5 - 45	23 - 53	2 - 35
Número de machos (M)	N	23	56	58	82	32
	Media ± SEM	3,26 ± 0,64 ^a	11,32 ± 0,43 ^b	12,71 ± 0,61 ^b	17,23 ± 0,41 ^c	5,47 ± 0,76 ^d
	Mín. – Máx.	0 - 9	3 - 20	4 - 23	8 - 25	0 - 16
Índice de Comportamiento sexual (ICS)	N	7	51	58	82	28
	Media ± SEM	0,00 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,01 ^b	0,35 ± 0,03 ^c	0,08 ± 0,01 ^b	0,00 ± 0,00 ^a
	Mín. – Máx.	0,00 - 0,00	0,00 - 0,33	0,00 - 0,99	0,00 - 0,41	0,00 - 0,00
Índice de comportamiento agresivo de machos (ICA_M)	N	17	56	58	82	29
	Media ± SEM	0,03 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,02 ^b	0,55 ± 0,04 ^c	0,39 ± 0,02 ^d	0,11 ± 0,02 ^{ab}
	Mín. – Máx.	0,00 - 0,33	0,00 - 0,57	0,00 - 1,12	0,05 - 1,06	0,00 - 0,4
Índice de comportamiento agresivo entre machos (ICA_{m-m})	N	17	56	58	82	29
	Media ± SEM	0,03 ± 0,02 ^{ab}	0,07 ± 0,01 ^{ac}	0,27 ± 0,03 ^d	0,11 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,01 ^b
	Mín. – Máx.	0,00 - 0,33	0,00 - 0,25	0,00 - 0,76	0,00 - 0,43	0,00 - 0,17
Índice de comportamiento de juego de machos (ICJ_M)	N	17	56	58	82	29
	Media ± SEM	0,28 ± 0,10 ^{ab}	0,38 ± 0,05 ^a	0,04 ± 0,01 ^c	0,22 ± 0,02 ^b	0,29 ± 0,09 ^{ab}
	Mín. – Máx.	0,00 - 1,50	0,00 - 1,44	0,00 - 0,22	0,00 - 0,58	0,00 - 2,00
Índice de comportamiento de juego entre machos (ICJ_{m-m})	N	17	56	58	82	29
	Media ± SEM	0,27 ± 0,10 ^{ab}	0,28 ± 0,04 ^a	0,02 ± 0,01 ^c	0,19 ± 0,01 ^b	0,26 ± 0,08 ^{ab}
	Mín. – Máx.	0,00 - 1,50	0,00 - 1,11	0,00 - 0,22	0,00 - 0,57	0,00 - 2,00

Tabla A2. Variaciones anuales de los parámetros morfológicos de los machos adultos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

		PreB	EB	PB	LB	PostB
Peso corporal (kg)	N	8	58	105	103	17
	Media ± SEM	325,3 ± 7,9 ^{ac}	296,1 ± 5,0 ^a	264,6 ± 4,1 ^b	256,2 ± 3,6 ^b	336,4 ± 11,0 ^c
	Mín. – Máx.	291,0 - 350,0	206,0 - 360,0	138,0 - 365,0	185,0 - 354,0	243,0 - 442,5
Volumen testicular (cm ³)	N	8	55	89	93	15
	Media ± SEM	54,0 ± 8,2 ^a	78,7 ± 3,1 ^{bc}	83,1 ± 2,6 ^b	72,6 ± 2,4 ^a	65,9 ± 6,1 ^{ac}
	Mín. – Máx.	13,2 - 76,0	37,3 - 151,2	36,4 - 162,8	26,4 - 124,5	26,1 - 100,0

Tabla A3. Variaciones anuales de los parámetros del hemograma y bioquímica sanguínea de los machos adultos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

		PreB	EB	PB	LB	PostB
Hematíes ($10^6/\mu\text{l}$)	N	3	18	36	48	6
	Media \pm SEM	6,6 \pm 0,7 ^a	6,6 \pm 0,3 ^a	6,9 \pm 0,2 ^a	6,8 \pm 0,2 ^a	5,9 \pm 0,7 ^a
	Mín. – Máx.	6,0 - 8,0	3,5 - 9,4	5,1 - 9,9	4,7 - 10,9	2,9 - 7,7
Hemoglobina (g/dL)	N	3	18	36	48	6
	Media \pm SEM	16,4 \pm 1,2 ^{ab}	17,3 \pm 0,7 ^a	17,1 \pm 0,5 ^{ab}	16,8 \pm 0,4 ^{ab}	14,7 \pm 1,7 ^b
	Mín. – Máx.	14,8 - 18,7	11,9 - 24,1	13,2 - 25,3	12,1 - 26,8	7,4 - 19,2
Hematocrito (%)	N	3	18	36	48	6
	Media \pm SEM	45,2 \pm 4,4 ^a	46,7 \pm 2,0 ^a	48,7 \pm 1,3 ^a	46,1 \pm 1,5 ^a	41,1 \pm 5,1 ^a
	Mín. – Máx.	40,5 - 54,0	27,9 - 62,7	32,2 - 67,9	27,1 - 73,5	19,2 - 53,4
Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)	N	3	18	31	39	6
	Media \pm SEM	343 \pm 34,6 ^{ab}	403,5 \pm 34,9 ^a	370,5 \pm 16,4 ^a	363,6 \pm 25,2 ^a	231,0 \pm 38,8 ^b
	Mín. – Máx.	283,0 - 403,0	273,0 - 940,0	211,0 - 656,0	24,0 - 798,0	102,0 - 325,0
Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	N	3	18	36	48	6
	Media \pm SEM	8,7 \pm 1,3 ^{ab}	11,1 \pm 0,9 ^{ab}	12,3 \pm 1,1 ^a	8,9 \pm 0,4 ^b	9,0 \pm 1,5 ^{ab}
	Mín. – Máx.	6,2 - 10,8	6,3 - 20,6	4,2 - 43,0	2,3 - 15,9	5,7 - 15,2
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	N	3	18	25	31	6
	Media \pm SEM	5,9 \pm 0,6 ^{ab}	8,1 \pm 0,9 ^{ab}	9,1 \pm 0,7 ^a	6,5 \pm 0,3 ^b	6,1 \pm 1,3 ^b
	Mín. – Máx.	4,8 - 6,8	4,3 - 16,9	2,5 - 18,1	2,7 - 10,5	3,1 - 11,2
Monocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	N	3	18	25	31	6
	Media \pm SEM	0,3 \pm 0,1 ^a	0,5 \pm 0,1 ^a	0,8 \pm 0,1 ^b	0,4 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,2 ^{ab}
	Mín. – Máx.	0,1 - 0,4	0,0 - 1,2	0,0 - 1,9	0,1 - 1,0	0,0 - 1,2
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	N	3	18	25	31	6
	Media \pm SEM	1,6 \pm 0,9 ^a	0,9 \pm 0,2 ^a	0,3 \pm 0,1 ^b	1,1 \pm 0,1 ^a	0,9 \pm 0,2 ^{ab}
	Mín. – Máx.	0,4 - 3,5	0,0 - 3,1	0,0 - 1,5	0,1 - 2,9	0,2 - 1,8
Linfocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	N	3	18	29	38	6
	Media \pm SEM	0,9 \pm 0,3 ^{ab}	1,5 \pm 0,2 ^a	1,3 \pm 0,1 ^{ab}	1,1 \pm 0,1 ^b	1,6 \pm 0,4 ^{ab}
	Mín. – Máx.	0,2 - 1,4	0,4 - 3,1	0,4 - 2,9	0,4 - 2,7	0,5 - 3,1
Basófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	N	3	18	25	31	6
	Media \pm SEM	0,0 \pm 0,0 ^{ab}	0,0 \pm 0,01 ^{ab}	0,0 \pm 0,01 ^a	0,0 \pm 0,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^{ab}
	Mín. – Máx.	0,0 - 0,0	0,0 - 0,07	0,0 - 0,08	0,0 - 0,0	0,0 - 0,0
Proteínas totales (g/dL)	N	9	49	72	90	17
	Media \pm SEM	7,4 \pm 0,3 ^{ab}	7,6 \pm 0,1 ^{ab}	7,4 \pm 0,1 ^a	7,7 \pm 0,1 ^b	8,1 \pm 0,1 ^b
	Mín. – Máx.	5,9 - 8,3	5,5 - 10,1	4,4 - 9,2	4,9 - 9,8	7,4 - 9,1
Glucosa (mg/dL)	N	9	47	65	64	17
	Media \pm SEM	141,4 \pm 14,6 ^{ab}	149,5 \pm 5,0 ^a	131,1 \pm 5,0 ^b	104,9 \pm 3,7 ^c	130,5 \pm 7,3 ^{ab}
	Mín. – Máx.	83,0 - 196,5	76,0 - 222,0	69,8 - 299,3	64,2 - 197,7	78,9 - 192,0
Colesterol (mg/dL)	N	9	50	72	90	17
	Media \pm SEM	241,7 \pm 13,7 ^{ab}	241,5 \pm 8,3 ^a	222,8 \pm 6,0 ^b	290,7 \pm 5,3 ^c	324,1 \pm 11,9 ^d
	Mín. – Máx.	154,3 - 288,0	72,6 - 362,0	91,6 - 353,2	154,1 - 454,0	250,0 - 425,6

Tabla A4. Variaciones anuales de los niveles séricos hormonales de los machos adultos de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. “PreB”: enero y febrero; “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto; “PostB”: septiembre a diciembre. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

		PreB	EB	PB	LB	PostB
Testosterona (ng/mL)	N	8	56	88	90	20
	Media \pm SEM	0,8 \pm 0,4 ^{ab}	6,4 \pm 1,1 ^a	12,1 \pm 1,1 ^c	1,0 \pm 0,2 ^b	0,5 \pm 0,3 ^b
	Mín. – Máx.	0,0 - 3,6	0,0 - 30,0	0,0 - 30,0	0,0 - 11,4	0,0 - 6,9
Cortisol (μ g/dL)	N	6	51	74	88	13
	Media \pm SEM	3,6 \pm 0,9 ^a	3,6 \pm 0,7 ^a	3,4 \pm 0,6 ^a	3,8 \pm 0,5 ^a	3,7 \pm 0,7 ^a
	Mín. – Máx.	0,8 - 7,1	0,3 - 23,9	0,1 - 27,3	0 - 16,6	1,1 - 10,6

Tabla A5. Variaciones anuales de los parámetros seminales de la fracción rica (N = 188) de los eyaculados obtenidos de osos pardos del Parque de la Naturaleza de Cabárceno mediante electroeyaculación durante la época reproductiva (marzo-agosto) según el periodo de estudio. “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto. Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

		EB	PB	LB	Total
	N	45	76	59	180
pH	Media ± SEM	8,3 ± 0,1 ^a	8,3 ± 0,0 ^a	8,2 ± 0,1 ^a	8,3 ± 0,0
	Mín. – Máx.	6,8 – 9,0	7,4 – 9,1	6,7 – 9,3	6,7 – 9,3
	N	37	73	55	165
Osmolalidad (mOsm/kg)	Media ± SEM	293,3 ± 3,2 ^a	295,1 ± 2,4 ^a	299,2 ± 3,8 ^a	296,1 ± 1,8
	Mín. – Máx.	241,0 – 319,0	208,0 – 361,0	241,0 – 409,0	208,0 – 409,0
	N	48	80	60	188
Volumen (mL)	Media ± SEM	1,5 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,1 ^{ab}	2,1 ± 0,2 ^b	1,9 ± 0,1
	Mín. – Máx.	0,3 – 5,5	0,5 – 6,5	0,3 – 10,5	0,25 – 10,5
	N	48	80	60	188
Concentración (spz x 10⁶/mL)	Media ± SEM	328,1 ± 46,4 ^a	273,6 ± 28,8 ^a	295,9 ± 40,2 ^a	294,3 ± 21,2
	Mín. – Máx.	0,0 – 1417,5	6,1 – 1304,3	4,7 – 1123,7	0,0 – 1417,5
	N	48	80	60	188
Producción (spz x 10⁶)	Media ± SEM	607,0 ± 135,9 ^a	466,9 ± 43,6 ^a	605,5 ± 103,0 ^a	545,0 ± 50,8
	Mín. – Máx.	0,0 – 5321,0	8,5 – 1522,3	3,8 – 3751,3	0,0 – 5321,0
	N	42	74	54	170
MI (%)	Media ± SEM	71,2 ± 2,6 ^a	75,7 ± 1,9 ^a	75,8 ± 2,4 ^a	74,6 ± 1,3
	Mín. - Máx.	24,7 - 99,5	24,0 - 97,7	32,0 - 97,6	24,0 - 99,5
	N	42	74	54	170
MP (%)	Media ± SEM	43,2 ± 3,0 ^a	45,4 ± 2,2 ^a	47,3 ± 2,7 ^a	45,5 ± 1,5
	Mín. - Máx.	5,1 - 90,8	1,4 - 87,6	4,3 - 86,5	1,4 - 90,8
	N	42	74	54	170
VAP (µm/s)	Media ± SEM	92,7 ± 3,6 ^a	100,5 ± 2,7 ^{ab}	105,5 ± 3,6 ^b	100,2 ± 1,9
	Mín. - Máx.	45,0 - 153,1	37,4 - 156,2	41,9 - 146,9	37,4 - 156,2
	N	42	74	54	170
VSL (µm/s)	Media ± SEM	68,0 ± 3,7 ^a	73,8 ± 2,8 ^{ab}	82,1 ± 3,7 ^b	75,0 ± 2,0
	Mín. - Máx.	32,5 - 135,8	14,7 - 140,2	19,2 - 136,4	14,7 - 140,2
	N	42	74	54	170
LIN (%)	Media ± SEM	47,6 ± 1,5 ^a	48,5 ± 1,1 ^a	52,9 ± 1,3 ^b	49,6 ± 0,7
	Mín. - Máx.	27,4 - 66,2	26,8 - 67,6	28,3 - 73,4	26,8 - 73,4
	N	42	74	54	170
ALH (µm)	Media ± SEM	5,0 ± 0,2 ^a	5,1 ± 0,2 ^a	5,0 ± 0,2 ^a	5,0 ± 0,1
	Mín. - Máx.	2,0 - 10,4	1,8 - 7,8	2,7 - 8,4	1,8 - 10,4
	N	47	77	54	178
iACRO (%)	Media ± SEM	73,8 ± 2,2 ^a	81,6 ± 1,2 ^b	79,8 ± 1,5 ^b	79,0 ± 0,9
	Mín. - Máx.	31,0 - 98,9	46,0 - 98,6	41,0 - 98,4	31,0 - 98,9
	N	34	56	50	140
VIAB (%)	Media ± SEM	72,8 ± 2,7 ^a	77,5 ± 1,8 ^a	77,8 ± 1,3 ^a	76,5 ± 1,1
	Mín. - Máx.	30,0 - 91,0	10,0 - 93,0	53,0 - 94,0	10,0 - 94,0
	N	30	45	46	121
MIT (%)	Media ± SEM	68,8 ± 4,6 ^a	73,6 ± 2,8 ^a	71,1 ± 3,5 ^a	71,5 ± 2,0
	Mín. - Máx.	0,0 - 98,0	14,0 - 98,0	11,0 - 98,0	0,0 - 98,0

MI (%) = Espermatozoides móviles totales; MP (%) = Espermatozoides con movimiento progresivo; VAP (µm/s) = Velocidad media; VSL (µm/s) = Velocidad rectilínea; LIN (%) = Linealidad; ALH (µm) = Amplitud del movimiento lateral de la cabeza; iACRO = Espermatozoides viables con acrosomas intactos (PI-/PNA-); VIAB = Espermatozoides viables (SYBR14+/PI-); MIT = Espermatozoides con alto potencial de membrana (JC1+). Letras distintas (a, b) en el mismo parámetro indican diferencias significativas entre periodos ($p < 0,05$).

Tabla A6. pH de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular ≤ 60 cm³, VOL2 = Volumen testicular >60 y ≤ 80 cm³ y VOL3 = Volumen testicular >80 cm³; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea <1 ng/mL, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea >10 ng/mL; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD				SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GE_1	52	8,3 \pm 0,1	7,4 - 9,1	TOTAL	VOL1	18	8,4 \pm 0,1	7,0 - 8,9
	GE_2	105	8,2 \pm 0,0	6,7 - 9,0		VOL2	48	8,4 \pm 0,1	7,8 - 9,3
	GE_3	13	8,3 \pm 0,1	7,8 - 8,8		VOL3	83	8,1 \pm 0,0	6,7 - 9,2
EB	GE_1	17	8,3 \pm 0,1	7,4 - 8,9	EB	VOL1	6	8,5 \pm 0,1	8,1 - 8,9
	GE_2	21	8,3 \pm 0,1	6,8 - 9,0		VOL2	13	8,4 \pm 0,1	7,8 - 9,0
	GE_3	3	8,0 \pm 0,1	7,8 - 8,3		VOL3	18	8,1 \pm 0,1	6,8 - 8,7
PB	GE_1	20	8,4 \pm 0,1	7,7 - 9,1	PB	VOL1	6	8,5 \pm 0,1	8,1 - 8,9
	GE_2	48	8,2 \pm 0,0	7,4 - 8,8		VOL2	17	8,4 \pm 0,1	7,9 - 9,1
	GE_3	5	8,4 \pm 0,1	7,9 - 8,8		VOL3	37	8,2 \pm 0,1	7,6 - 8,8
LB	GE_1	15	8,3 \pm 0,1	7,4 - 9,0	LB	VOL1	6	8,1 \pm 0,3	7,0 - 8,9
	GE_2	36	8,1 \pm 0,1	6,7 - 9,0		VOL2	18	8,4 \pm 0,1	7,9 - 9,3
	GE_3	5	8,5 \pm 0,1	8,3 - 8,6		VOL3	28	8,2 \pm 0,1	6,7 - 9,2

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA				SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GTES_1	59	8,3 \pm 0,1	6,7 - 9,3	TOTAL	Dm	11	8,2 \pm 0,1	7,6 - 8,7
	GTES_2	77	8,3 \pm 0,1	6,8 - 9,2		Sb	22	8,2 \pm 0,1	7,7 - 8,8
	GTES_3	43	8,3 \pm 0,1	7,4 - 9,1		Xd	21	8,2 \pm 0,1	6,7 - 8,9
EB	GTES_1	6	8,3 \pm 0,1	7,8 - 8,6	EB	Dm	2	8,1 \pm 0,3	7,8 - 8,5
	GTES_2	30	8,3 \pm 0,1	6,8 - 9,0		Sb	7	8,2 \pm 0,1	8,0 - 8,5
	GTES_3	9	8,1 \pm 0,1	7,4 - 8,5		Xd	3	8,2 \pm 0,4	7,6 - 9,0
PB	GTES_1	7	8,4 \pm 0,1	8,0 - 8,7	PB	Dm	4	8,1 \pm 0,2	7,6 - 8,4
	GTES_2	34	8,2 \pm 0,1	7,4 - 9,0		Sb	13	8,2 \pm 0,1	7,6 - 8,8
	GTES_3	34	8,3 \pm 0,1	7,6 - 9,1		Xd	12	8,2 \pm 0,1	7,7 - 8,7
LB	GTES_1	46	8,3 \pm 0,1	6,7 - 9,2	LB	Dm	5	8,3 \pm 0,2	7,7 - 8,7
	GTES_2	13	8,2 \pm 0,2	7 - 9,2		Sb	2	8,4 \pm 0,3	8,2 - 8,7
						Xd	6	8,1 \pm 0,3	6,7 - 8,7

Tabla A7. Osmolalidad (mOsm/kg) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular ≤60 cm³, VOL2 = Volumen testicular >60 y ≤80 cm³ y VOL3 = Volumen testicular >80 cm³; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea <1 ng/mL, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea >10 ng/mL; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD					SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR				
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.			N	Media ± SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GE_1	49	302,0 ± 3,5	255,0 - 409,0	TOTAL	VOL1	18	300,6 ± 7,9	241,0 - 409,0
	GE_2	95	291,1 ± 2,4	208,0 - 361,0		VOL2	44	298 ± 2,6	255,0 - 326,0
	GE_3	13	304,4 ± 4,1	280,0 - 331,0		VOL3	73	295,5 ± 2,5	241,0 - 376,0
EB	GE_1	15	293,9 ± 4,8	255,0 - 317,0	EB	VOL1	6	294,3 ± 9,0	257,0 - 317,0
	GE_2	16	287,3 ± 5,4	241,0 - 319,0	VOL2	9	300,3 ± 6,2	255,0 - 319,0	
	GE_3	3	306,3 ± 0,3	306,0 - 307,0	VOL3	15	291,5 ± 5,2	241,0 - 307,0	
PB	GE_1	19	298,7 ± 1,6	285,0 - 309,0	PB	VOL1	6	297,0 ± 4,4	280,0 - 307,0
	GE_2	47	292,7 ± 3,6	208,0 - 361,0	VOL2	17	300,0 ± 3,6	265,0 - 326,0	
	GE_3	5	301,8 ± 7,0	280,0 - 322,0	VOL3	34	294,7 ± 2,6	245,0 - 314,0	
LB	GE_1	15	314,4 ± 9,6	260,0 - 409,0	LB	VOL1	6	310,5 ± 22,5	241,0 - 409,0
	GE_2	32	290,7 ± 4,0	241,0 - 354,0	VOL2	18	294,9 ± 4,5	260,0 - 319,0	
	GE_3	5	305,8 ± 9,0	282,0 - 331,0	VOL3	24	299,0 ± 5,9	243,0 - 376,0	

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA					SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA				
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.			N	Media ± SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GTES_1	52	300,9 ± 3,7	259,0 - 409,0	TOTAL	Dm	8	285,6 ± 3,7	265,0 - 299,0
	GTES_2	71	294,0 ± 2,7	208,0 - 361,0		Sb	21	294,9 ± 4,8	256,0 - 361,0
	GTES_3	42	293,7 ± 2,8	245,0 - 326,0		Xd	16	294,0 ± 4,6	259,0 - 331,0
EB	GTES_1	4	296,5 ± 5,4	283,0 - 309,0	EB	Dm	1	299,0	
	GTES_2	25	295,6 ± 4,0	241,0 - 319,0	Sb	6	296,8 ± 4,4	283,0 - 307,0	
	GTES_3	8	284,8 ± 7,6	251,0 - 306,0	Xd	1	281,0		
PB	GTES_1	5	292,4 ± 8,9	259,0 - 308,0	PB	Dm	4	281,5 ± 6,3	265,0 - 295,0
	GTES_2	34	294,8 ± 4,1	208,0 - 361,0	Sb	13	296,7 ± 7,3	256,0 - 361,0	
	GTES_3	34	295,9 ± 2,9	245,0 - 326,0	Xd	10	296,0 ± 5,0	259,0 - 314,0	
LB	GTES_1	43	302,3 ± 4,4	260,0 - 409,0	LB	Dm	3	286,7 ± 2,9	282,0 - 292,0
	GTES_2	12	288,2 ± 7,1	241,0 - 313,0	Sb	2	277,5 ± 7,5	270,0 - 285,0	
					Xd	5	292,6 ± 11,4	267,0 - 331,0	

Tabla A8. Volumen (mL) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular ≤ 60 cm³, VOL2 = Volumen testicular >60 y ≤ 80 cm³ y VOL3 = Volumen testicular >80 cm³; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea <1 ng/mL, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea >10 ng/mL; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD					SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR				
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.			N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GE_1	56	2,0 \pm 0,2	0,5 - 10,5	TOTAL	VOL1	19	1,3 \pm 0,2	0,5 - 3,5
	GE_2	109	2,0 \pm 0,1	0,3 - 6,5		VOL2	50	1,5 \pm 0,1	0,3 - 4,0
	GE_3	13	1,8 \pm 0,3	0,8 - 4,0		VOL3	87	2,3 \pm 0,2	0,6 - 10,5
EB	GE_1	19	1,8 \pm 0,3	0,8 - 5,5	EB	VOL1	7	1,1 \pm 0,1	0,8 - 1,7
	GE_2	22	1,5 \pm 0,2	0,3 - 3,2		VOL2	13	1,0 \pm 0,2	0,3 - 2,2
	GE_3	3	1,3 \pm 0,1	1,0 - 1,4		VOL3	19	2,0 \pm 0,2	0,7 - 4,0
PB	GE_1	22	1,9 \pm 0,3	0,5 - 5,0	PB	VOL1	6	1,3 \pm	0,5 - 3,5
	GE_2	50	2,1 \pm 0,2	0,5 - 6,5		VOL2	19	1,4 \pm 0,2	0,6 - 3,5
	GE_3	5	1,7 \pm 0,5	0,8 - 3,5		VOL3	39	2,4 \pm 0,2	0,7 - 6,5
LB	GE_1	15	2,2 \pm 0,6	0,5 - 10,5	LB	VOL1	6	1,6 \pm 0,2	1,1 - 2,6
	GE_2	37	2,2 \pm 0,2	0,4 - 6,5		VOL2	18	1,9 \pm 0,3	0,3 - 4,0
	GE_3	5	2,1 \pm 0,5	0,8 - 4,0		VOL3	29	0,2 \pm 0,4	0,6 - 10,5

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA					SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA				
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.			N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GTES_1	61	2,1 \pm 0,2	0,3 - 10,5	TOTAL	Dm	13	1,8 \pm 0,2	0,8 - 3,5
	GTES_2	81	1,9 \pm 0,2	0,3 - 6,5		Sb	24	2,6 \pm 0,3	0,5 - 5,6
	GTES_3	45	1,7 \pm 0,1	0,5 - 4,0		Xd	25	2,3 \pm 0,3	0,8 - 6,5
EB	GTES_1	6	1,8 \pm 0,3	0,9 - 2,7	EB	Dm	2	2,1 \pm 0,1	2,0 - 2,2
	GTES_2	32	1,5 \pm 0,2	0,3 - 5,5		Sb	8	2,6 \pm 0,6	0,9 - 5,5
	GTES_3	10	1,4 \pm 0,3	0,7 - 3,2		Xd	5	2,2 \pm 0,4	1,1 - 3,2
PB	GTES_1	8	2,3 \pm 0,6	0,8 - 5,0	PB	Dm	5	1,9 \pm 0,5	0,8 - 3,5
	GTES_2	36	2,2 \pm 0,2	0,5 - 6,5		Sb	14	2,6 \pm 0,4	0,5 - 5,6
	GTES_3	35	1,8 \pm 0,1	0,5 - 4,0		Xd	14	2,2 \pm 0,4	0,8 - 6,5
LB	GTES_1	47	2,1 \pm 0,2	0,3 - 10,5	LB	Dm	6	1,6 \pm 0,3	0,8 - 3,0
	GTES_2	13	2,0 \pm 0,4	0,6 - 5,8		Sb	2	2,5 \pm 0,0	2,5 - 2,5
						Xd	6	2,4 \pm 0,8	1,0 - 6,5

Tabla A9. Concentración espermática (spz x 10⁶/mL) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular ≤60 cm³, VOL2 = Volumen testicular >60 y ≤80 cm³ y VOL3 = Volumen testicular >80 cm³; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea <1 ng/mL, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea >10 ng/mL; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD					SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR				
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.			N	Media ± SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GE_1	56	406,8 ± 43,9	8,4 - 1304,3	TOTAL	VOL1	19	243,5 ± 44,2	12,8 - 730,1
	GE_2	109	221,7 ± 21,3	0,0 - 1043,0		VOL2	50	287,6 ± 46,7	0,0 - 1417,5
	GE_3	13	296,7 ± 804,0	4,7 - 836,1		VOL3	87	344,2 ± 32,3	9,2 - 1275,6
EB	GE_1	19	450,1 ± 72,0	12,8 - 1275,6	EB	VOL1	7	232,0 ± 55,9	12,8 - 392,5
	GE_2	22	176,7 ± 36,3	0,0 - 521,1	VOL2	13	316,1 ± 109,2	0,0 - 1417,5	
	GE_3	3	447,9 ± 194,2	240,1 - 836,1	VOL3	19	361,6 ± 75,7	9,2 - 1275,6	
PB	GE_1	22	356,5 ± 65,1	53,9 - 1304,3	PB	VOL1	6	133,0 ± 26,0	53,9 - 201,6
	GE_2	50	212,2 ± 27,4	6,1 - 815,0	VOL2	19	332,4 ± 71,1	17,9 - 1304,3	
	GE_3	5	406,0 ± 145,5	8,5 - 811,6	VOL3	39	320,1 ± 41,9	31,2 - 957,2	
LB	GE_1	15	428,4 ± 99,6	8,4 - 1123,7	LB	VOL1	6	365,4 ± 103,3	93,1 - 731
	GE_2	37	264,7 ± 47,2	13,1 - 1043,0	VOL2	18	215,7 ± 71,8	4,7 - 1123,7	
	GE_3	5	96,6 ± 38,1	4,7 - 197,1	VOL3	29	366,7 ± 63,4	24,7 - 1043,0	

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA					SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA				
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.			N	Media ± SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GTES_1	61	270,8 ± 43,2	4,7 - 1304,3	TOTAL	Dm	13	224,3 ± 65,8	4,7 - 815,0
	GTES_2	81	296,6 ± 28,4	0,0 - 1417,5		Sb	24	312,0 ± 48,4	8,5 - 784,7
	GTES_3	45	323,4 ± 43,9	8,5 - 1275,6		Xd	25	309,5 ± 56,5	37,3 - 1304,3
EB	GTES_1	6	214,1 ± 115,4	12,8 - 741,7	EB	Dm	2	105 ± 71,4	33,6 - 176,4
	GTES_2	32	321,7 ± 54,5	0,0 - 1417,5	Sb	8	504,2 ± 75,5	196,4 - 784,7	
	GTES_3	10	415,7 ± 121,2	57,0 - 1275,6	Xd	5	369,4 ± 78,5	75,1 - 521,1	
PB	GTES_1	8	298,1 ± 146,7	37,3 - 1304,3	PB	Dm	5	376,5 ± 122,6	152,2 - 815,0
	GTES_2	36	249,4 ± 36,2	6,1 - 951,4	Sb	14	222,3 ± 45,7	8,5 - 621,9	
	GTES_3	35	296,3 ± 44,3	8,5 - 957,2	Xd	14	297,8 ± 87,2	37,3 - 1304,3	
LB	GTES_1	47	273,7 ± 48,9	4,7 - 1123,7	LB	Dm	6	137,3 ± 76,5	4,7 - 460,4
	GTES_2	13	369,4 ± 60,5	18,8 - 731,0	Sb	1	30,1		
						Xd	6	275,5 ± 84,2	175,0 - 527,5

Tabla A10. Número de espermatozoides ($\times 10^6$) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular $\leq 60 \text{ cm}^3$, VOL2 = Volumen testicular $>60 \text{ y } \leq 80 \text{ cm}^3$ y VOL3 = Volumen testicular $>80 \text{ cm}^3$; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea $<1 \text{ ng/mL}$, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea $1 - 10 \text{ ng/mL}$ y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea $>10 \text{ ng/mL}$; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD				SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GE_1	56	686,1 \pm 86,4	21,0 - 3202,5	TOTAL	VOL1	19	306,6 \pm 61,7	21,8 - 1096,5
	GE_2	109	500,4 \pm 72,7	0 - 5321,0		VOL2	50	356,0 \pm 50,8	0,0 - 1236,1
	GE_3	13	419,1 \pm 101,8	3,8 - 1170,5		VOL3	87	710,0 \pm 75,2	3,4 - 3751,3
EB	GE_1	19	786,5 \pm 180,2	21,8 - 3202,5	EB	VOL1	7	228,7 \pm 55,4	21,8 - 431,7
	GE_2	22	524,1 \pm 248,1	0,0 - 5321,0		VOL2	13	286,0 \pm 81,9	0,0 - 850,5
	GE_3	3	595,1 \pm 290,3	240,1 - 1170,5		VOL3	19	655,7 \pm 133,7	3,4 - 1702,7
PB	GE_1	22	567,9 \pm 75,6	27,8 - 1173,9	PB	VOL1	6	175,9 \pm 75,1	27,8 - 532,7
	GE_2	50	399,8 \pm 53,2	8,5 - 1423,5		VOL2	19	418,5 \pm 86,1	35,8 - 1173,9
	GE_3	5	550,7 \pm 170,7	14,4 - 935,5		VOL3	39	614,1 \pm 63,1	90,5 - 1522,3
LB	GE_1	15	745,9 \pm 208,3	21,0 - 3085,1	LB	VOL1	6	515,2 \pm 135,6	199,6 - 1096,5
	GE_2	37	637,8 \pm 142,7	24,7 - 3751,3		VOL2	18	339,6 \pm 92,6	3,8 - 1236,1
	GE_3	5	181,8 \pm 57,9	3,8 - 344,9		VOL3	29	887,5 \pm 193,5	24,7 - 3751,3

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA				SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GTES_1	61	511,0 \pm 86,3	3,4 - 3085,1	TOTAL	Dm	13	311,4 \pm 62,6	3,8 - 652,0
	GTES_2	81	608,8 \pm 92,2	0,0 - 5321,0		Sb	24	747,6 \pm 142,2	14,4 - 3202,5
	GTES_3	45	485,6 \pm 62,6	14,4 - 1563,4		Xd	25	751,8 \pm 215,5	103,6 - 5321,0
EB	GTES_1	6	327,7 \pm 144,5	3,4 - 818,4	EB	Dm	2	227,7 \pm 160,5	67,2 - 388,1
	GTES_2	32	679,3 \pm 197,6	0,0 - 5321,0		Sb	8	1215,6 \pm 326,5	383,8 - 3202,5
	GTES_3	10	564,7 \pm 175,4	39,9 - 1563,4		Xd	5	1608,6 \pm 956,6	240,3 - 5321
PB	GTES_1	8	450,6 \pm 146,3	133,8 - 1173,9	PB	Dm	5	502,0 \pm 44,9	378,4 - 652
	GTES_2	36	484,3 \pm 68,0	8,5 - 1522,3		Sb	14	528,2 \pm 100,2	14,4 - 1048,1
	GTES_3	35	462,3 \pm 63,9	14,4 - 1423,5		Xd	14	514,4 \pm 108,8	103,6 - 1197,5
LB	GTES_1	47	547,8 \pm 108,8	3,8 - 3085,1	LB	Dm	6	180,6 \pm 85,7	3,8 - 460,4
	GTES_2	13	796,4 \pm 265,8	43,2 - 3751,3		Sb	2	75,3 \pm 0,0	75,3 - 75,3
						Xd	6	511,7 \pm 149,3	262,5 - 1055,0

Tabla A11. Motilidad individual (MI; %) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular $\leq 60 \text{ cm}^3$, VOL2 = Volumen testicular $>60 \text{ y } \leq 80 \text{ cm}^3$ y VOL3 = Volumen testicular $>80 \text{ cm}^3$; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea $<1 \text{ ng/mL}$, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea $1 - 10 \text{ ng/mL}$ y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea $>10 \text{ ng/mL}$; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD					SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR				
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.			N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GE_1	51	76,0 \pm 2,4	24,7 - 99,5	TOTAL	VOL1	19	76,9 \pm 4,6	24,7 - 99,5
	GE_2	101	73,0 \pm 1,7	24,0 - 97,7		VOL2	43	75,4 \pm 2,8	25,9 - 95,8
	GE_3	9	74,8 \pm 5,8	35,5 - 95,7		VOL3	79	74,3 \pm 1,8	24,0 - 97,6
EB	GE_1	19	71,4 \pm 4,2	24,7 - 99,5	EB	VOL1	7	68,3 \pm 10,4	24,7 - 99,5
	GE_2	18	67,6 \pm 3,6	33,3 - 93,1	VOL2	11	74,4 \pm 5,9	33,3 - 95,7	
	GE_3	2	86,9 \pm 8,7	78,2 - 95,7	VOL3	16	71,8 \pm 2,9	47,6 - 88,3	
PB	GE_1	18	75,6 \pm 4,1	28,7 - 95,3	PB	VOL1	6	79,9 \pm 6,3	53,1,0 - 95
	GE_2	48	74,9 \pm 2,4	24,0 - 97,7	VOL2	16	75,3 \pm 5,3	25,9 - 95,3	
	GE_3	5	78,9 \pm 3,7	72,8 - 92,4	VOL3	37	76,8 \pm 2,3	24,0 - 97,2	
LB	GE_1	14	82,8 \pm 3,7	53,9 - 95,5	LB	VOL1	6	83,9 \pm 5,0	61,5 - 95,5
	GE_2	35	73,1 \pm 3,0	32,0 - 97,0	VOL2	16	76,2 \pm 3,8	34,8 - 95,8	
	GE_3	2	52,5 \pm 17,0	35,5 - 69,5	VOL3	26	72,2 \pm 4	32 - 97,6	
SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA					SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA				
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.			N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GTES_1	54	69,6 \pm 2,6	24,0 - 97,0	TOTAL	Dm	12	63,0 \pm 4,4	32,0 - 76,7,0
	GTES_2	73	77,3 \pm 1,9	30,4 - 99,5		Sb	22	70,9 \pm 2,3	53,2 - 88,7
	GTES_3	42	76,4 \pm 2,6	25,9 - 96,1		Xd	21	67,0 \pm 3,8	24,0 - 90,1
EB	GTES_1	6	56,9 \pm 7,3	24,7 - 78,2	EB	Dm	2	59,6 \pm 2,4	57,1 - 62,0
	GTES_2	27	72,9 \pm 3,2	33,3 - 99,5	Sb	8	68,7 \pm 3,8	53,2 - 86,5	
	GTES_3	9	75,6 \pm 4,6	54,5 - 95,7	Xd	5	71,3 \pm 7,4	54,5 - 90,1	
PB	GTES_1	7	61,3 \pm 9,9	24,0 - 88,7	PB	Dm	5	73,1 \pm 2,0	65,2 - 76,7
	GTES_2	33	77,9 \pm 2,5	30,4 - 97,7	Sb	12	72,5 \pm 3,3	56,7 - 88,7	
	GTES_3	33	76,7 \pm 2,5	25,9 - 96,1	Xd	12	69,0 \pm 5,5	24,0 - 87,6	
LB	GTES_1	41	72,8 \pm 2,7	34,8 - 97,0	LB	Dm	5	54,3 \pm 8,7	32,0 - 73,5
	GTES_2	13	85,2 \pm 5,0	32,0 - 97,6	Sb	2	70,0 \pm 3,6	66,4 - 73,7	
						Xd	4	55,7 \pm 6,4	46,6 - 74,7

Tabla A12. Motilidad progresiva (MP; %) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular $\leq 60 \text{ cm}^3$, VOL2 = Volumen testicular >60 y $\leq 80 \text{ cm}^3$ y VOL3 = Volumen testicular $>80 \text{ cm}^3$; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea $<1 \text{ ng/mL}$, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea $>10 \text{ ng/mL}$; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD				SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GE_1	51	47,7 \pm 2,8	1,4 - 90,8	TOTAL	VOL1	19	56,3 \pm 6,0	5,1 - 90,8
	GE_2	101	42,9 \pm 1,8	3,7 - 87,6		VOL2	43	49,3 \pm 3,0	1,4 - 82,2
	GE_3	9	40,0 \pm 5,7	11,6 - 73,1		VOL3	79	44,2 \pm 1,8	7,5 - 84,7
EB	GE_1	19	43,6 \pm 5,1	5,1 - 90,8	EB	VOL1	7	44,6 \pm 12,2	5,1 - 90,8
	GE_2	18	38,6 \pm 3,5	14,8 - 82,1	VOL2	11	50,8 \pm 6,4	16,7 - 82,2	
	GE_3	2	39,8 \pm 0,9	38,9 - 40,8	VOL3	16	40,7 \pm 3,3	16,0 - 63,4	
PB	GE_1	18	47,2 \pm 4,4	1,4 - 80,0	PB	VOL1	6	58,4 \pm 7,6	35,9 - 87,6
	GE_2	48	43,6 \pm 2,8	3,7 - 87,6	VOL2	16	47,9 \pm 6,1	1,4 - 80,0	
	GE_3	5	45,8 \pm 8,2	21,7 - 73,1	VOL3	37	46,0 \pm 2,5	7,5 - 71,8	
LB	GE_1	14	53,8 \pm 5,1	21,8 - 86,5	LB	VOL1	6	67,9 \pm 9,1	29,0 - 86,5
	GE_2	35	44,1 \pm 3,1	4,3 - 78,7	VOL2	16	49,6 \pm 3,2	23,4 - 74,6	
	GE_3	2	25,8 \pm 14,2	11,6 - 40,1	VOL3	26	43,8 \pm 3,8	11,6 - 84,7	
SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA				SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GTES_1	54	41,2 \pm 2,6	1,4 - 85,1	TOTAL	Dm	12	35,8 \pm 3,4	18,5 - 50,0
	GTES_2	73	50,9 \pm 2,3	5,1 - 90,8		Sb	22	38,7 \pm 3,2	15,0 - 64,9
	GTES_3	42	41,4 \pm 2,6	3,7 - 87,6		Xd	21	38,4 \pm 3,2	5,1 - 64,4
EB	GTES_1	6	34,4 \pm 5,6	16,6 - 55,2	EB	Dm	2	39,9 \pm 1,0	38,9 - 40,9
	GTES_2	27	48,8 \pm 4,1	5,1 - 90,8	Sb	8	42,9 \pm 5,1	22,0 - 63,4	
	GTES_3	9	32,1 \pm 3,5	14,8 - 41,9	Xd	5	30,8 \pm 7,2	5,1 - 45,1	
PB	GTES_1	7	34,2 \pm 9,5	1,4 - 64,9	PB	Dm	5	38,7 \pm 5,7	18,5 - 50,0
	GTES_2	33	49,2 \pm 3,1	15,0 - 80,0	Sb	12	36,9 \pm 4,6	15,0 - 64,9	
	GTES_3	33	43,9 \pm 3,1	3,7 - 87,6	Xd	12	41,5 \pm 4,6	7,5 - 64,4	
LB	GTES_1	41	43,4 \pm 2,8	4,3 - 85,1	LB	Dm	5	31,4 \pm 5,9	20,1 - 47,0
	GTES_2	13	59,8 \pm 5,7	21,6 - 86,5	Sb	2	32,9 \pm 9,0	23,9 - 42,0	
						Xd	4	38,6 \pm 2,1	33,5 - 42,4

Tabla A13. Velocidad media (VAP; $\mu\text{m/s}$) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular $\leq 60 \text{ cm}^3$, VOL2 = Volumen testicular >60 y $\leq 80 \text{ cm}^3$ y VOL3 = Volumen testicular $>80 \text{ cm}^3$; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea $<1 \text{ ng/mL}$, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea $>10 \text{ ng/mL}$; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD				SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GE_1	51	105,3 \pm 3,3	37,4 - 149,4	TOTAL	VOL1	19	114,4 \pm 5,7	67,0 - 141,3
	GE_2	101	96,1 \pm 2,5	41,9 - 156,2		VOL2	43	106,3 \pm 4,2	37,4 - 156,2
	GE_3	9	101,8 \pm 6,1	69,9 - 127,4		VOL3	79	94,1 \pm 2,4	45,6 - 146,7
EB	GE_1	19	94,0 \pm 4,4	71,6 - 132,6	EB	VOL1	7	105,3 \pm 10,0	71,6 - 132,6
	GE_2	18	86,8 \pm 6,4	45,0 - 153,1	VOL2	11	98,2 \pm 8,7	45,0 - 153,1	
	GE_3	2	94,9 \pm 10,6	84,4 - 105,5	VOL3	16	82,9 \pm 3,9	51,2 - 104,7	
PB	GE_1	18	104,1 \pm 6,0	37,4 - 149,4	PB	VOL1	6	117,8 \pm 8,2	79,0 - 136,3
	GE_2	48	98,1 \pm 3,5	45,6 - 156,2	VOL2	16	105,5 \pm 7,8	37,4 - 156,2	
	GE_3	5	108,2 \pm 7,0	92,8 - 127,4	VOL3	37	96,0 \pm 3,3	45,6 - 138,5	
LB	GE_1	14	122,2 \pm 4,7	96,4 - 146,9	LB	VOL1	6	121,7 \pm 11,5	57,0 - 141,3
	GE_2	35	98,1 \pm 4,4	41,9 - 141,3	VOL2	16	112,8 \pm 5,7	60,0 - 146,9	
	GE_3	2	92,8 \pm 22,8	69,9 - 115,6	VOL3	26	98,2 \pm 4,8	48,6 - 146,7	

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA				SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GTES_1	54	96,6 \pm 3,7	37,4 - 146,9	TOTAL	Dm	12	84,7 \pm 5,7	58,8 - 127,4
	GTES_2	73	105,7 \pm 2,7	45,0 - 156,2		Sb	22	92,3 \pm 3,4	48,6 - 123,5
	GTES_3	42	95,2 \pm 3,5	51,2 - 138,5		Xd	21	84,9 \pm 3,6	45,6 - 118,6
EB	GTES_1	6	84,3 \pm 5,5	68,4 - 104,7	EB	Dm	2	83,7 \pm 0,0	83,7 - 83,7
	GTES_2	27	98,4 \pm 4,7	45,0 - 153,1	Sb	8	90,7 \pm 3,2	78,3 - 104,7	
	GTES_3	9	81,1 \pm 6,5	51,2 - 109,0	Xd	5	83,1 \pm 5,0	66,0 - 94,3	
PB	GTES_1	7	75,9 \pm 11,7	37,4 - 123,5	PB	Dm	5	95,5 \pm 8,7	79,5 - 127,4
	GTES_2	33	107,2 \pm 3,5	71,4 - 156,2	Sb	12	95,5 \pm 4,2	72,4 - 123,5	
	GTES_3	33	99,1 \pm 3,9	60,1 - 138,5	Xd	12	83,4 \pm 5,7	45,6 - 118,6	
LB	GTES_1	41	102,0 \pm 4,1	41,9 - 146,9	LB	Dm	5	74,3 \pm 9,1	58,8 - 100,1
	GTES_2	13	116,8 \pm 7,0	58,8 - 146,7	Sb	2	79,6 \pm 31,0	48,6 - 110,6	
						Xd	4	91,8 \pm 5,9	74,5 - 101,0

Tabla A14. Velocidad rectilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular $\leq 60 \text{ cm}^3$, VOL2 = Volumen testicular $>60 \text{ y } \leq 80 \text{ cm}^3$ y VOL3 = Volumen testicular $>80 \text{ cm}^3$; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea $<1 \text{ ng/mL}$, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea $1 - 10 \text{ ng/mL}$ y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea $>10 \text{ ng/mL}$; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD					SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR				
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.			N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GE_1	51	77,3 \pm 3,5	14,7 - 136,4	TOTAL	VOL1	19	91,5 \pm 6,2	35,4 - 130,4
	GE_2	101	72,3 \pm 2,6	19,2 - 140,2		VOL2	43	83,7 \pm 4,2	14,7 - 140,2
	GE_3	9	72,7 \pm 5,9	47 - 103,4		VOL3	79	69,6 \pm 2,4	27,8 - 123,3
EB	GE_1	19	67 \pm 4,4	35,4 - 113,2	EB	VOL1	7	78,1 \pm 9,9	35,4 - 113,2
	GE_2	18	63,6 \pm 6,4	32,5 - 135,8		VOL2	11	77,9 \pm 8,7	40,0 - 135,8
	GE_3	2	66 \pm 9,7	56,3 - 75,8		VOL3	16	60,3 \pm 4,2	32,5 - 91,1
PB	GE_1	18	75,7 \pm 5,7	14,7 - 121,0	PB	VOL1	6	91,2 \pm 8,4	59,8 - 122,9
	GE_2	48	72,2 \pm 3,7	31,6 - 140,2		VOL2	16	83,4 \pm 7,8	14,7 - 140,2
	GE_3	5	76,6 \pm 9,8	47,0 - 103,4		VOL3	37	70,0 \pm 3,2	31,6 - 107,9
LB	GE_1	14	93,3 \pm 6,9	57,8 - 136,4	LB	VOL1	6	107,6 \pm 11,8	50,6 - 130,4
	GE_2	35	76,9 \pm 4,5	19,2 - 130,4		VOL2	16	88,1 \pm 6,0	47,2 - 136,4
	GE_3	2	69,7 \pm 10,9	58,9 - 80,6		VOL3	26	74,7 \pm 4,7	27,8 - 123,3

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA					SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA				
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.			N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GTES_1	54	73,0 \pm 3,7	14,7 - 136,4	TOTAL	Dm	12	59,8 \pm 4,6	33,9 - 91,7
	GTES_2	73	80,4 \pm 2,9	35,4 - 140,2		Sb	22	59,8 \pm 3,2	27,8 - 94,8
	GTES_3	42	68,1 \pm 3,6	32,5 - 122,9		Xd	21	58,1 \pm 3,3	31,6 - 81,4
EB	GTES_1	6	62,0 \pm 6,7	43,5 - 91,1	EB	Dm	2	64,3 \pm 0,3	64,0 - 64,7
	GTES_2	27	75,2 \pm 4,7	35,4 - 135,8		Sb	8	63,0 \pm 3,2	49,6 - 73,8
	GTES_3	9	50,6 \pm 5,1	32,5 - 75,8		Xd	5	51,6 \pm 7,4	32,5 - 68,2
PB	GTES_1	7	52,7 \pm 10,6	14,7 - 94,8	PB	Dm	5	62,6 \pm 8,1	43,8 - 91,7
	GTES_2	33	79,1 \pm 4,1	37,5 - 140,2		Sb	12	59,2 \pm 4,7	37,5 - 94,8
	GTES_3	33	72,9 \pm 4,0	41,1 - 122,9		Xd	12	57,3 \pm 4,4	31,6 - 77,7
LB	GTES_1	41	78,1 \pm 4,2	19,2 - 136,4	LB	Dm	5	55,1 \pm 8,1	33,9 - 78,1
	GTES_2	13	94,6 \pm 7,4	46,5 - 123,3		Sb	2	50,9 \pm 23,1	27,8 - 74,0
						Xd	4	69,0 \pm 4,4	61,6 - 81,4

Tabla A15. Linealidad (LIN; %) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular ≤60 cm³, VOL2 = Volumen testicular >60 y ≤80 cm³ y VOL3 = Volumen testicular >80 cm³; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea <1 ng/mL, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea >10 ng/mL; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD					SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR				
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.			N	Media ± SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GE_1	51	50,2 ± 1,4	26,8 - 73,4	TOTAL	VOL1	19	53,9 ± 2,5	27,4 - 70,6
	GE_2	101	49,2 ± 1,0	28,3 - 70,6		VOL2	43	53,2 ± 1,3	26,8 - 73,4
	GE_3	9	47,9 ± 3,6	30,4 - 62,5		VOL3	79	48,8 ± 1,0	28,4 - 67,7
EB	GE_1	19	46,8 ± 2,2	27,4 - 66,2	EB	VOL1	7	49,2 ± 4,9	27,4 - 66,2
	GE_2	18	47,8 ± 2,2	34,3 - 65,8	VOL2	11	50,1 ± 2,6	37,3 - 62,6	
	GE_3	2	40,7 ± 3,5	37,3 - 44,2	VOL3	16	47,5 ± 1,6	35,6 - 56,9	
PB	GE_1	18	49,0 ± 2,3	26,8 - 66,6	PB	VOL1	6	52,8 ± 2,9	42,5 - 61,6
	GE_2	48	48,4 ± 1,4	28,4 - 67,6	VOL2	16	52,3 ± 2,2	26,8 - 66,0	
	GE_3	5	46,4 ± 5,0	30,4 - 59,3	VOL3	37	48,0 ± 1,6	28,4 - 67,6	
LB	GE_1	14	56,2 ± 2,5	44,4 - 73,4	LB	VOL1	6	60,5 ± 4,1	43,8 - 70,6
	GE_2	35	51,2 ± 1,7	28,3 - 70,6	VOL2	16	56,2 ± 1,9	44,9 - 73,4	
	GE_3	2	58,9 ± 3,6	55,3 - 62,5	VOL3	26	50,8 ± 1,8	28,4 - 67,7	
SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA					SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA				
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.			N	Media ± SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GTES_1	54	51,1 ± 1,5	26,8 - 73,4	TOTAL	Dm	12	48,2 ± 3,1	28,4 - 59,3
	GTES_2	73	49,5 ± 1,0	27,4 - 67,7		Sb	22	43,7 ± 2,2	28,4 - 66,6
	GTES_3	42	48,2 ± 1,5	28,4 - 67,6		Xd	21	44,1 ± 2,2	27,4 - 65,1
EB	GTES_1	6	48,8 ± 3,4	38,3 - 58,6	EB	Dm	2	54,4 ± 4,2	50,2 - 58,6
	GTES_2	27	48,9 ± 1,9	27,4 - 66,2	Sb	8	45,0 ± 3,0	28,4 - 51,2	
	GTES_3	9	42,9 ± 2,6	34,3 - 56,1	Xd	5	41,3 ± 5,3	27,4 - 56,1	
PB	GTES_1	7	45,2 ± 5,9	26,8 - 66,6	PB	Dm	5	45,0 ± 5,1	29,0 - 59,3
	GTES_2	33	48,0 ± 1,3	33,2 - 66,0	Sb	12	43,0 ± 3,2	30,4 - 66,6	
	GTES_3	33	49,6 ± 1,7	28,4 - 67,6	Xd	12	44,1 ± 3,1	28,4 - 65,1	
LB	GTES_1	41	52,4 ± 1,6	28,3 - 73,4	LB	Dm	5	48,9 ± 5,2	28,4 - 57,5
	GTES_2	13	54,3 ± 1,7	44,9 - 67,7	Sb	2	42,8 ± 12,2	30,6 - 55,0	
						Xd	4	48,1 ± 1,5	45,9 - 52,4

Tabla A16. Amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH; μm) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular $\leq 60 \text{ cm}^3$, VOL2 = Volumen testicular >60 y $\leq 80 \text{ cm}^3$ y VOL3 = Volumen testicular $>80 \text{ cm}^3$; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea $<1 \text{ ng/mL}$, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea $1 - 10 \text{ ng/mL}$ y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea $>10 \text{ ng/mL}$; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD					SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR				
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.			N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GE_1	51	5,1 \pm 0,2	1,8 - 10,4	TOTAL	VOL1	19	5,6 \pm 0,4	3,2 - 10,4
	GE_2	101	4,9 \pm 0,1	2,0 - 7,2		VOL2	44	5,0 \pm 0,2	1,8 - 8,4
	GE_3	9	5,3 \pm 0,5	2,7 - 6,8		VOL3	80	4,9 \pm 0,1	2,4 - 8,4
EB	GE_1	19	5,1 \pm 0,4	3,2 - 10,4	EB	VOL1	7	5,5 \pm 1,0	3,2 - 10,4
	GE_2	18	4,5 \pm 0,3	2,0 - 6,5	VOL2	12	5,5 \pm 0,5	2,0 - 8,4	
	GE_3	2	6,4 \pm 0,4	6,0 - 6,8	VOL3	17	4,6 \pm 0,2	2,9 - 6,3	
PB	GE_1	18	5,2 \pm 0,3	1,8 - 7,8	PB	VOL1	6	5,6 \pm 0,4	3,8 - 6,6
	GE_2	48	4,9 \pm 0,2	2,3 - 7,2	VOL2	16	5,1 \pm 0,5	1,8 - 7,8	
	GE_3	5	5,5 \pm 0,5	3,8 - 6,6	VOL3	37	5,0 \pm 0,2	2,4 - 7,2	
LB	GE_1	14	5,1 \pm 0,3	3,7 - 7,7	LB	VOL1	6	5,6 \pm 0,5	4,3 - 7,2
	GE_2	35	5,0 \pm 0,2	2,7 - 7,1	VOL2	16	4,6 \pm 0,3	3,3 - 6,7	
	GE_3	2	3,6 \pm 0,9	2,7 - 4,5	VOL3	26	5,0 \pm 0,3	2,7 - 8,4	
SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA					SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA				
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.			N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GTES_1	54	4,5 \pm 0,2	1,8 - 7,7	TOTAL	Dm	12	4,0 \pm 0,3	2,7 - 6,6
	GTES_2	75	5,6 \pm 0,2	2,0 - 10,4		Sb	22	4,8 \pm 0,2	3,3 - 6,7
	GTES_3	42	4,8 \pm 0,2	2,3 - 7,2		Xd	21	4,8 \pm 0,3	2,9 - 7,2
EB	GTES_1	6	4,2 \pm 0,3	3,3 - 5,4	EB	Dm	2	3,8 \pm 0,5	3,3 - 4,4
	GTES_2	29	5,4 \pm 0,3	2,0 - 10,4	Sb	8	5,0 \pm 0,3	4,1 - 6,7	
	GTES_3	9	4,3 \pm 0,4	3,1 - 6,8	Xd	5	4,4 \pm 0,6	3,2 - 6,5	
PB	GTES_1	7	3,6 \pm 0,5	1,8 - 5,7	PB	Dm	5	4,5 \pm 0,5	3,7 - 6,6
	GTES_2	33	5,6 \pm 0,2	3,3 - 7,8	Sb	12	4,8 \pm 0,3	3,3 - 6,1	
	GTES_3	33	4,9 \pm 0,2	2,3 - 7,2	Xd	12	4,8 \pm 0,4	2,9 - 7,2	
LB	GTES_1	41	4,7 \pm 0,2	2,7 - 7,7	LB	Dm	5	3,7 \pm 0,3	2,7 - 4,4
	GTES_2	13	5,9 \pm 0,4	3,7 - 8,4	Sb	2	4,0 \pm 0,3	3,7 - 4,3	
						Xd	4	5,4 \pm 0,4	4,5 - 6,2

Tabla A17. Espermatozoides viables con acrosomas intactos (iACRO; %) (PI-/PNA-) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. "EB": marzo y primera quincena de abril; "PB": segunda quincena de abril y mayo; "LB": junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular ≤ 60 cm³, VOL2 = Volumen testicular >60 y ≤ 80 cm³ y VOL3 = Volumen testicular >80 cm³; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea <1 ng/mL, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea >10 ng/mL; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD				SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GE_1	54	77,6 \pm 2,0	31,0 - 98,9	TOTAL	VOL1	17	79,5 \pm 3,4	39,0 - 95,5
	GE_2	101	79,8 \pm 1,1	41,0 - 98,6		VOL2	48	77,0 \pm 1,9	41,0 - 98,5
	GE_3	13	85,0 \pm 2,4	72,0 - 98,4		VOL3	81	80,2 \pm 1,4	31,0 - 98,6
EB	GE_1	18	74,3 \pm 4,3	31,0 - 98,9	EB	VOL1	6	71,6 \pm 7,9	39,0 - 95,5
	GE_2	22	75,2 \pm 2,7	41,0 - 92,0		VOL2	13	71,9 \pm 3,7	46,0 - 89,0
	GE_3	3	78,3 \pm 3,8	72,0 - 85,0		VOL3	19	72,2 \pm 3,8	31,0 - 88,0
PB	GE_1	21	81,1 \pm 2,4	54,0 - 98,5	PB	VOL1	5	80,3 \pm 4,4	70,0 - 92,0
	GE_2	48	82,1 \pm 1,5	52,0 - 98,6		VOL2	18	81,2 \pm 3,1	52,0 - 98,5
	GE_3	5	82,6 \pm 3,0	75,7 - 93,0		VOL3	38	82,8 \pm 1,8	46,0 - 98,6
LB	GE_1	15	76,5 \pm 3,3	41,0 - 92	LB	VOL1	6	86,7 \pm 2,4	78,0 - 94,0
	GE_2	31	79,5 \pm 1,7	57,0 - 97,1		VOL2	17	76,4 \pm 3,2	41,0 - 98,0
	GE_3	5	91,4 \pm 3,9	82,0 - 98,4		VOL3	24	82,3 \pm 2,0	57,0 - 98,4
SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA				SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA					
		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.		N	Media \pm SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GTES_1	56	82,0 \pm 1,4	57,0 - 98,4	TOTAL	Dm	10	83,5 \pm 3,4	70,0 - 98,0
	GTES_2	77	77,5 \pm 1,5	31,0 - 98,9		Sb	23	85,4 \pm 1,6	76,0 - 98,9
	GTES_3	44	78,4 \pm 1,8	41,0 - 95,2		Xd	22	86,1 \pm 2,4	64,1 - 98,6
EB	GTES_1	6	78,0 \pm 3,6	70,0 - 87,0	EB	Dm	2	70,1 \pm 0,1	70,0 - 70,1
	GTES_2	31	74,7 \pm 2,8	31,0 - 98,9		Sb	8	83,7 \pm 2,5	76,0 - 98,9
	GTES_3	10	68,4 \pm 5,1	41,0 - 88,0		Xd	5	80,9 \pm 6,0	64,1 - 95,5
PB	GTES_1	8	92,1 \pm 1,7	86,1 - 97,9	PB	Dm	5	84,8 \pm 3,3	75,7 - 95,2
	GTES_2	34	80,4 \pm 1,9	52,0 - 98,6		Sb	14	86,4 \pm 2,1	76,0 - 98,5
	GTES_3	34	81,3 \pm 1,6	54,0 - 95,2		Xd	13	88,0 \pm 2,6	71,0 - 98,6
LB	GTES_1	42	80,6 \pm 1,6	57,0 - 98,4	LB	Dm	3	90,4 \pm 7,2	76,0 - 98,0
	GTES_2	12	76,8 \pm 3,5	41,0 - 87,0		Sb	1	85,0	
						Xd	4	86,5 \pm 7,5	66,0 - 98,4

Tabla A18. Espermatozoides viables (VIAB; %) (SYBR14+/PI-) de la fracción rica seminal en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular ≤60 cm³, VOL2 = Volumen testicular >60 y ≤80 cm³ y VOL3 = Volumen testicular >80 cm³; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea <1 ng/mL, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea >10 ng/mL; Dm = Dominantes, In = Grupo intermedio de dominancia y Sb = Subordinados.

SEGÚN GRUPO DE EDAD				SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR					
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GE_1	40	73,5 ± 2,6	10,0 - 90,0	TOTAL	VOL1	15	78,3 ± 4,2	30,0 - 92,0
	GE_2	83	78,7 ± 1,0	45,0 - 94,0		VOL2	41	74,8 ± 2,5	10,0 - 93,0
	GE_3	8	80,3 ± 2,5	69,0 - 93,0		VOL3	61	76,5 ± 1,5	45,0 - 94,0
EB	GE_1	11	70,5 ± 5,3	30,0 - 86,0	EB	VOL1	5	68,4 ± 10,4	30,0 - 86,0
	GE_2	17	77,5 ± 2,7	45,0 - 91,0		VOL2	9	67,2 ± 6,6	36,0 - 91,0
	GE_3	3	81,0 ± 3,0	75,0 - 84,0		VOL3	15	74,4 ± 3,1	45,0 - 84,0
PB	GE_1	14	72,5 ± 5,7	10,0 - 90,0	PB	VOL1	4	79,8 ± 6,4	62,0 - 92,0
	GE_2	36	79,1 ± 1,5	62,0 - 93,0		VOL2	16	77,3 ± 4,8	10,0 - 93,0
	GE_3	3	81,0 ± 6,9	69,0 - 93,0		VOL3	25	77,8 ± 2,4	52,0 - 93,0
LB	GE_1	15	76,7 ± 2,4	57,0 - 88,0	LB	VOL1	6	85,5 ± 2,5	77,0 - 92,0
	GE_2	30	79,0 ± 1,7	59,0 - 94,0		VOL2	16	76,6 ± 2,0	57,0 - 86,0
	GE_3	2	78,0 ± 2,0	76,0 - 80,0		VOL3	21	76,5 ± 2,4	53,0 - 94,0

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA				SEGÚN ESTATUS DE DOMINANCIA					
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GTES_1	46	78,1 ± 1,4	57,0 - 94,0	TOTAL	Dm	3	77,3 ± 2,0	74,0 - 81,0
	GTES_2	58	74,5 ± 1,8	30,0 - 92,0		Sb	8	82,4 ± 1,6	75,0 - 89,0
	GTES_3	35	78,0 ± 2,6	10,0 - 93,0		Xd	8	81,9 ± 3,0	70,0 - 93,0
EB	GTES_1	5	75,6 ± 3,3	64,0 - 83,0	EB	Dm	1	74,0	
	GTES_2	21	69,7 ± 4,0	30,0 - 91,0		Sb	2	80,5 ± 2,5	78,0 - 83,0
	GTES_3	8	79,1 ± 3,5	55,0 - 84,0		Xd	1	83,0	
PB	GTES_1	3	88,4 ± 2,0	85,0 - 92,0	PB	Dm	1	81,0	
	GTES_2	25	76,8 ± 1,8	55,0 - 92,0		Sb	5	83,0 ± 2,5	75,0 - 89,0
	GTES_3	27	77,7 ± 3,2	10,0 - 93,0		Xd	5	83,4 ± 4,2	70,0 - 93,0
LB	GTES_1	38	77,6 ± 1,5	57,0 - 94,0	LB	Dm	1	77,0	
	GTES_2	12	78,4 ± 2,9	53,0 - 90,0		Sb	1	83,0	
						Xd	2	77,5 ± 6,5	71,0 - 84,0

Tabla A19. Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (MIT; %) (JC1+) en relación a los distintos periodos de la época reproductiva según los diferentes factores estudiados. “EB”: marzo y primera quincena de abril; “PB”: segunda quincena de abril y mayo; “LB”: junio, julio y agosto. GE_1 = Hasta 10 años, GE_2 = Entre 10 y 20 años y GE_3 = A partir de 20 años; VOL1 = Volumen testicular ≤60 cm³, VOL2 = Volumen testicular >60 y ≤80 cm³ y VOL3 = Volumen testicular >80 cm³; GTES_1 = Concentración de testosterona sanguínea <1 ng/mL, GTES_2 = Concentración de testosterona sanguínea 1 - 10 ng/mL y GTES_3 = Concentración de testosterona sanguínea >10 ng/mL.

SEGÚN GRUPO DE EDAD				SEGÚN GRUPO DE VOLUMEN TESTICULAR					
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.	
TOTAL	GE_1	34	66,4 ± 4,5	2,0 - 98,0	TOTAL	VOL1	14	69,2 ± 6,4	11,0 - 98,0
	GE_2	71	72,5 ± 2,6	0,0 - 98,0		VOL2	37	72,4 ± 3,3	14,0 - 98,0
	GE_3	7	84,9 ± 1,9	79,0 - 95,0		VOL3	51	70,5 ± 3,6	0,0 - 96,0
EB	GE_1	9	59,7 ± 10,4	2,0 - 96,0	EB	VOL1	5	72,2 ± 7,9	48,0 - 90,0
	GE_2	15	72,1 ± 6,2	0,0 - 98,0		VOL2	8	70,5 ± 6,3	42,0 - 88,0
	GE_3	3	88,7 ± 3,2	85,0 - 95,0		VOL3	13	65,5 ± 9,3	0,0 - 96,0
PB	GE_1	11	63,3 ± 7,8	14,0 - 97,0	PB	VOL1	3	57,3 ± 7,5	45,0 - 71,0
	GE_2	29	76,3 ± 2,8	41,0 - 98,0		VOL2	14	71,9 ± 6,7	14,0 - 98,0
	GE_3	2	82,0 ± 1,0	81,0 - 83,0		VOL3	20	76,6 ± 3,6	38,0 - 96,0
LB	GE_1	14	73,3 ± 6,0	28,0 - 98,0	LB	VOL1	6	72,7 ± 13,3	11,0 - 98,0
	GE_2	27	68,7 ± 5,0	11,0 - 93,0		VOL2	15	74,0 ± 4,6	36,0 - 91,0
	GE_3	2	82,0 ± 3,0	79,0 - 85,0		VOL3	18	67,3 ± 6,4	11,0 - 93,0

SEGÚN GRUPO DE TESTOSTERONA				
		N	Media ± SEM	Mín. - Máx.
TOTAL	GTES_1	40	75,6 ± 3,4	11,0 - 98,0
	GTES_2	52	68,4 ± 3,1	2,0 - 98,0
	GTES_3	28	71,5 ± 4,3	0,0 - 97,0
EB	GTES_1	3	78,0 ± 4,6	70,0 - 86,0
	GTES_2	20	68,8 ± 5,4	2,0 - 98,0
	GTES_3	7	65,0 ± 13,1	0,0 - 96,0
PB	GTES_1	2	97,5 ± 0,5	97,0 - 98,0
	GTES_2	21	71,6 ± 4,1	14,0 - 96,0
	GTES_3	21	73,6 ± 4,0	38,0 - 97,0
LB	GTES_1	35	74,1 ± 3,8	11,0 - 98,0
	GTES_2	11	61,5 ± 7,6	11,0 - 93,0

14. APÉNDICE B

DOCUMENTOS GRÁFICOS



Imagen 1. Recinto de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. 1a) Vista general de una parte del recinto de oso pardo del Parque de la Naturaleza de Cabárceno. **1b)** Detalle de la orografía abrupta y vegetación variada. Una osa con su oseño pueden observarse en la parte central de la fotografía. **1c)** Detalle de una zona del recinto con vegetación más densa. Puede observarse una osa joven que transita a la izquierda de la valla límite del recinto; todo lo que se observa a la izquierda y detrás de la valla forma parte del recinto de los osos. **1d)** Oso desplazándose por una zona escarpada.



Imagen 2. Comportamiento maternal y "área de observación". 2a) Osa con sus tres oseznos a la entrada de su osera. **2b)** Osa amamantando dos oseznos del año en un pequeño saliente de una pared rocosa. **2c)** Parte del "área de observación" para el estudio etológico, fotografiada desde su vertiente norte. En la parte izquierda de la fotografía se encuentra, señalado con una "X", el lugar de localización del observador para el estudio etológico (zona de la pasarela a la que tienen acceso los visitantes situada sobre la puerta principal de acceso de vehículos). **2d)** Otra perspectiva de parte del "área de observación" para el estudio etológico, fotografiada desde su vertiente sur. También pueden apreciarse el lugar de localización del observador, señalado con una "X".



Imagen 3. Comportamiento reproductivo: el cortejo. **3a)** Macho persiguiendo a una hembra con fines reproductivos. **3b)** Macho que acababa de situarse cerca de una hembra en celo y exhibe comportamiento de reflejo de Flehmen. **3c)** Osos adultos durante el cortejo: el macho se ha acercado a la hembra, que se encuentra sentada descansando, oliéndola y testando su receptividad. **3d)** Osos adultos durante el cortejo: el macho se ha acercado a una hembra mientras ésta orina, oliendo su tercio posterior durante la micción.

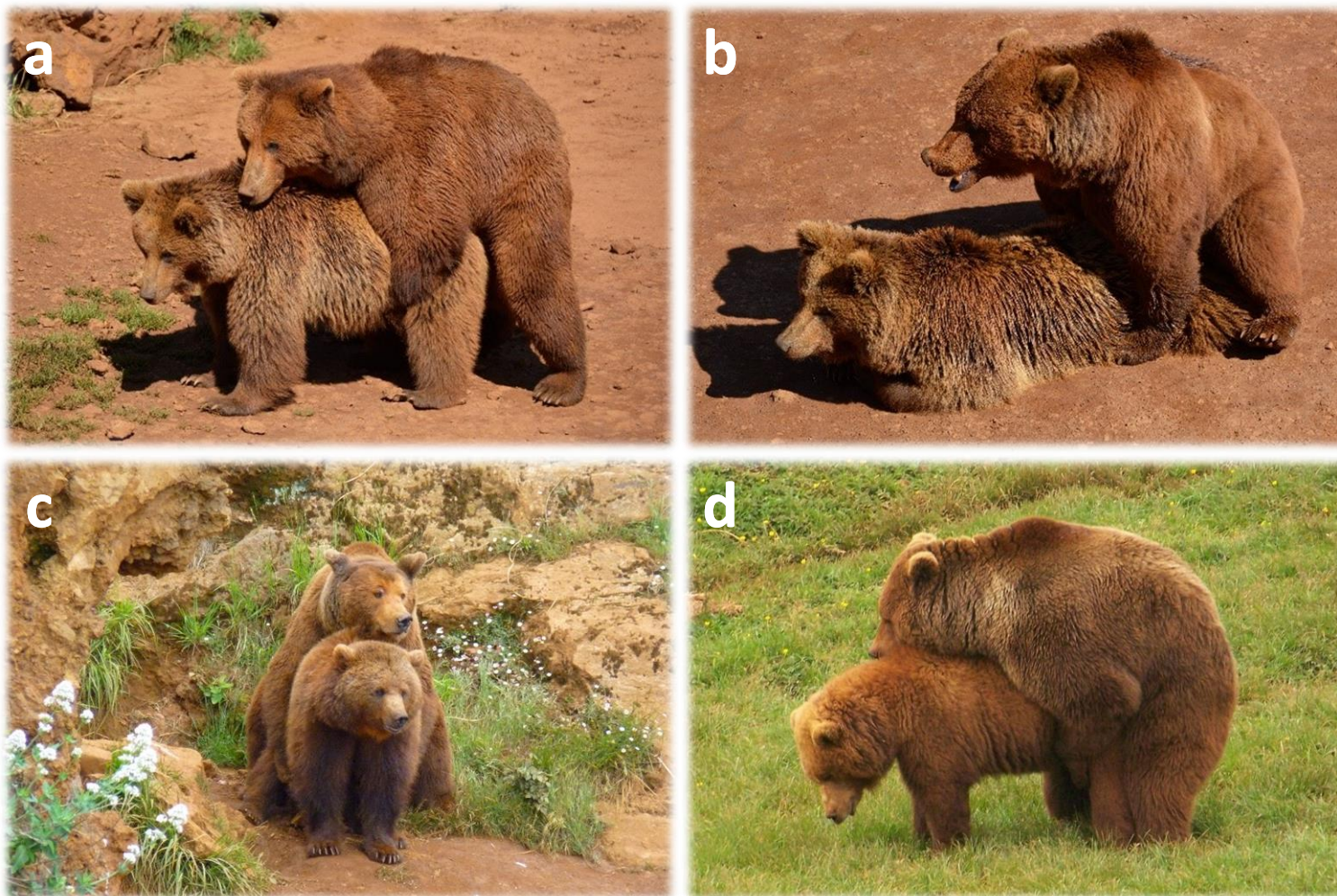


Imagen 4. Comportamiento reproductivo: la cópula. **4a)** Osos adultos copulando. Durante la cópula, el macho alterna fases de movimientos pélvicos con otras en las que simplemente mantiene su posición encima de la hembra. **4b)** Otra imagen de la misma cópula documentada en la imagen 4a, con la hembra tumbada. Durante una misma cópula, las hembras pueden permanecer en la estación, sentadas o tumbadas en distintos momentos, mientras el macho se adapta a las distintas posiciones. **4c)** Osos adultos copulando con la hembra sentada. **4d)** Osos adultos durante la fase de la cópula en la que se producen movimientos pélvicos. Los machos pueden realizar movimientos pélvicos tanto con la hembra en la estación como tumbada.

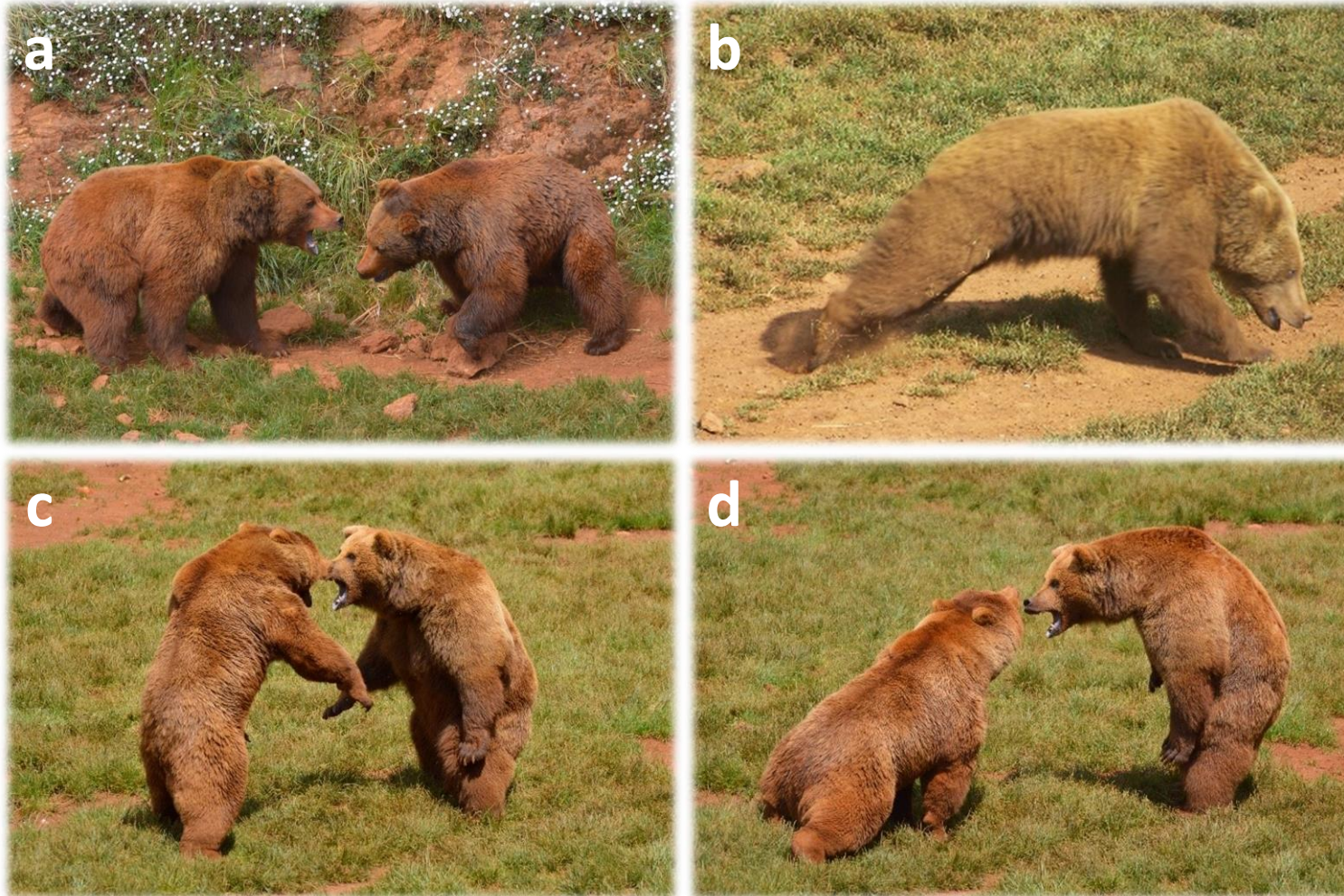


Imagen 5. Comportamiento agonístico. 5a) Dos machos adultos exhibiendo el comportamiento agonístico denominado "avance frontal". El individuo de la izquierda está retrocediendo, en señal de sumisión, a medida que el individuo de la derecha avanza. Nótese las típicas expresiones faciales, orientación de las orejas y corporal en ambos. **5b)** Oso en posición de carga hacia otro individuo, en los momentos previos a la exhibición del comportamiento agonístico denominado "persecución". **5c)** Comportamiento agonístico entre dos machos, con ambos individuos en posición bípeda. **5d)** Otra imagen del mismo evento de comportamiento agonístico documentado en la imagen 5c. Durante un mismo encuentro agonístico, pueden observarse patrones de comportamiento y posiciones corporales muy variadas.

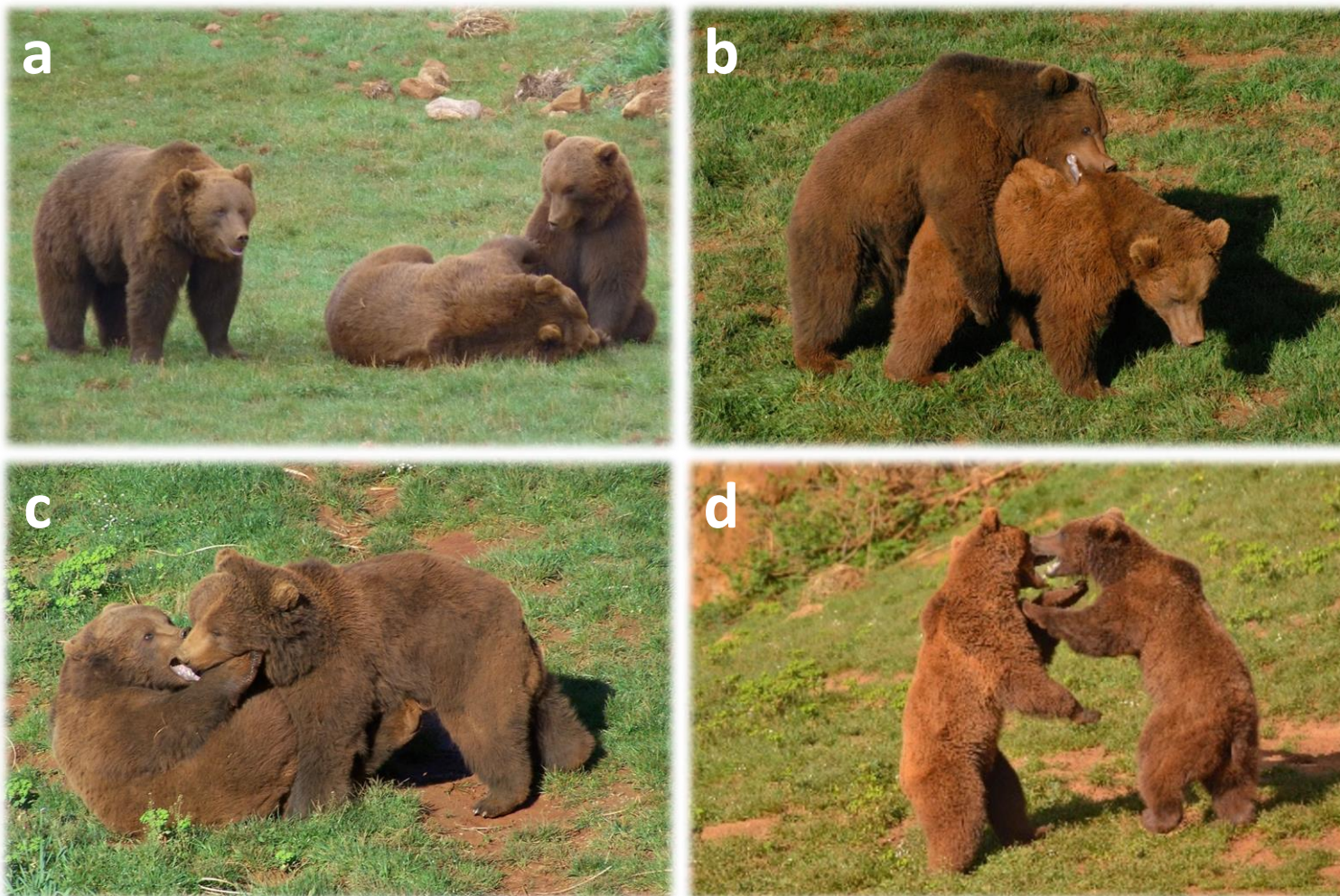


Imagen 6. Comportamiento de juego. **6a)** Comportamiento de juego entre dos machos adultos. Un tercer macho adulto observa a corta distancia sin alterar la actitud relajada de los osos que exhiben el comportamiento amistoso. **6b)** Comportamiento de juego entre dos machos adultos jóvenes. Las imitaciones a patrones utilizados en el comportamiento de monta son habituales. **6c)** Comportamiento de juego en la que uno de los machos se encuentra en decúbito supino. Ésta es una posición a evitar en las interacciones agonísticas para protegerse de mordiscos en la zona inguinal. **6d)** Comportamiento de juego entre dos machos jóvenes en posición bípeda.



Imagen 7. Inducción anestésica. 7a) Vista aérea durante una captura. El vehículo de la izquierda es aquel en el que los cuidadores proporcionan habitualmente el alimento y sirve para atraerlos a la zona, así como para alejarlos una vez se ha producido la inducción anestésica. El disparo del dardo anestésico se realiza desde el vehículo de los servicios veterinarios (derecha). **7b)** El equipo veterinario monitorizando a un macho durante la inducción. Puede observarse el dardo en el lado derecho del cuello. **7c)** Macho adulto anestesiado dentro del recinto, en los momentos previos a su carga. **7d)** Carga de un oso anestesiado para su transporte al lugar habilitado para la toma de muestras. Una primera toma de constantes vitales, así como la colocación de material de restricción física suceden en este momento. También participan en la captura un vehículo con personal de seguridad (al fondo) y otro vehículo acondicionado para el transporte del oso anestesiado.

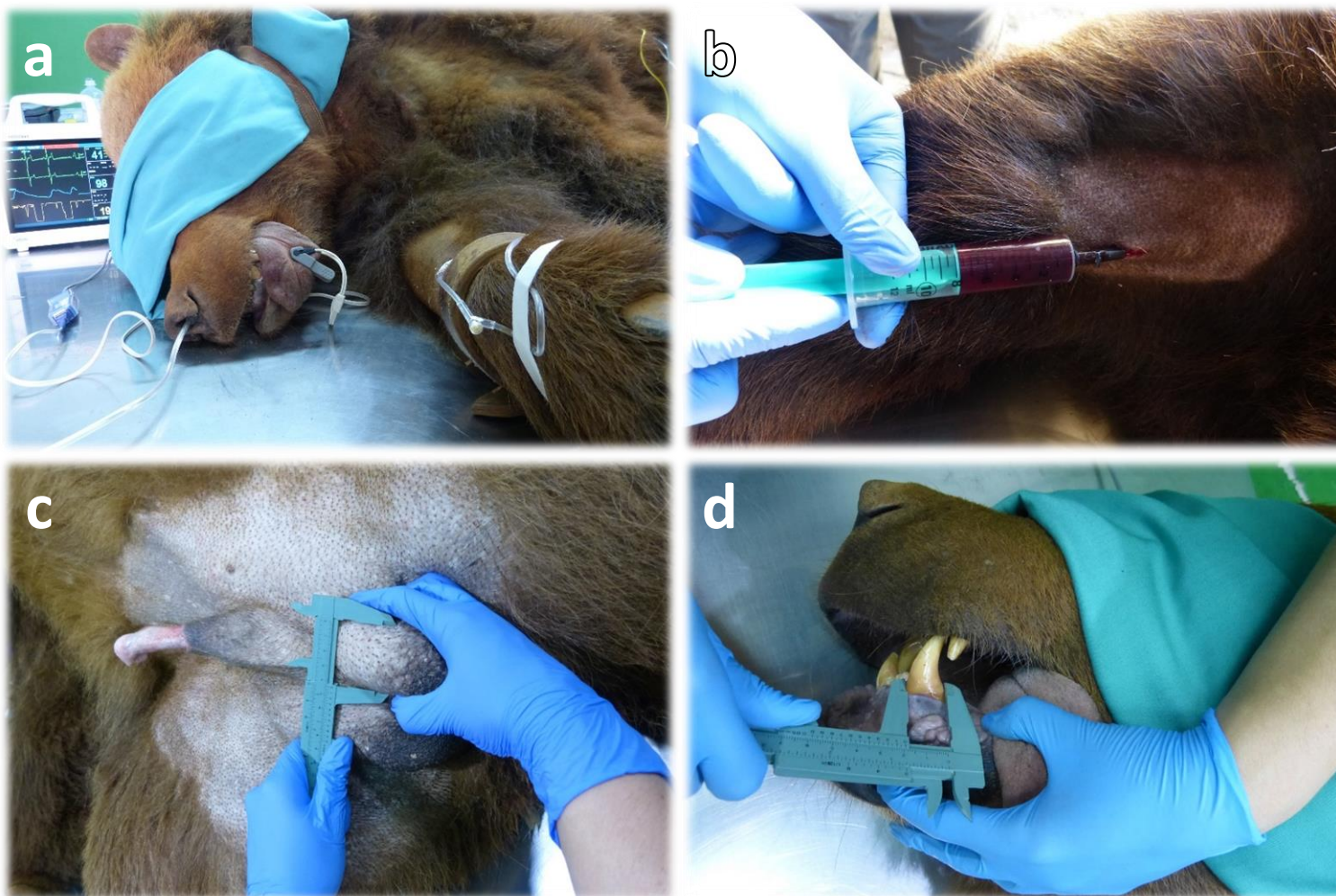


Imagen 8. Monitorización y toma de muestra sanguínea y medidas biométricas. 8a) Monitorización de las funciones cardiovascular y respiratoria. En la imagen pueden observarse el monitor, los electrodos del electrocardiograma, la sonda lingual y una sonda intranasal para la administración de oxígeno, así como el sistema de acceso intravenoso. **8b)** Toma de muestras sanguíneas a partir del catéter intravenoso acoplado a la vena cefálica. **8c)** Toma de medidas testiculares tras la limpieza y rasurado de la zona inguinal. **8d)** Toma de medidas de los colmillos.

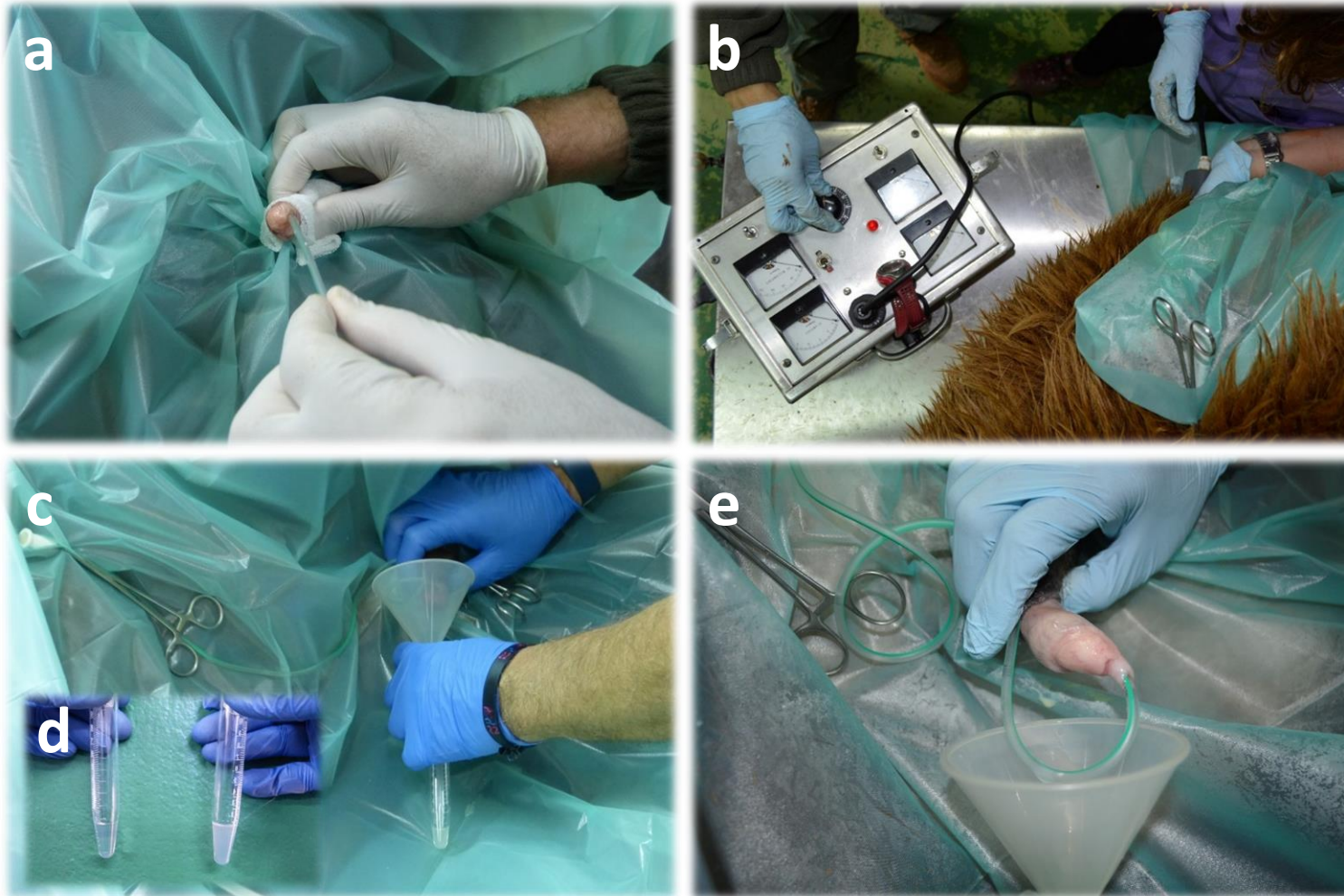


Imagen 9. Electroeyaculación. **9a)** Cateterización uretral en condiciones de esterilidad. **9b)** Electroeyaculador con sonda introducida en ampolla rectal. **9c)** Proceso de recolección del eyaculado durante la emisión de impulsos eléctricos con el electroeyaculador. **9d)** Dos fracciones no urospérmicas procedentes de una única electroeyaculación y del mismo individuo. **9e)** Detalle del pene erecto en el momento en el que una gota de muestra seminal cae desde la sonda urinaria al tubo colector.

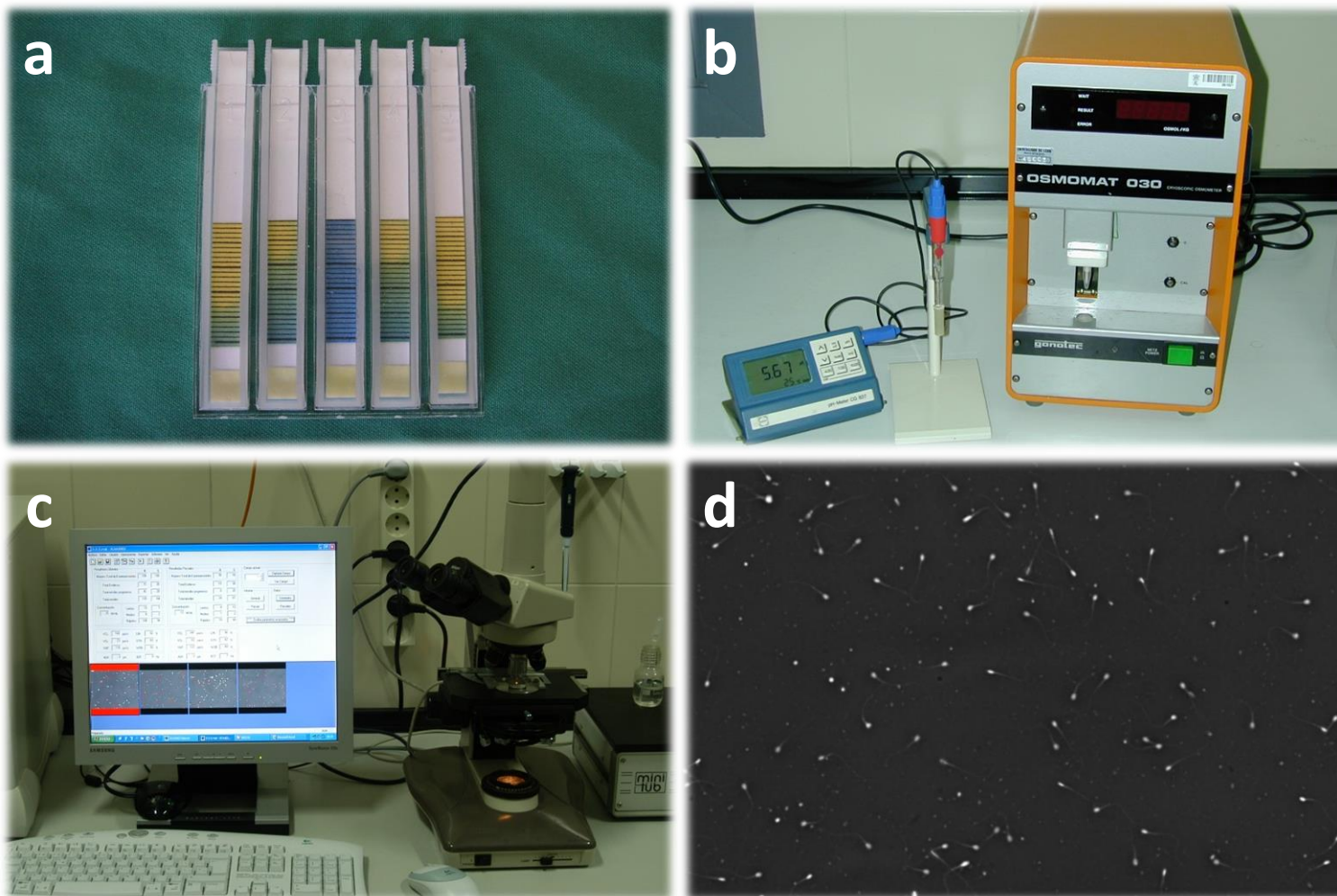


Imagen 10. Evaluación de la calidad de las muestras espermáticas: características fisicoquímicas y movilidad espermática. 10a) Determinación de la concentración de urea (Urea test strips Ecoline®, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Alemania). **10b)** Determinación de la osmolalidad (Osmomat-030, Gonotec®, Berlin, Alemania) y el pH (CG 837-Schott; Schott, Alemania). **10c)** Sistema de análisis computerizado de la movilidad espermática (CASA; ISAS, Integrated Semen Analyser System; Proiser, Valencia, España). **10d)** Espermatozoides de oso pardo visualizados a 100 x mediante el software CASA y un microscopio de contraste de fase negativa (Nikon Labophot-2; Nikon, Tokyo, Japón).

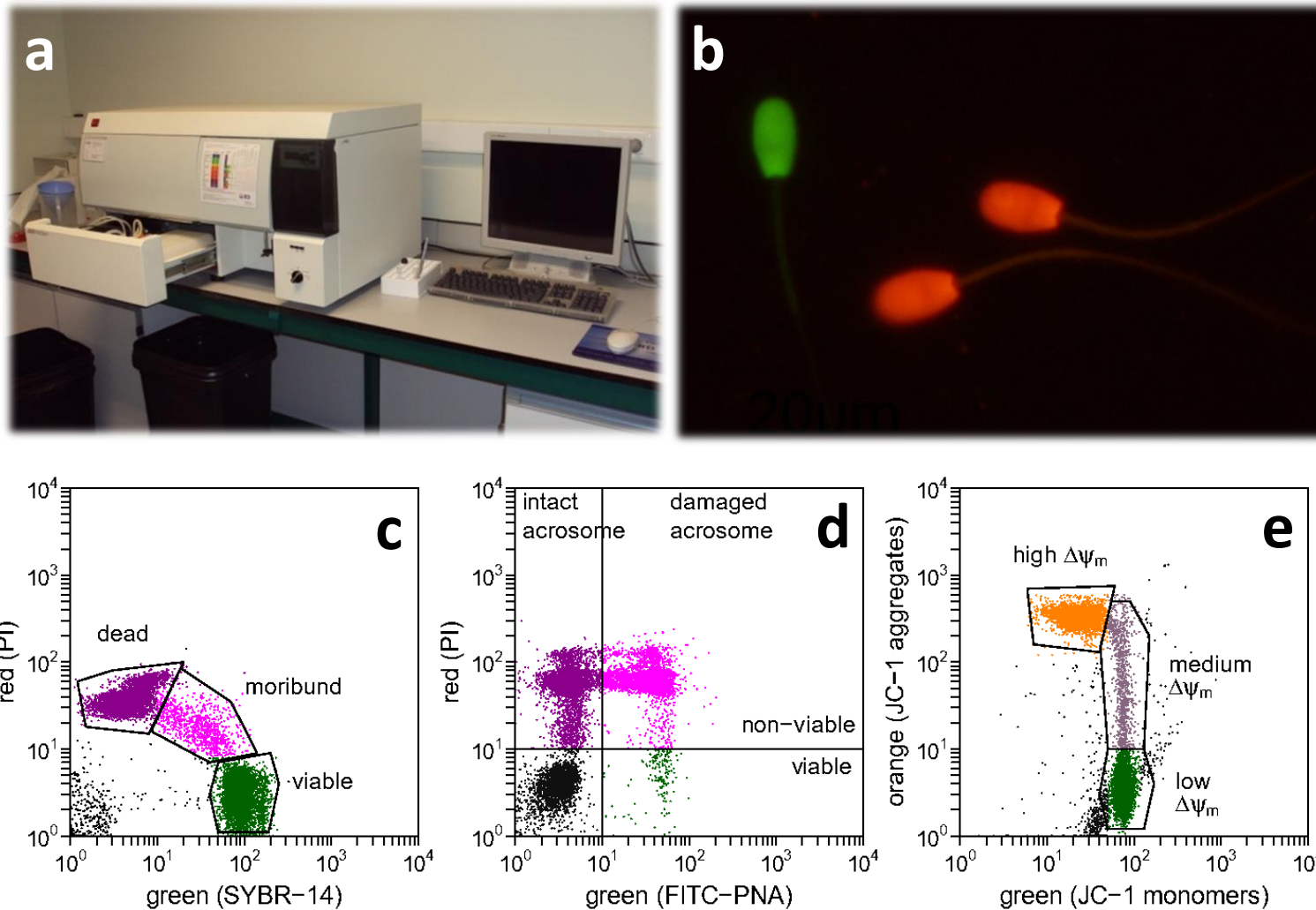


Imagen 11. Evaluación de la calidad de las muestras espermáticas: viabilidad, integridad estructural y actividad mitocondrial de los espermatozoides mediante citometría de flujo. **11a)** Citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San Jose, CA, USA). **11b)** Espermatozoides de oso pardo sometidos a una doble tinción SYBR14/PI para la evaluación de su viabilidad emitiendo fluorescencia verde (SYBR14+/PI-) y roja (SYBR14-/PI+). **11c)** Dotplot de la viabilidad mediante la técnica SYBR14/PI. **11d)** Dotplot del estado del acrosoma mediante la técnica PNA/PI. **11e)** Dotplot del estatus mitocondrial mediante la técnica JC-1. Tomada con permiso de *Reproduction in Domestic Animals*, 45(SUPPL. 2), 67–78. (<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>).

15. APÉNDICE C

CURRICULUM VITAE

FORMACIÓN ACADÉMICA

MÁSTER UNIVERSITARIO en Investigación en Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

2011. Módulo de Sanidad y Reproducción Animal. Trabajo de Fin de Máster: “Estudio de la biología reproductiva del oso pardo (*Ursus arctos*)”. Nota media: 9,01 / 10.

LICENCIADA CON GRADO. Tesina titulada: “Variaciones de parámetros sanguíneos (hematológicos y bioquímicos) y urinarios en función del cronograma biológico en machos de oso pardo”. 2010. Nota: 9,5 / 10.

LICENCIADA EN VETERINARIA por la Universidad de León. 2004-2009. Nota media: 7,81 / 10.

EXPERIENCIA PROFESIONAL

2018- Actualidad Veterinaria en Parque de la Naturaleza de Cabárceno. Cantabria.

2017-2018 Veterinaria en Clínica Veterinaria Santander. Cantabria.

2016-2017 Veterinaria en Hospital Veterinario Patas y Colas. Santa Cruz de Tenerife.

2015-2016 Veterinaria en Clínica Veterinaria Gonzalo Aja. Cantabria.

2015 Técnico de transferencia y divulgación en Centro de Investigación y Formación Agrarias del Gobierno de Cantabria (CIFA). Cantabria.

2014 Veterinaria voluntaria y asistente de investigación Cheetah Conservation Fund. Namibia.

2014 Técnico de laboratorio en Centro de Investigación y Formación Agrarias del Gobierno de Cantabria (CIFA). Cantabria.

2013-2014 Beca de formación en el área de transferencia y formación Centro de Investigación y Formación Agrarias del Gobierno de Cantabria (CIFA). Cantabria.

2013 - 2015 Promotora de ventas para Affinity Petcare. Cantabria.

2013 Veterinaria voluntaria interna en Centro de Recuperación de fauna autóctona CRUMA. Livorno, Italia.

2012 Veterinaria en clínica veterinaria “Canvet”. Cantabria.

2012 Investigadora contratada por la Universidad de León. León.

2009 Veterinaria voluntaria interna en el Hospital de Fauna salvaje GREFA. Madrid.

2009 Internado en el Hospital Clínico Veterinario de Castilla y León, Universidad de León. León.

2007-2008 Internado en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid, Sección de Animales Exóticos. Madrid.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y EVENTOS DE DIFUSIÓN CIENTÍFICA

Zoo and Wildlife Health Conference. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians. Valencia, 2022.

Zoo and Wildlife Health Conference. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians. Emmen, 2022.

Zoo and Wildlife Health Conference. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians. Online, 2021.

XII Congreso de la SEC. Sociedad Española de Cetáceos. Online, 2021.

Zoo and Wildlife Health Conference. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians. Online, 2020.

Southern European Veterinary Conference. Asociación de Veterinarios Especialistas en Pequeños Animales. Sevilla, 2019.

Congreso anual de la AIZA. Asociación Ibérica de Zoos y Acuarios. Santander, 2019.

XI Congreso de la SEC. Sociedad Española de Cetáceos. Bilbao, 2018.

Zoo and Wildlife Health Conference. American Association of Zoo and Wildlife Veterinarians / European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians / Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research. Praga, 2018.

X Congreso de la SEC. Sociedad Española de Cetáceos. Valencia, 2017.

53ª Reunión Científica de la S.E.E.P. Soc. Española para el Estudio de los Pastos. Cantabria, 2014.

VIII International Symposium on Wild Fauna. WAVES. León, 2013.

16th ESDAR Conference. European Society for Domestic Animal Reproduction. Dublin, 2012.

VII Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas. Facultad de Veterinaria UCM. Madrid, 2008.

PUBLICACIONES

ARTÍCULOS INDEXADOS (EN REVISTAS SCI)

López-Urueña, E., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Manrique, P., Anel-López, L., Chamorro, C. A., Borragán, S., de Paz, P., & Anel, L. (2014). Alternative procedures for the cryopreservation of brown bear ejaculates depending on the flexibility of the “in cooling” period (5°C). *Cryobiology*, 69(3), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.001>

López-Urueña, E., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Anel-López, L., Martínez-Rodríguez, C., Manrique, P., Borragán, S., Anel, L., & de Paz, P. (2015). Optimization of conditions for long-term prefreezing storage of brown bear sperm before cryopreservation. *Theriogenology*, 84, 1161–1171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.017>

Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel-López, L., López-Urueña, E., Manrique, P., Borragán, S., Morrell, J. M., de Paz, P., & Anel, L. (2016). Effect of colloid (Androcoll-Bear, Percoll, and PureSperm) selection on the freezability of brown bear (*Ursus arctos*) sperm. *Theriogenology*, 85(6), 1097–1105. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.021>

López-Urueña, E., Anel-López, L., Borragán, S., Ortega Ferrusola, C., Manrique, P., de Paz, P., Anel, L., & Álvarez, M. (2016). The use of gelatine in long-term storage (up to 48 hr) at 5°C preserves the pre-freezing and post-thawing quality of brown bear sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 700–707. <https://doi.org/10.1111/rda.12734>

ABSTRACTS INDEXADOS (EN REVISTAS SCI)

López-Urueña, E., Álvarez, M., Borragán, S., Manrique, P., Anel-López, L., Gomes-Alves, S., Martínez-Pastor, F., de Paz, P., & Anel, L. (2012). Preliminary approach of cooling protocol for brown bear sperm cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(3), 94.

Manrique, P., López-Urueña, E., Álvarez, M., Borragán, S., Gomes-Alves, S., Nicolás, M., de Paz, P., Martínez-Pastor, F., & Anel, L. (2012). Effects of season and male's age on brown bear mating length. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(5), 95–96.

López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Álvarez, M., Nicolás, M., Álvarez-Rodríguez, M., Manrique, P., Borragán, S., de Paz, P., & Anel, L. (2013). Descriptive study of epididymal spermatozoa from tiger (*Panthera tigris tigris*). *Reproduction in Domestic Animals*, 48(1), 81.

López-Urueña, E., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Borragán, S., Martínez-Rodríguez, C., Anel-López, L., Manrique, P., De Paz, P., & Anel, L. (2014). Cryopreservation of brown bear (*Ursus arctos*) electroejaculates: rapid cooling rate to 5°C affects spermatozoa viability but not apoptosis. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 98.

López-Urueña, E., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Borragán, S., Manrique, P., Anel-López, L., Martínez-Rodríguez, C., De Paz, P., & Anel, L. (2014). Glycerol presence during pre-freezing storage up to 48 h (5 degrees C) is recommended to enhance post-thawing quality of brown bear semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 123–124.

López-Urueña, E., Álvarez, M., Gomes-Alves, S., Borragán, S., Manrique, P., Anel-López, L., Martínez-Rodríguez, C., De Paz, P., & Anel, L. (2015). Thermal Stress test (ThSt) demonstrated that refrigeration and equilibration steps are necessary to an effective cryopreservation of brown bear (*Ursus arctos*) electroejaculates. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(3), 64.

Neila, M., Álvarez, M., Montes, R., Borragán, S., Manrique, P., Peña, F. J., Anel, L., De Paz, P., & Anel-López, L. (2019). Recovering sperm motility after thawing in Gaur (*Bos gaururs*) epididymal sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 126.

Zavala, V., Borragán, S., Manrique, P., Montes, R., Anel-López, L., Neila, M., Palacín, C., Fernández-Riesco, M., Anel, L., & Álvarez, M. (2022). Determination of reproductive status in brown bear (*Ursus arctos*) using vaginal cytology. *Reproduction in Domestic Animals*, 57, 146.

APORTACIONES A CONGRESOS

Anza, I., Fayos, M., Crespo-Picazo, J. L., Marco, V., Vargas-Castro, I., Álvarez, E., Serdio, A., Manrique, P., Jiménez, M. A., Ribera-Arroyo, B., Sánchez, R., Muñoz, P., De Miguel, M. J., Pons-Bordas, C., Gutiérrez-Ruiz, M., Aznar, F. J., Sánchez-Vizcaíno, J. M., García-Párraga, D., & Varas, J. (2022). Estudio del varamiento masivo de 14 delfines listados (*Stenella coeruleoalba*) en Cantabria. *XI Congreso de La SEC*.

Borragán, S., Manrique, P., Fernández, H., Iglesias, I., Gómez, P., & Bañeres, A. (2019). Manejo anestésico en un gorila (*Gorilla gorilla*) para procedimiento diagnóstico. *XV Congreso Nacional de La Sociedad Española de Anestesia y Analgesia Veterinaria*.

Manrique-Revuelta, P., De Paz, P., Borragán, S., López-Urueña, E., Zavala, V., Anel-López, L., Anel, L., & Álvarez, M. (2023). Spermatozoa recovery beyond the breeding season in brown bears (*Ursus arctos*): every germplasm sample counts. *Zoo and Wildlife Health Conference 2023*, 115.

Manrique-Revuelta, P., Méndez, S., Mora, J. M., & Busqué, J. (2014). Recuperación de la vegetación tras desbroce mecánico en pastos comunales de la zona costera de cantabria. *53ª Reunión Científica de La SEEP*, 57–64.

Manrique, P. (2008). Gastritis en el guepardo. *7º Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas UCM*, 18.