



Faecal cortisol, testosterone and estradiol in white-tailed deer feces from Wildlife Management and Conservation Units in Durango, Mexico.

Niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca en Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre en Durango, México.

Vega, D.¹, Gallina, S.², Correa, M.¹, Parra, M.³, Almaráz, N.¹, Chairez, I.¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Durango. Calle Sigma 119, C.P. 34220, Sigma Durango, Durango; México.

²Instituto de Ecología, A.C. Antigua Carretera a Coatepec, #351, C.P. 91070, El Haya, Veracruz, México.

³Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica. Boulevard del Maestro y Elías Piña, C.P. 88710, Reynosa, Tamaulipas; México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Vega, D., Gallina, S., Correa, M., Parra, M., Almaráz, N., Chairez, I. (2020). Faecal cortisol, testosterone and estradiol in white-tailed deer feces from Wildlife Management and Conservation Units in Durango, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 7, e714. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e714>



ABSTRACT

White-tailed deer is a sensitive species and can easily get stressed. Human activities associated with ecotourism and hunting (such as the creation of enclosures), as well as environmental factors can trigger stress. It is necessary to know the hormonal stress and reproductive levels for a better management and conservation of the species. The aim of this study was to quantify and compare fecal levels of cortisol, testosterone and estradiol in white-tailed deer in Management Units for Wildlife Conservation, and to analyze its relationship with environmental variables. Fecal groups were collected for a year in two populations: free-living (Salvador Allende) and fenced (Molinillos) white-tailed deer, in the state of Durango, Mexico. Fecal groups were collected during a year in two populations of white-

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 22nd 2018.

Accepted/Aceptado: September 27th 2019.

Available on line/Publicado: October 11st 2019.

RESUMEN

El venado cola blanca es una especie sensible y puede estresarse con facilidad. Actividades humanas asociadas al ecoturismo y la cacería (creación de encierros), así como factores ambientales pueden provocar estrés. Es necesario conocer los niveles hormonales de estrés y reproductivos para un mejor manejo y conservación de la especie. El objetivo de este trabajo fue cuantificar y comparar los niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca en Unidades de Manejo para la Conservación de la vida Silvestre, y analizar su relación con variables ambientales. Se colectaron grupos fecales durante todo un año en dos poblaciones: vida libre (Salvador Allende) y en encierro (Molinillos) en el Estado de Durango, México. Se aisló DNA fecal y se amplificó el gen SRY para conocer el sexo de los individuos. Se cuantificó cortisol, testosterona y estradiol en heces mediante kits comerciales ELISA. Se estimó la cobertura vegetal y se obtuvo información de las variables ambientales de cada sitio. Se llevó a cabo un ANOVA factorial y correlación de Pearson. Los niveles de cortisol en heces fueron más altos

*Corresponding Author:

Isaias Chairez, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Durango. Calle Sigma 119, C.P. 34220. Sigma Durango, Durango; México. Phone: +52 (618) 8142091 ext. 82646. E-mail: ichairez@hotmail.com

tailed deer. Fecal DNA was isolated and SRY gene was amplified to know the sex of the individuals. Fecal cortisol, testosterone and estradiol were measured by means of commercial ELISA kits. The vegetation cover was estimated and information on the environmental variables of each site was obtained. A factorial ANOVA and Pearson correlation were carried out. Fecal cortisol levels were highest in the free-living population ($F_{1,103}=31.87, p<0.0001$). Levels of fecal cortisol increased as testosterone increased in males from both populations. Fecal cortisol, testosterone and estradiol levels increased as winter came (reproductive season) in both populations. Higher fecal cortisol levels in the free-living population suggested the effect of enclosure does not always generate stress, under adequate management conditions.

KEY WORDS

Stress, SRY gene, fecal steroids hormones, reproduction, *Odocoileus virginianus*.

Introduction

White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) is a species of great ecological and socioeconomic importance in Mexico (Clemente *et al.*, 2015). That is why aspects like productivity and hormonal levels have to be studied for a better management of the species (Shipka *et al.*, 2007), both for its conservation or exploitation (Pelletier *et al.*, 2003). Hormones regulate individuals' physiology and behavior, as well as their growth, body condition, social behavior, and above all, reproduction (Morden *et al.*, 2011). In deer present in temperate and cold areas, photoperiod affects hormonal production, since it is responsible for the adaptation of deer to high latitudes, being the reproductive season when photoperiod decreases and reproductive hormones increase (García *et al.*, 2005). In most mammals, photoperiod is the most important environmental stimulus for determining the reproductive season, and in species with seasonal reproduction, light is the determining environmental factor of their reproductive cycles since these animals use the variation of daylight hours to know the time of the year they are in (Pérez, 2014).

Seasonal changes in vegetation availability and quality as well have been observed to possibly affect glucocorticoid production level in white-tailed deer (Millsbaugh &

en vida libre ($F_{1,103} = 31.87, p<0.0001$). En machos de ambas poblaciones, el cortisol aumentó conforme la testosterona aumentó. Los niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces aumentaron conforme las estaciones avanzaron al invierno (cuando ocurre el celo) en ambas poblaciones. Mayores niveles de cortisol fecal en la población en vida libre, sugieren que bajo buenas condiciones de manejo, el efecto del encierro no siempre es generador de estrés.

PALABRAS CLAVE

Estrés, gen SRY, hormonas esteroides fecales, reproducción, *Odocoileus virginianus*.

Introducción

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es una especie de gran importancia ecológica y socioeconómica en México (Clemente *et al.*, 2015). Por ello, aspectos como la productividad y los niveles hormonales deben ser atendidos para un mejor manejo de la especie (Shipka *et al.*, 2007), ya sea para la conservación o para su aprovechamiento (Pelletier *et al.*, 2003). Las hormonas regulan la fisiología y el comportamiento de los individuos, así como el crecimiento, la condición corporal, el comportamiento social, y sobre todo, la reproducción (Morden *et al.*, 2011). En cérvidos presentes en áreas templadas y frías, el fotoperiodo influye en la producción hormonal, ya que es el responsable de la adaptación de los cérvidos a altas latitudes, presentándose la época reproductiva cuando el fotoperiodo disminuye y las hormonas reproductivas se incrementan (García *et al.*, 2005). En la mayor parte de los mamíferos, el fotoperiodo es la señal ambiental más importante para la determinación de la estación reproductiva, y en especies con reproducción estacional la luz es el factor ambiental determinante de sus ciclos reproductivos dado que estos animales utilizan la variación de las horas luz para conocer el momento del año en que se encuentra (Pérez, 2014).

Se ha observado también que los cambios estacionales en la disponibilidad de vegetación y su calidad pueden afectar el nivel de producción de glucocorticoides en venado cola blanca (Millsbaugh & Washburn, 2004). El venado cola blanca es una especie muy sensible y es fácilmente estresado por disturbios causados por las actividades humanas, incluso aquellas asociadas a la actividad cinegética, la recreación

Washburn, 2004). White-tailed deer is a very sensitive species and gets easily stressed by disturbances caused by human activities, including those associated to hunting activities, entertainment or ecotourism, provoking alterations in their hormonal production (Brown *et al.*, 2012). This situation has economic and conservative implications; therefore, there is interest in knowing which factors influence hormonal production and for mitigating those causing stress or having deleterious effects on populations (Millsbaugh & Washburn, 2004).

Although the effects of stress on wild fauna are not well known, some research studies suggest a possible long-time deleterious physiological effect (Brown *et al.*, 2012). Glucocorticoid secretion occurs during the response to stress, which enables the animal to face stress, mobilizing energy required for this response and minimizing the energy cost in tissues which are not necessary for immediate survival (Huber *et al.*, 2003a). Regarding the relation between glucocorticoids and testosterone, glucocorticoids are believed to possess a suppressive effect on androgens production (McCoy & Ditchkoff, 2012). Testosterone, together with estradiol, constitute a group of essential sexual steroid hormones, which regulate not only reproductive patterns in females and males during the reproductive season, but also regulate sexual and physiological behavioral aspects (for instance antlers production) during the life of individuals (Soto *et al.*, 2004). Previously, hormonal levels have been measured through blood samples, which require capturing and restraining the animals; however, these activities are triggering stress (Kapke *et al.*, 1999). Stress caused by capture can affect blood sampling by modifying hormones concentrations; consequently, hormonal measurements can be biased (McCoy & Ditchkoff, 2012). Since feces can be collected without disturbing and stressing individuals, it has become a very common sampling technic in behavioral ecological and genotyping studies (Huber *et al.*, 2003b).

White-tailed deer populations present in the Sierra Madre Occidental of the state of Durango have been little studied from the hormonal point of view. At the same time, some producers have placed enclosures with the purpose of initiating or intensifying deer production or hunting activity in their properties. It is believed that a captive population and its frequent contact with people and their activities, could produce major cortisol levels in feces, and, in turn, affect reproduction. On its behalf, vegetation cover, translated as the food and protection availability for deer, could be one

o el ecoturismo, provocando alteraciones en su producción hormonal (Brown *et al.*, 2012). Dicha situación tiene implicaciones económicas y de conservación, por lo que existe el interés de conocer que factores tienen influencia sobre la producción hormonal y mitigar aquellos causantes de estrés o que tengan efectos deletéreos sobre las poblaciones (Millsbaugh & Washburn, 2004).

Aunque no se conocen bien los efectos del estrés sobre la fauna silvestre, existen investigaciones que sugieren un posible efecto fisiológico deletéreo a largo plazo (Brown *et al.*, 2012). La secreción de los glucocorticoides ocurre durante una respuesta al estrés, la cual habilita al animal a enfrentarse al estrés movilizándolo la energía requerida para la respuesta y minimizando el gasto de energía en tejidos que no son necesarios para la sobrevivencia inmediata (Huber *et al.*, 2003a). Respecto a la relación de los glucocorticoides con la testosterona, se cree que los glucocorticoides tienen un efecto de supresión en la producción de andrógenos (McCoy & Ditchkoff, 2012). La testosterona, junto con el estradiol, son un grupo de hormonas esteroides sexuales muy importantes ya que no solo regulan los patrones reproductivos en hembras y machos en la época reproductiva, sino también regulan aspectos de comportamiento sexual y fisiológicos (ej. producción de astas) durante la vida de los individuos (Soto *et al.*, 2004). Anteriormente, los niveles hormonales se han medido mediante muestras sanguíneas, lo cual requiere de la contención y captura de los animales, sin embargo, esas actividades son detonantes de estrés (Kapke *et al.*, 1999). El estrés causado por la captura puede afectar el muestreo sanguíneo al modificarse las concentraciones de las hormonas, en consecuencia, las mediciones hormonales pueden volverse sesgadas (McCoy & Ditchkoff, 2012). Dado que las heces pueden ser colectadas sin perturbar y estresar a los individuos, se ha vuelto una técnica de muestreo muy común en estudios de comportamiento, ecología y genotipificación (Huber *et al.*, 2003b).

Las poblaciones de venado cola blanca presentes en la Sierra Madre Occidental del Estado de Durango han sido poco estudiadas desde el punto de vista hormonal. Al mismo tiempo, algunos productores han colocado cercado con la intención de iniciar o intensificar la producción o actividad cinegética de venado en sus propiedades. Se cree que una población en encierro y su contacto frecuente con personas y sus actividades, podría producir mayores niveles de cortisol en heces, y esto a su vez, afectar la reproducción. Por su parte, la cobertura vegetal, traducida como disponibilidad de alimento y protección para venado, podría ser una de las principales

of the leading environmental variables triggering stress in white-tailed deer populations, as in free-living as in an enclosure. Therefore, the objectives of the present study were: 1) to identify the sex of the individuals producing feces by means of fecal Deoxyribonucleic Acid (DNA) amplification, 2) to determine cortisol, testosterone and estradiol levels in white-tailed deer feces in two populations, as in free-living as in enclosure, 3) to perform a correlational analysis between hormones and environmental variables of each site to know whether some environmental factor is fostering stress and, 4) to compare hormonal levels among populations, sexes and time of the year.

Material and Methods

Study area

White-tailed deer feces were collected in two Management Units for Wildlife Conservation (UMA) located in the municipality of Durango, Durango, Mexico. Wildlife population was present in Salvador Allende (SA). Estimated population density during winter was of 2.52 deer/km² (Vega et al., 2016). This UMA was located at coordinates 24° 71'-24° 05' N and 104° 51'-104° 56' W, with an altitude of 2,200-2,680 masl, and a temperate semi-cold and temperate semi-humid climate. This UMA had a 3,200 ha area of free movement of white-tailed deer. Main types of vegetation in this UMA were pine tree-holm oak forest, pine trees forest, and holm oak forest (González et al., 2007). The population in natural enclosure was present in Molinillos (MO). Estimated population density during winter was of 4.58 deer/km² (Vega et al., 2016). This UMA was located at coordinates 23° 36'-23° 39' N and 104° 59'-105°06' W, with an altitude of 2,000-2680 masl. This UMA had a 300 ha area enclosed with a deer fence. The climate in this site was temperate sub-humid and temperate semi-cold. Main types of vegetation were pine trees forest, pine tree-holm oak forest, holm oak forest, and pasture land (Rosales & Villanueva, 2014).

Feces sampling and classification

Fresh feces were collected every two weeks for 13 months in each UMA covering: spring (March 21st-June 21st), summer (June 22nd-Septiembre 22nd), autumn (September 23rd-December 21st) and winter (December 22nd-March 20th). Sampling period in Salvador Allende spanned from March 1st of 2015 to March 31st of 2016, and in Molinillos from October 1st of 2015 to October 31st of 2016. The sites with higher activity of white-tailed deer

variables ambientales promotora de estrés en las poblaciones de venado cola blanca, tanto en vida libre como en cautiverio. Por lo anterior, los objetivos planteados en este estudio fueron: 1) identificar el sexo de los individuos que produjeron las heces fecales mediante amplificación de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) fecal, 2) determinar los niveles de cortisol, testosterona y el estradiol en heces de venado cola blanca en dos poblaciones, tanto en vida libre como en encierro, 3) hacer un análisis correlacional entre hormonas y variables ambientales de cada sitio para conocer si algún factor ambiental está provocando estrés y, 4) comparar los niveles hormonales entre poblaciones, sexos y épocas del año.

Material y Métodos

Área de estudio

Se colectaron heces de venado cola blanca en dos Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) localizadas en el municipio de Durango, Durango, México. La población en vida libre se presentó en Salvador Allende (SA). La densidad poblacional estimada en el invierno fue de 2.52 venados/km² (Vega et al., 2016). Esta UMA se encuentra ubicada entre las coordenadas 24° 71'-24° 05' N y 104° 51'-104° 56' O, con una altitud de 2,200-2,680 masl, y un clima templado semi-frío y templado semi-húmedo. Esta UMA cuenta con un área de 3,200 ha con libre movimiento de venado cola blanca. Los principales tipos de vegetación en ésta UMA fueron bosque de pino-encino, bosque de pino y bosque de encino (González et al., 2007). La población en encierro natural estuvo presente en Molinillos (MO). La densidad poblacional estimada en el invierno fue de 4.58 venados/km² (Vega et al., 2016). Esta UMA está localizada en las coordenadas 23° 36'-23° 39' N y 104° 59'-105°06' O, con una altitud de 2,000-2680 masl. Esta UMA comprende un área de 300 ha cercadas por malla venadera. El clima en este sitio es templado subhúmedo y templado semi-frío. Los principales tipos de vegetación son bosque de pino, bosque de encino-pino, bosque de encino y pastizal (Rosales & Villanueva, 2014).

Colecta y clasificación de heces

Se colectaron heces frescas cada dos semanas por 13 meses en cada UMA cubriendo: primavera (21 marzo-21 junio), verano (22-junio-22 septiembre), otoño (23 septiembre-21 diciembre) e invierno (22 diciembre-20 marzo). El periodo de muestreo en Salvador Allende abarcó del primero de marzo 2015 al 31 marzo 2016, y para Molinillos fue del primero de octubre 2015 al 31 octubre 2016. En muestreos previos al periodo de colecta,

were established for each UMA, in sampling taken previous to the sampling period. Two 1,000-m-long transects were gone through during each sampling visit. Twenty-thirty superior fecal pellets of each group found during sampling were placed in 50 mL Falcon® tubes with ethanol 96 % to be used in DNA extraction. The other part of the pellets was conserved in plastic bags at -20 °C. Length and width of fecal pellets of each group were measured before storing them in freezing conditions. The volume of fecal pellets was calculated from these data, and the mean was obtained per fecal group to assign them to a category of age and sex. For this, belonging values were calculated for three groups (adult females, adult males, and juveniles) through fuzzy K-means clustering algorithm (Sánchez-Rojas *et al.*, 2004; Sánchez-Rojas *et al.*, 2009). Fuzzy Clustering Tool (Equihua, 2000) software was used. The identification of sex was performed through molecular methods, to obtain the sex of fecal groups of juveniles, as well as to confirm sex classification in fecal groups of adults.

DNA extraction in white-tailed deer feces

DNA was isolated through CTAB-acetate method from two to four pellets maintained in ethanol 96 %. Firstly, alcohol was evaporated for 45 min at room temperature in Petri dishes. Once dried, they were chopped with sterile bistouries, and 0.5 g of the sample was placed in 1.5 mL micro-centrifuge tubes. One mL of extraction buffer (2 % CTAB, 100 mM TRIS, pH 8, 20 mM EDTA, pH 8, 1.4 M NaCl and 1 % PVP) and 5 µL of 2-mercaptoethanol were added to each tube. Tubes were shaken in vortex (Labnet®) at 3,400 rpm for 10 s and placed one hour in digestion in a thermos-shaker (TermoFisher® mod. MSC-100) at 65 °C. After one hour of digestion, 50 µL of Proteinase K were added and placed in digestion one more hour at 65 °C. To separate the solid part of the sample, tubes were placed in a centrifuge (Eppendorf® 5415) for 15 min at 13,200 rpm. The supernatant was placed in new tubes, and 400 µL of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) were added, they were shaken through vortex at 3,400 rpm for 10 s and placed in the centrifuge for 6 minutes at 13,200 rpm. The supernatant was placed in new tubes, and 300 µL of ammonium acetate (3 M, pH 5.2) and 600 µL of isopropanol were added. Tubes were maintained at -20 °C overnight. Afterward, tubes were centrifuged for 15 min at 13,200 rpm. The supernatant was thrown away, and a DNA pellet remained at the bottom of the tube. DNA pellet was washed by adding 500 µL of ethanol 80 %, was shaken in vortex for 10 s at 3,400 rpm and was centrifuged for 6 min at 13,200 rpm. The washing step was performed twice. Finally, ethanol 80 % was thrown

se establecieron los sitios con mayor actividad de venado cola blanca para cada UMA. Se recorrieron dos transectos de 1,000 m de largo durante cada visita de muestreo. Se colocaron de 20-30 pellets fecales superiores de cada grupo encontrado, en tubos Falcon® de 50 mL con etanol al 96 % para ser utilizados en la extracción de DNA. Otra parte de los pellets se guardó en bolsas plásticas a -20 °C. Se midió el largo y ancho de los pellets fecales de cada grupo antes de colocarlos en congelación. A partir de allí, se calculó el volumen de los pellets fecales y se obtuvo una media por grupo fecal para asignarse a una categoría de edad y sexo. Para ello, se calcularon los valores de pertenencia para tres grupos (hembras adultas, machos adultos y juveniles) mediante el algoritmo de K-medias difuso (Sánchez-Rojas *et al.*, 2004; Sánchez-Rojas *et al.*, 2009). Se utilizó el programa Fuzzy Clustering Tool (Equihua, 2000). Para la obtención del sexo de los grupos fecales provenientes de juveniles así como para comprobar la clasificación de sexo en grupos fecales de adultos, se realizó una identificación de sexo mediante métodos moleculares.

Extracción de DNA en heces de venado cola blanca

Se aisló DNA mediante el método CTAB-acetato a partir de dos a cuatro pellets mantenidos en etanol al 96 %. Primero, se dejó evaporar el alcohol por 45 min a temperatura ambiente en cajas Petri. Ya secos, se picaron con navajas estériles y se colocaron 0.5 g de muestra en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de buffer de extracción (2 % CTAB, 100 mM TRIS, pH 8, 20 mM EDTA, pH 8, 1.4 M NaCl y 1 % PVP) y 5 µL de 2-mercaptoetanol a cada tubo. Se agitaron los tubos en vórtex (Labnet®) a 3,400 rpm por 10 s y se colocaron una hora en digestión en un termoagitador (TermoFisher® mod.MSC-100) a 65 °C. Pasada una hora de digestión, se agregaron 50 µL de Proteinasa K, y se colocaron en digestión una hora más a 65 °C. Para separar la parte sólida de la muestra, los tubos se colocaron en la centrífuga (Eppendorf® 5415) por 15 min a 13,200 rpm. El sobrenadante se colocó en tubos nuevos y se agregaron 400 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitaron mediante vórtex a 3,400 rpm por 10 s y se colocaron en la centrífuga por 6 minutos a 13,200 rpm. El sobrenadante se colocó en tubos nuevos y se agregaron 300 µL de acetato de amonio (3 M, pH 5.2) y 600 µL de isopropanol. Los tubos se mantuvieron a -20 °C por toda la noche. Después, se centrifugaron los tubos por 15 min a 13,200 rpm. El sobrenadante se desechó, dejando un pellet de DNA en el fondo del tubo. El pellet de DNA se lavó añadiendo 500 µL de etanol al 80 %, se agitó en vórtex por 10 s a 3,400 rpm y se centrifugó durante 6 min a 13,200 rpm. El paso de lavado se realizó dos veces. Al final, el etanol al 80 % se desechó y se secaron los tubos. El DNA fue hidratado con 55 µL de agua

away, and the tubes were dried. DNA was hydrated with 55 μL of molecular grade water (Cellgro Corning® 46000). Purity and quantity of DNA in $\text{ng}/\mu\text{L}$ was obtained through a Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific®) spectrophotometer. The DNA quality was observed through 1 % agarose gels dyed with ethidium bromide.

Sex identification from DNA in feces

To identify sex in individuals that fecal groups produced, a fragment of SRY gene was amplified utilizing Polymerase Chain Reaction (PCR) with the primers pair: SRY forward CAT CTT GTC TGT GTG TCG TG and SRY reverse: CGG GTA GTG TCG TTT GTC TA (Lounsberry et al., 2015). Three samples of tissue coming from adult male deer hunted in Salvador Allende UMA were used as positive controls. Final concentrations for PCR reaction were 100-150 $\text{ng}/\mu\text{L}$ of DNA, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM dNTP's, 0.6 pM of PCR primers and 0.750 unities of Taq DNA polymerase. PCR conditions were 3 min at 95 °C of initial denaturalization, 35 cycles of 30 s at 94 °C, 1.30 min at 58 °C, 1 min at 72 °C, finally, 10 min at 72 °C of final elongation. Each event of PCR reaction includes a positive control and negative control (without DNA). PCR products were observed in 1 % agarose gel dyed with ethidium bromide. A molecular weight marker, as well as positive and negative controls, were added in each gel. To ensure the quality of the results, DNA extractions, PCR reactions, and the observation of PCR products in gel were performed in duplicate. Samples that did not present amplification were taken as females, while samples displaying one band (~200 pb) were taken as males (Figure 1). Samples showing diffuse bands were not taken into account for the study.

Hormonal analysis

0.5 g of the frozen stored feces were taken to realize total steroid extraction. For total steroid extraction, Pavitt et al. (2015) method was used with some modifications. Samples were defrosted and placed in 2 mL micro-centrifuge tubes, and 720 μL of methanol and 80 μL of distilled water were added. Tubes were shaken in vortex for 10 min at 3,400 rpm and maintained in a plate shaker overnight in constant movement. Tubes were centrifuged for 15 min at 2000 rpm, and the supernatant was transferred to new sterile tubes. These extracts of total steroid were diluted 1:20. 20 μL of the diluted extracts were used for hormone quantification. For this, Cortisol ELISA Kit, Estradiol Elisa Kit, and Testosterone Elisa Kit commercial kits, from Cayman® brand, were used, according to manufacturer indications. For cortisol, the sensitivity was of 0.07 ng/g and

grado biología molecular (Cellgro Corning® 46000). Se obtuvo la pureza y cantidad de DNA en $\text{ng}/\mu\text{L}$ mediante un espectrofotómetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific®). La calidad del DNA fue observada mediante geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio.

Identificación de sexo a partir del DNA en heces

Para identificar el sexo de los individuos que produjeron los grupos fecales, se amplificó un fragmento del gen SRY mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el par de iniciadores: SRY forward CAT CTT GTC TGT GTG TCG TG y SRY reverse: CGG GTA GTG TCG TTT GTC TA (Lounsberry et al., 2015). Se utilizaron tres muestras de tejidos provenientes de venados machos adultos cazados en la UMA Salvador Allende como controles positivos. Las concentraciones finales para la reacción de PCR fueron 100-150 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM dNTP's, 0.6 pM de iniciadores de PCR y 0.750 unidades de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de PCR fueron 3 min a 95 °C de desnaturalización inicial, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1.30 min a 58 °C, 1 min a 72 °C, finalmente, 10 min a 72 °C de elongación final. Cada evento de reacción de PCR incluyó un control positivo y un control negativo (sin DNA). Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. En cada gel se agregó marcador de peso molecular y controles positivo y negativo. Para asegurar los resultados, las extracciones de DNA, reacciones de PCR, y la observación de los productos en gel se llevaron a cabo por duplicado. Las muestras que no mostraron amplificación se tomaron como hembras, mientras que las muestras que mostraron una banda (~200 pb) se tomaron como machos (Figura 1). Las muestras que mostraron bandas difusas no se tomaron en cuenta para el estudio.

Análisis hormonales

Se tomaron 0.5 g de las heces almacenadas en congelación para realizar la extracción de esteroides totales. Para la extracción de esteroides totales se utilizó el método de Pavitt et al. (2015) con modificaciones. Se descongelaron las muestras y se colocaron en tubos de microcentrifuga de 2 mL y se agregaron 720 μL de metanol y 80 μL de agua destilada. Los tubos fueron agitados en vórtex por 10 min a 3,400 rpm y se mantuvieron en un agitador de placas durante toda una noche en movimiento constante. Se centrifugaron los tubos por 15 min a 2000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos estériles nuevos. Estos extractos de esteroides totales se diluyeron 1:20. Se utilizaron 20 μL de los extractos diluidos para la cuantificación de las hormonas. Para esto se utilizaron los kits comerciales Cortisol ELISA Kit, Estradiol Elisa Kit y Testosterone Elisa Kit de la marca Cayman® y se siguieron las instrucciones

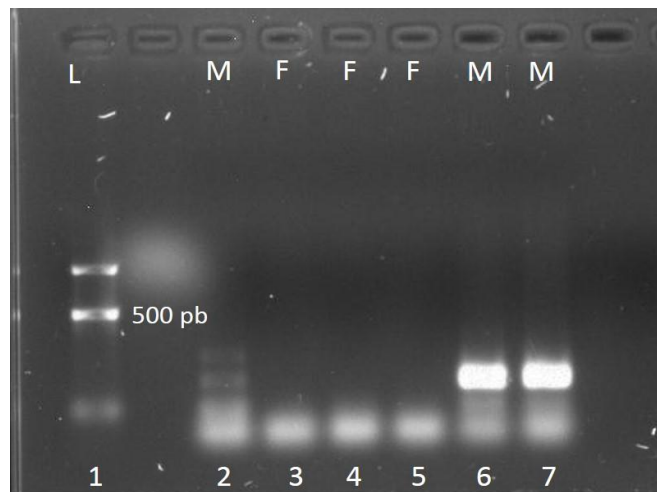


Figure 1. Agarose gel with SRY gene marker amplifications to identify sex in fecal samples. Samples 2, 3, 4, 5 are from fecal DNA. Samples 6 and 7 are from tissue DNA. (L=ladder, M=male, F=female).

Figura 1. Gel de agarosa con las amplificaciones del marcador del gen SRY para la identificación del sexo en las muestras. Las muestras 2, 3, 4 y 5 son de DNA en heces. Las muestras 6 y 7 son de DNA de tejidos. (MP=marcador de peso molecular, M=macho, H=hembra).

intra- and inter-assay coefficients of variation were of <15 and <25 %, respectively. For estradiol, the sensitivity was of 0.03 ng/g and intra- and inter-assay coefficients of variation were of <18 and <30 %, respectively. For testosterone, the sensitivity was of 0.012 ng/g and intra- and inter-assay coefficients of variation were of <20 and <15 %, respectively. Samples were analyzed in an ELISA plate-reader, EliRead brand of KontroLab®, and the concentration of each sample was determined by using the equation obtained when plotting standards for each hormone.

Vegetation and environmental variables sampling

Canfield lines and point-centered quadrants were performed to estimate vegetation cover at each season, in parallel sites to sampling sites of fecal groups. Canfield lines were realized in a portion of 2 m until reaching 20m of long for a higher sampling representation (Mostacedo & Fredericksen, 2000). In addition, ten sites were randomly sampled in point-centered quadrants, for bushy species (Mostacedo & Fredericksen, 2000). Data on temperature, precipitation, and photoperiod were obtained from governmental institutions, Water National

de fabricante. Para el cortisol, la sensibilidad fue 0.07 ng/g y los coeficiente de variación intra e inter ensayos fueron <15 y <25 %, respectivamente. Para estradiol, la sensibilidad fue 0.03 ng/g y los coeficientes de variación intra e inter ensayos fueron <18 y <30 %, respectivamente. Para la testosterona, se tuvo una sensibilidad de 0.012 ng/g y los coeficientes de variación entre ensayos fueron <20 y <15 %, respectivamente. Las muestras se analizaron en un lector de ELISA marca EliRead de KontroLab® y se determinó la concentración de cada muestra utilizando la ecuación obtenida al graficar los estándares en cada una de las hormonas.

Muestreo de vegetación y variables ambientales

Se llevaron a cabo líneas Canfield y cuadrantes centrados en puntos para estimar la cobertura vegetal en cada estación, en sitios paralelos a los recorridos de muestreos de grupos fecales. Las líneas Canfield se realizaron en porciones de 2 m hasta cumplir un largo de 20 m para darle más representatividad al muestreo (Mostacedo & Fredericksen, 2000). Además, se muestrearon 10 sitios al azar en cuadrantes centrados en puntos, para las especies arbustivas (Mostacedo & Fredericksen, 2000). Los datos acerca de temperatura, precipitación y fotoperiodo fueron obtenidos de instituciones

Table 1.
Number faecal groups collected by season in two Wildlife Management and Conservation Units (UMA) in Durango, Mexico, categorized by the age (obtained by faecal morphometry) and sex (by SRY gene marker amplification). (F = females, M = males).

Tabla 1.
Grupos fecales colectados por época del año en dos Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) de Durango, México, categorizados por edad mediante morfometría de pellets fecales y sexo, utilizando amplificación del marcador del gen SRY de DNA fecal.

Season	Salvador Allende					Molinillos				
	Adults		Yearlings		Total	Adults		Yearlings		Total
	F	M	F	M		F	M	F	M	
Spring	10	2	15	9	36	16	3	19	18	56
Summer	6	1	2	4	13	3	6	6	21	36
Autumn	8	1	6	8	23	40	13	26	51	130
Winter	16	3	12	9	40	20	2	14	15	51
Total	40	7	35	30	112	79	24	65	105	273

Commission (CONAGUA) and Mexican Institute of Water Technology (IMTA).

gubernamentales, Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

Statistical analysis

To determine differences in steroid hormone levels between sexes and between UMA at each season of the year, a factorial analysis of variance (ANOVA) was performed, where factors were UMA, season and sex (Proc GLM, SAS Institute 9.2, Cary, NC, USA). Besides, Pearson coefficient of correlation was obtained to connect hormone quantity (cortisol, testosterone or estradiol) for each UMA with its environmental variables as temperature, precipitation, photoperiod and vegetation cover (Proc Corr, SAS Institute 8.0, Cary, NC, USA).

Results and Discussion

A total of 385 fresh feces were collected in both UMA, covering all seasons (Table 1). Through the amplification of SRY gene fragment, 219 feces were identified as female and 166 as males (Table 1). Male: female relationship for Salvador Allende was 1:2.02 and for Molinillos 1:1.12. Generally, cortisol, testosterone, and estradiol levels in feces increased as seasons progressed to winter, and photoperiod decreased (Figure 2). Significant negative correlations were found between estradiol with temperature and photoperiod in SA (Table 2). On the

Análisis estadístico

Con el objetivo de conocer las diferencias en los niveles de las hormonas esteroides entre sexos y entre UMA en cada estación del año, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) factorial donde los factores fueron, UMA, estación y sexo (procedimiento GLM, SAS Institute 9.2, Cary, NC, USA). Además, se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson para relacionar la cantidad de hormonas (cortisol, testosterona o estradiol) por cada UMA con sus variables ambientales como temperatura, precipitación, fotoperiodo y cobertura vegetal (procedimiento Corr, SAS Institute 8.0, Cary, NC, USA).

Resultados y Discusión

Se colectó un total de 385 de heces frescas en ambas UMA abarcando todas las estaciones (Tabla 1). Mediante la amplificación del fragmento del gen SRY, se identificaron 219 heces como hembra y 166 como machos (Tabla 1). La relación macho: hembra para Salvador Allende fue 1:2.02 y para Molinillos 1:1.12. En general, los niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces se incrementaron conforme las estaciones avanzaron al invierno y el fotoperiodo disminuyó (Figura 2). Se encontraron correlaciones negativas significativas entre estradiol con temperatura

Table 2.
Pearson correlation coefficients matrix between cortisol, testosterone (T), estradiol (E2), and environmental variables in two Wildlife Management and Conservation Units (UMA) in Durango, Mexico.

Tabla 2.
Matriz de coeficientes de correlación de Pearson entre cortisol, testosterona (T), estradiol (E2), y las variables ambientales en dos Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA), en Durango México.

Salvador Allende							
	Cortisol	T	E2	Temperature	Precipitation	Photoperiod	Cover
Cortisol	-	0.37300	0.16748	-0.14172	0.16823	-0.26218	0.33104
<i>p</i>		0.0463	0.3763	0.4550	0.3742	0.1616	0.0740
T	-	-	-0.31834	-0.01084	0.09551	-0.13959	0.34732
<i>p</i>			0.0924	0.9555	0.6221	0.4702	0.0649
E2	-	-	-	-0.60536	-0.35185	-0.34895	-0.23595
<i>p</i>				0.0004	0.0566	0.0588	0.2094
Molinillos							
	Cortisol	T	E2	Temperature	Precipitation	Photoperiod	Cover
Cortisol	-	0.43491	0.38241	-0.51328	-0.21410	-0.73204	-0.58998
<i>p</i>		<0.0001	0.0002	<.0001	0.0372	<.0001	<.0001
T	-	-	0.20859	-0.34290	-0.08039	-0.33039	-0.32017
<i>p</i>			0.0498	0.0009	0.4488	0.0014	0.0020
E2	-	-	-	-0.44417	-0.12131	-0.51178	-0.40643
<i>p</i>				<.0001	0.2441	<.0001	<.0001

p=significance; Salvador Allende=free-living population; Molinillos=enclosed population.

p=significancia; Salvador Allende=población libre; Molinillos=población encerrada.

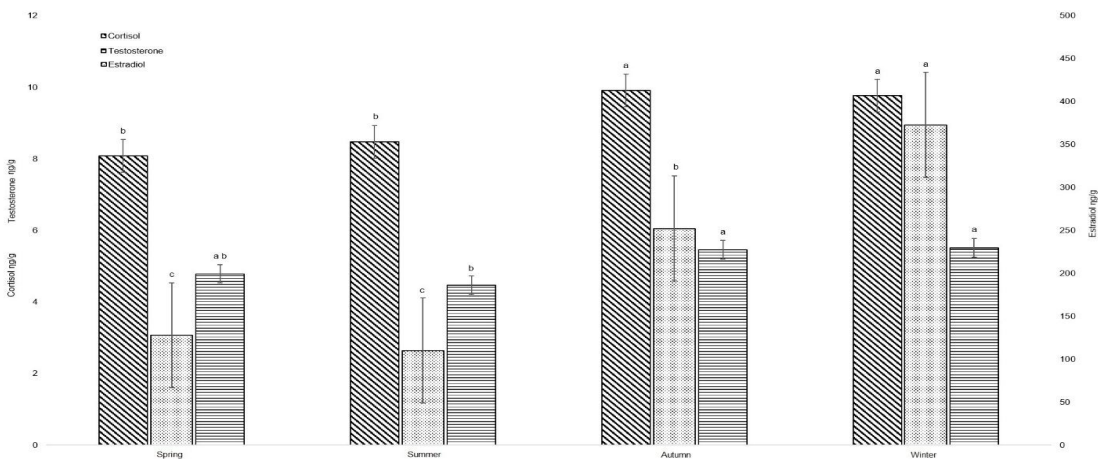


Figure 2. Cortisol, testosterone, and estradiol mean levels in feces from white-tailed deer in two Wildlife Management and Conservation Units (UMA) in Durango, Mexico. The same letter on the bars with the same pattern indicates no significant differences. (Cortisol $F_{3,103} = 16.28$, $p < 0.0001$, testosterone $F_{3,103} = 3.73$, $p = 0.0136$, estradiol $F_{3,103} = 6.68$, $p = 0.0004$).

Figura 2. Niveles medios por estación de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca de dos Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) en Durango, México. La misma letra sobre barras con mismo fondo indica no diferencias significativas. (Cortisol $F_{3,103} = 16.28$, $p < 0.0001$, testosterona $F_{3,103} = 3.73$, $p = 0.0136$, estradiol $F_{3,103} = 6.68$, $p = 0.0004$).

Table 3.
Environmental characteristics by season in two Wildlife Management and Conservation Units (UMA) in Durango, Mexico, during 2015 and 2016.

Tabla 3.
Características ambientales estacionales presentadas en dos Unidades de Manejo para Conservación de Vida Silvestre (UMA) en Durango, México, durante 2015 y 2016.

Season	Salvador Allende				Molinillos			
	T (°C)	PP (mm)	Photoperiod (h)	Cover (%)	T (°C)	PP (mm)	Photoperiod (h)	Cover (%)
Spring	9.2	2.6	13.31	36.5	2.9	1.1	12.92	57.8
Summer	11.2	13.8	12.95	75.2	11.3	8.9	12.99	85.8
Autumn	4.0	0.0	11.15	66.5	4.8	0.3	11.28	54.4
Winter	2.7	0.0	11.09	57.4	0.3	0.0	11.15	51.9

T = mean temperature by season. PP=mean pluvial precipitation by season. Photoperiod=mean hours of daylight by season. Cover=percentage of vegetal cover of browse-shrub stratus by season.

T=temperatura media por temporada. PP=precipitación pluvial media por estación. Fotoperíodo=horas medias de luz natural por temporada. Cobertura=porcentaje de cobertura vegetal de estratos de arbusto de exploración por temporada.

other hand, in MO, a negative correlation was observed between cortisol with temperature and photoperiod, testosterone with temperature and photoperiod, estradiol with temperature and photoperiod (Table 2). Seasonal environmental characteristics for each UMA were shown in Table 3. The increase in hormonal levels in feces coincided with the reduction of photoperiod and the presence of the reproductive season (autumn-winter). This is because photoperiod was the primary environmental mechanism which controls seasonal changes through the regulation of the hypothalamus-pituitary-gonads axis (Li *et al.*, 2001), since the pineal gland functioned as a neuroendocrine translator of the circadian and circannual variation of the photoperiod and produced melatonin in response to darkness, and high levels of melatonin rise steroid reproductive hormone production (Bubenik, 2006). The adaptive strategy to photoperiod ensured that pregnancy and lactation period coincide with the period where there were the highest source and variety of food (Li *et al.*, 2001).

Regarding vegetation, no correlation was found between steroid hormones and vegetation cover in SA. However, a negative correlation was observed between vegetation cover and cortisol, testosterone, and estradiol in MO (Table 2). Cortisol levels could be influenced by diet and vegetation type. During winter, deer living in temperate areas had to deal with a reduced abundance of plants and a low forage quality, and, in turn, with high energy demands caused by thermoregulation and locomotion (Taillon & Côté, 2008).

y fotoperíodo en la SA (Tabla 2). Por su parte, para MO, se observó una correlación negativa entre el cortisol con temperatura y fotoperíodo, testosterona con temperatura y fotoperíodo, estradiol con temperatura y fotoperíodo (Tabla 2). Las características ambientales estacionales para cada UMA se muestran en el Tabla 3. El aumento en los niveles hormonales en heces coincide con la disminución del fotoperíodo y la presencia de la época reproductiva (otoño-invierno). Esto es porque el fotoperíodo es el principal mecanismo ambiental que controla los cambios estacionales mediante la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Li *et al.*, 2001) ya que la glándula pineal funciona como un traductor neuroendocrino de la variación circadiana y circannual del fotoperíodo y produce melatonina en respuesta de la oscuridad, y altos niveles de melatonina eleva la producción de hormonas esteroides reproductivas (Bubenik, 2006). La estrategia de adaptación al fotoperíodo, asegura que la preñez y el periodo de lactancia coincidan con el periodo donde existe la mayor fuente y variedad de alimento (Li *et al.*, 2001).

Respecto a la vegetación, no se encontró correlación entre las hormonas esteroides y la cobertura vegetal en SA. Sin embargo, se observó correlación negativa entre la cobertura vegetal y cortisol, testosterona y estradiol en MO (Tabla 2). Los niveles de cortisol pueden ser influenciados por la dieta y el tipo de vegetación. Durante el invierno, los cérvidos que viven en áreas templadas tienen que lidiar con una reducida abundancia de plantas y la baja calidad del forraje, y a su vez, con altas demandas de energía causadas por

When body condition is low, herbivores used body reserves and muscle proteins to survive, rising glucocorticoids secretion, since they mobilized energetic reserves required to face environmental conditions (Huber *et al.*, 2003a). In this study, cortisol levels in feces were not different between populations for autumn and winter. However, in spring and summer, the free-living population had higher cortisol levels in feces than the population in the enclosure and the vegetation cover was lower during this period, although the correlation was not statistically significant (Table 4).

Average cortisol level in feces was higher in SA than in MO ($F_{1,103}=31.87, p<0.0001$) (Figure 3). These differences were more evident in spring and summer ($F_{3,103}=8.17, p<0.0001$) (Table 4). For enclosure conditions, cortisol levels were expected to be higher in MO. Millspaugh & Washburn (2004) observed that wild animals which were submitted to enclosures were able to produce a higher glucocorticoid quantity than free-living animals. This is because a bit before a stressing situation was produced, the hypothalamus-pituitary-adrenal axis was activated, and the results were the high glucocorticoid production (He *et al.*, 2004), but, as time progressed and stress-causing conditions carried on,

la termorregulación y locomoción (Taillon & Côté, 2008). Cuando la condición corporal es baja, los herbívoros utilizan las reservas corporales y las proteínas de los músculos para sobrevivir, esto eleva la secreción de los glucocorticoides, dado que movilizan las reservas energéticas necesarias para enfrentar las condiciones ambientales (Huber *et al.*, 2003a). En este estudio, los niveles de cortisol en las heces no fueron diferentes entre las poblaciones para el otoño y el invierno. Sin embargo, en la primavera y el verano, la población en vida libre tuvo niveles más altos de cortisol en heces y la cobertura vegetal fue menor en esa época, aunque la correlación no fue significativa estadísticamente (Tabla 4).

El nivel medio de cortisol en heces fue mayor en SA que en MO ($F_{1,103}=31.87, p<0.0001$) (Figura 3). Esas diferencias fueron más evidentes en primavera y verano ($F_{3,103}=8.17, p<0.0001$) (Tabla 4). Por las condiciones del encierro, se esperaba que los niveles de cortisol fueran más altos en MO. Millspaugh & Washburn (2004) observaron que animales silvestres que se han sometido al encierro pueden producir mayor cantidad de glucocorticoides que los animales en vida libre. Esto es porque un poco antes de que se produzca una situación de estrés, el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal se activa y los resultados

Table 4.
Cortisol, testosterone and estradiol levels in feces from white-tailed deer in two Wildlife Management and Conservation Units (UMA) in Durango, Mexico.

Tabla 4.
Niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca en dos Unidades de Manejo para la Conservación de vida Silvestre (UMA) en Durango, México.

Season	UMA	Females			Males		
		Cortisol ng/g	T ng/g	E2 ng/g	Cortisol ng/g	T ng/g	E2 ng/g
Spring	SA	9.64 ± 0.50	3.43 ± 1.00	287.87 ± 125.50	8.64 ± 0.94	3.75 ± 1.00	153.49 ± 115.93
	M	8.07 ± 0.67	5.02 ± 1.15	112.91 ± 83.68	7.76 ± 0.47	4.90 ± 1.07	125.39 ± 84.61
Summer	SA	10.18 ± 0.84	5.06 ± 0.99	181.62 ± 67.37	9.57 ± 0.77	4.18 ± 0.95	203.91 ± 80.45
	M	8.36 ± 0.62	4.94 ± 0.75	103.83 ± 42.72	7.63 ± 0.56	4.29 ± 0.70	79.10 ± 39.20
Autumn	SA	9.88 ± 0.49	4.99 ± 1.16	148.80 ± 163.33	10.33 ± 1.20	5.04 ± 0.99	321.10 ± 150.25
	M	9.92 ± 0.55	4.97 ± 1.44	279.60 ± 235.47	9.89 ± 1.18	5.70 ± 1.26	241.10 ± 198.64
Winter	SA	10.09 ± 0.83	3.92 ± 1.15	392.37 ± 162.45	9.48 ± 1.15	4.30 ± 0.51	319.60 ± 144.98
	M	10.12 ± 0.66	4.39 ± 1.64	397.19 ± 177.81	9.52 ± 0.88	5.54 ± 0.96	344.60 ± 168.29

T=testosterone. E=estradiol. SA=Salvador Allende, free-living population. M=Molinillos, enclosed population.

T=testosterona. E=estradiol. SA=Salvador Allende, población libre. M=Molinillos, población cerrada.

the body may create a regulatory response in such a way that glucocorticoids production decreases below normal levels and may reflect the final step of stress in animals that have been reared in captivity since they were born (Linklater et al., 2010).

This phenomenon could be an explanation for the population in Molinillos, since this population has been maintained for 13 years in natural enclosure. However, He et al. (2004) observed that in reproduction center of musk deer (*Moschus sp.*) in semi-captivity or natural enclosure, individuals showed less stress-associated behavior (for instance anxiety and hypersensitivity) than those who lived in captivity. Therefore, environments created in natural enclosures were suggested not to be detrimental for musk deer (Liu et al., 2010). Contrary to MO, hunting activity was allowed in SA, and therefore cortisol levels in feces in this UMA could have been affected by this activity. This may suggest that natural enclosure conditions maintained in Molinillos were not generating high stress levels, and probably that the population density was not high enough yet to affect stress hormones production.

Cortisol was observed to decrease in males as testosterone decreased as well in both UMA (Table 4). A significant correlation was observed as well between testosterone and estradiol in MO (Table 2). McCoy & Ditchkoff (2012) reported that reproductive activity rose glucocorticoid levels in white-tailed deer males, as observed in the present study; Pelletier et al. (2003) observed the same in bighorn sheep (*Ovis canadensis*) and Chunwang et al. (2004) in Père David's deer (*Elaphurus davidianus*). In this study, the highest cortisol levels in both UMA were observed to be present before the reproductive season and to be maintained in winter. Similarly, these high cortisol levels correspond to testosterone levels (Table 4). The increase in cortisol was attributed to the increase of testosterone that, in turn, promote aggressive interactions among males with the purpose of establishing dominance (Chunwang et al., 2004). In white-tailed deer, competition among males to mate with a higher number of females in estrum, through the intimidation of other males, occurred at the beginning of the reproductive season to establish or maintain hierarchy of dominance and to be able to reproduce (Ronsberry et al., 2001; Garcia et al., 2005). As animals which exerted dominance as those which were subordinates have been observed to present

son la alta producción de glucocorticoides (He et al., 2004) pero, conforme el tiempo avanza y las condiciones causantes de estrés continúan, el cuerpo puede crear una respuesta regulatoria de tal manera que la producción de glucocorticoides se disminuye debajo de los niveles normales y pueden reflejar la etapa final del estrés en los animales que han sido criados en cautiverio desde el nacimiento (Linklater et al., 2010).

Este fenómeno podría ser una explicación para la población en Molinillos, dado que esta población se ha mantenido 13 años en encierro natural. Sin embargo, He et al. (2004) observaron que en centros de reproducción de ciervo almizclero (*Moschus sp.*) en semi-cautiverio o encierros naturales, los individuos mostraron menos comportamiento asociado al estrés (ej. agitación e hipersensibilidad) que aquellos que vivían en cautiverio. Entonces, se sugiere que los ambientes creados en los encierros naturales no son perjudiciales en ciervo almizclero (Liu et al., 2010). A diferencia de MO, en SA está permitida la actividad cinegética, y entonces los niveles de cortisol en heces en esta UMA podrían haber sido afectados por esta actividad. Esto puede sugerir que las condiciones de encierro natural mantenidas en Molinillos no están generando altos niveles de estrés, y probablemente la densidad poblacional aún no es lo suficientemente alta para afectar la producción de hormonas de estrés.

Se observó en los machos, que el cortisol disminuyó conforme la testosterona también disminuyó en ambas UMA (Tabla 4). También se observó en MO, correlación significativa entre testosterona y estradiol (Tabla 2). McCoy & Ditchkoff (2012) comentaron que la actividad reproductiva eleva los niveles de glucocorticoides en machos de venado cola blanca, así como ellos; Pelletier et al. (2003) observaron lo mismo en el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) y Chunwang et al. (2004) en ciervo del padre David (*Elaphurus davidianus*). En este estudio se observó que los niveles más altos de cortisol en ambas UMA se presentaron antes de la época reproductiva y se mantuvieron en el invierno. Estos niveles altos de cortisol corresponden de igual manera a los niveles de testosterona (Tabla 4). El aumento en cortisol se atribuye al incremento de la testosterona, que a su vez, fomenta las interacciones agresivas entre los machos con el objetivo de establecer dominancia (Chunwang et al., 2004). En el venado cola blanca, la competencia entre machos para aparearse con un mayor número de hembras en estru, mediante la intimidación de otros machos, ocurre al inicio de la época reproductiva para establecer o mantener sus jerarquías de dominancia y poder reproducirse (Ronsberry et al., 2001; Garcia et al., 2005). Se ha observado que tanto los animales que ejercen dominancia como aquellos subordinados

high levels of stress and cortisol production rose a bit at the beginning of the reproductive season when the hierarchy was established (Bartos *et al.*, 2010). In this study, this was corroborated while observing a positive correlation between cortisol and testosterone in feces in both populations.

Regarding cortisol levels between sexes, females were observed to have higher levels than males ($F_{1,103}=27.85$, $p<0.0001$), especially during summer and winter ($F_{3,103}=3.46$, $p=0.0192$) (Table 3). Huber *et al.* (2003a) observed higher levels of cortisol metabolites in winter (December and January) than in the rest of the year in red deer, but they did not find any significant differences between females and males in a month in particular. On the other hand, He *et al.* (2014) found differences in cortisol levels between sexes for musk deer, males had significantly less fecal glucocorticoids than females. McCoy & Ditchkoff (2012) observed higher levels of fecal glucocorticoids in females of white-tailed deer before and during the reproductive season. Yoshimura *et al.* (2003) mentioned that the difference in adrenocortical activity between females and males was common in various species. These differences may be caused by reproductive hormones, glucocorticoids receptors, and their binding proteins. Differences between sexes may reflect a difference in steroid metabolism, extraction routes, and response to the pituitary gland (Huber *et al.*, 2003a).

In this study, females were observed to show higher testosterone levels in feces than males in summer ($F_{3,103}=5.79$, $p=0.0011$) (Table 3). López & Montes (2016) observed a higher quantity of metabolites of fecal testosterone in females in white-tailed deer, although it was not significantly different. Also, they found that males produced more estradiol during the not reproductive season, while females produced more estradiol during the reproductive season. High estradiol levels in males before or during the reproductive season were explained by the importance of this hormone in spermatogenesis (García *et al.*, 2005). During the not reproductive season (spring and summer), estradiol can be associated with antlers production, development, and growth. Bubenik *et al.* (1997) observed that antlers growth occurred when blood testosterone concentrations were minimal, but the hormone rapidly increased during the phase of antlers mineralization, reaching a maximum a bit before the reproductive season.

pueden presentar altos niveles de estrés y la producción de cortisol se eleva poco antes del inicio de la época reproductiva cuando las jerarquías son establecidas (Bartos *et al.*, 2010). En este estudio, esto se corrobora al observarse una correlación positiva entre el cortisol y la testosterona en heces en ambas poblaciones.

Respecto a los niveles de cortisol entre sexos, se observó que las hembras tuvieron niveles más altos que los machos ($F_{1,103}=27.85$, $p<0.0001$), especialmente en el verano y el invierno ($F_{3,103}=3.46$, $p=0.0192$) (Tabla 3). Huber *et al.* (2003a) observaron niveles más altos de metabolitos de cortisol en invierno (diciembre y enero) que en todo el resto del año en ciervo rojo, pero no encontraron diferencias significativas entre hembras y machos en algún mes en particular. Por otro lado, He *et al.* (2014) encontraron diferencias en los niveles de cortisol entre sexos para ciervo almizclero, los machos tuvieron significativamente menos glucocorticoides fecales que las hembras. McCoy & Ditchkoff (2012) observaron niveles más altos de glucocorticoides fecales en hembras de venado cola blanca antes de la época reproductiva y durante la época reproductiva. Yoshimura *et al.* (2003) mencionan que la diferencia en la actividad adrenocortical entre hembras y machos es común en varias especies. Esas diferencias pueden ser causadas por las hormonas reproductivas, los receptores de los glucocorticoides y sus proteínas de unión. Las diferencias entre sexos puede reflejar una diferencia en el metabolismo de los esteroides, las vías de excreción y la respuesta de la glándula pituitaria (Huber *et al.*, 2003a).

En este estudio se observó que las hembras mostraron más altos niveles de testosterona en heces que los machos en verano ($F_{3,103}=5.79$, $p=0.0011$) (Tabla 3). López & Montes (2016) observaron una cantidad mayor de metabolitos de testosterona fecal en hembras en venado cola blanca, aunque no fueron estadísticamente diferentes. Además encontraron que los machos produjeron más estradiol en la época no reproductiva, mientras que las hembras produjeron más estradiol en la época reproductiva. Los altos niveles de estradiol en los machos antes o durante la época reproductiva son explicados por la importancia que tiene esta hormona en la espermatogénesis (García *et al.*, 2005). En la época no reproductiva (primavera y verano), el estradiol puede estar asociado con la producción, desarrollo y crecimiento de las astas. Bubenik *et al.* (1997) observaron que el crecimiento de las astas ocurría cuando las concentraciones de testosterona en sangre eran mínimas, pero la hormona aumentaba rápidamente durante la fase de mineralización de las astas alcanzando un máximo poco antes de la época reproductiva. Entonces, el estradiol es la

Therefore, estradiol was the most critical hormone for antlers growth and maturation. Although the metabolic pathway is not precisely known, estradiol is believed to be produced from testosterone aromatization (Bubenik *et al.*, 2005), that is why testosterone levels in feces were reduced.

The values of cortisol and testosterone levels in this study were low, even though inside the ranges reported in various studies performed in white-tailed deer and other deer species (Pelletier *et al.*, 2003; Chunwang *et al.*, 2004; McCoy & Ditchkoff, 2012; López & Montes, 2016). This could have occurred by the microbial activity in feces that metabolizes steroid hormones to metabolites, with which there were no crossed reaction with antibodies used in this study. For this work, feces were collected fresh, but it took a few hours to transfer them into freezing conditions. Millspaugh & Washburn (2004) commented that hormonal metabolites might change in short periods of time, especially when they get hot, frozen, or defrosted. When Li *et al.* (2001) obtained low fecal estradiol levels in their work, they attributed this result to the sensitivity of the technic used or to the fact that the hormone had been metabolized in feces to another steroid that did not present crossed reaction with the antibody they used.

Conclusion

Reproductive hormones, testosterone, and estradiol rose during the reproductive season (autumn-winter) and when photoperiod decreased. Fecal cortisol increased in winter due to the reproductive season and activities related to this season as aggressiveness among males, low temperatures, as well as low quantity and quality of available food. Fecal cortisol was higher in the free-living population, indicating that populations in natural enclosure were not always the cause of high levels of stress when management conditions were adequate. Under a correct management and monitoring, natural enclosures may be a good strategy for white-tailed deer management and reproduction, without causing deleterious effects in these populations. Finally, there were various factors as dietary composition, intra- and inter-species social relationships and human activities which fostered the rise in cortisol levels in the free-living population that should be studied.

hormona más importante para el crecimiento y maduración de las astas. Aunque aún no se conoce exactamente la vía metabólica de acción, se cree que el estradiol podría estar produciendo a partir de la aromatización de la testosterona (Bubenik *et al.*, 2005), por lo que, los niveles de testosterona en heces se reducen.

Los valores de los niveles de cortisol y testosterona en este estudio fueron bajos, aunque dentro de los rangos reportados en varios estudios realizados en venado cola blanca y otros cérvidos (Pelletier *et al.*, 2003; Chunwang *et al.*, 2004; McCoy & Ditchkoff, 2012; López & Montes, 2016). Esto pudo haber ocurrido por la actividad microbiana presente en las heces, las cuales metabolizan las hormonas esteroides a metabolitos con los cuales no existió reacción cruzada con los anticuerpos utilizados en este estudio. Para este trabajo las heces se colectaron frescas pero tomó un par de horas transferirlas para su congelación. Millspaugh & Washburn (2004) comentaron que los metabolitos hormonales fecales pueden cambiar en periodos cortos de tiempo, especialmente cuando se calientan, se congelan y se descongelan. Cuando Li *et al.* (2001) obtuvieron bajos niveles de estradiol fecal en su trabajo, lo atribuyeron a la sensibilidad de la técnica utilizada o a que la hormona había sido metabolizada en las heces a otro esteroide que no tuvo reacción cruzada con el anticuerpo que ellos utilizaron.

Conclusiones

Las hormonas reproductivas, testosterona y estradiol, se elevaron durante la época reproductiva (otoño-invierno) y cuando el fotoperiodo disminuyó. El cortisol fecal se elevó en invierno dada la época reproductiva y las actividades relacionadas a ésta como la agresión entre machos, las bajas temperaturas, así como la baja cantidad y calidad del alimento disponible. El cortisol fecal fue más alto en la población en vida libre, indicando que las poblaciones en encierro natural no siempre son la causa de altos niveles de estrés cuando las condiciones de manejo son adecuadas. Bajo un manejo y monitoreo adecuados, los encierros naturales pueden llegar a ser una buena estrategia para el manejo y reproducción de venado cola blanca sin causar efectos deletéreos en esas poblaciones. Finalmente, existen varios factores como la composición de dieta, relaciones sociales intra y entre especies, y actividades humanas que provocan la elevación en los niveles de cortisol en las poblaciones de vida libre que deben ser estudiadas.

Acknowledgement

Authors thanks to Antonio Mancinas, Jesús Meléndez, Roberto Meléndez and José Hugo Martínez for their support and for allowing performing sampling in the UMA. To the National Polytechnic Institute for founding the study through the multidisciplinary project 1808 (20160398, 20170564).

Agradecimientos

Agradecemos a Antonio Mancinas, Jesús Meléndez, Roberto Meléndez y José Hugo Martínez por el apoyo brindado y permitirnos llevar a cabo los muestreos en las UMA. Al Instituto Politécnico Nacional al financiar el estudio a través del proyecto multidisciplinario 1808 (20160398, 20170564).

References

- Bartos, L., Schams, D., Bubenik, G. A., Kotrba R. and Tomanek, M. (2010). Relationship between rank and plasma testosterone and cortisol in red deer males (*Cervus elaphus*). *Physiology & Behavior*, 101: 628-634. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.09.011>
- Brown, C. L., Hardy, A. R., Barber, J. R., Fristrup, K. M., Crooks, K. R. and Angeloni, L. M. (2012). The effect of human activities and their associated noise on ungulate behaviour. *PlosOne*, 7(7): e40505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040505>
- Bubenik, G. A., Miller, K. V., Lister, A. L., Osborn, D. A., Bartos, L. and Van Der Kraak, G. J. (2005). Testosterone and estradiol concentrations in serum, velvet skin, and growing antler bone of male white-tailed deer. *Journal of Experimental Zoology*, 303A: 186-192. <https://doi.org/10.1002/jez.a.139>
- Bubenik, G. A. (2006). Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle. a review. *Veterinarski Arhiv*, 76 (Suppl.): S275-S285. <https://pdfs.semanticscholar.org/2312/88d1e7e090844ead1cc3e3e458e98ba2b813.pdf>
- Bubenik, G. A., Schams, D., White, R. J., Rowell, J., Blake, J. and Bartos, L. (1997). Seasonal levels of reproductive hormones and their relationship to the antler cycle of male and female reindeer (*Rangifer tarandus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 116(2): 269-277. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00183-1)
- Chunwang, L., Zhigang, J., Yan, Z. and Caie, Y. (2004). Relationship between serum testosterone, dominance and mating success in Père David's Deer stags. *Internacional journal of behavioural biology Ethology*, 110: 681-691. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2004.01003.x>
- Clemente, F., Cessa, V., Cortez, C., Tarango, L. and Arenas, P. (2015). Commercial extenders and freezing curves for the preservation of sperm cells of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Applied Animal Research*, 43(4): 468-473. <https://doi.org/10.1080/09712119.2014.980422>
- Equihua M. 2000. Fuzzy clustering tool program. Xalapa, México. Instituto de Ecología A.C.
- García, R. J., Barbanti, J. M. and Negrão, J. A. (2005). Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationships to the reproductive behaviour, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Theriogenology*, 63: 2113-2125. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.014>
- González, M., González, M. and Márquez, M. (2007). Vegetación y ecorregiones de Durango. Plaza y Valdez, Ciudad de México, México. https://www.researchgate.net/profile/M_Socorro_Gonzalez-Elizondo/publication/322244135_Vegetacion_y_Ecorregiones_de_Durango/links/5bd9ba8092851c6b279c733a/Vegetacion-y-Ecorregiones-de-Durango.pdf
- He, L., Wang, W. X., Li, L. H., Liu, B. Q., Liu, G., Liu, S. Q., Qi, L. and Hu, D. F. (2014). Effects of crowding and sex on fecal cortisol levels of captive forest musk deer. *Biological Research*, 47: 48. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-48>
- Huber, S., Palme, R. and Arnold, W. (2003a). Effects of season, sex and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer. *General and Comparative Endocrinology*, 130: 48-54. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00535-X](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00535-X)

- Huber, S., Bruns, U. and Arnold, W. (2003b). Genotyping herbivore feces facilitating their further analyses. *Wildlife Society Bulletin*, 31(3): 92-697. https://www.researchgate.net/profile/Walter_Arnold/publication/230559527_Genotyping_herbivore_feces_facilitating_their_further_analyses/links/5a707f87458515015e63cf4c/Genotyping-herbivore-feces-facilitating-their-further-analyses.pdf
- Kapke, C. A., Arcese, P., Ziegler, T. E. and Scheffler, G. R. (1999). Estradiol and progesterone metabolite concentration in white-tailed deer feces. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30(3): 361-371. <http://www.jstor.org/stable/20095879>
- Li, C., Jiang, Z., Jiang, G. and Fang, J. (2001). Seasonal changes of reproductive behavior and fecal steroid concentrations in Pe're David's deer. *Hormones and Behavior*, 40: 518-525. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1711>
- Linklater, W., Macdonald, E., Flamand, J. and Czekala, N. (2010). Declining and lower fecal corticoids are associated with distress, not acclimation to stress, during the translocation of African rhinoceros. *Animal Conservation*, 13(1): 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00308.x>
- Liu, W. H., Wang, Y. Q., Li, F. R., Tang, J. and Yang, Z. (2010). A primary study on breeding the musk deer by enclosure culture in Qinling Mountains. *Journal of Economic Animal*, 14(2): 63-66.
- Lounsbury, Z. T., Forrester, T. D., Olegario, M. T., Brazeal, J. L., Wittmer, H. U. and Sacks, B. N. (2015). Estimating sex-specific abundance in fawning areas of high-density Columbian black-tailed deer using fecal DNA. *Journal of Wildlife Management*, 79(1): 39-49. <https://doi.org/10.1002/jwmg.817>
- López, E. & Montes, R. (2016). Valoración de metabolitos de testosterona, progesterona y estrógeno en excretas de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) como método para determinar el sexo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87: 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.09.021>
- Millspaugh, J. J. & Washburn, B. E. (2004). Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and comparative endocrinology*, 138: 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.07.002>
- McCoy, J. C. & Ditchkoff, S.S. (2012). Patterns of fecal hormones in a fenced population of white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin*, 36(4): 641-646. <https://doi.org/10.1002/wsb.190>
- Morden, C. J. C., Weladji, R. B., Ropstad, E., Dahl, E., Holand, Ø., Mastromonaco, G. and Nieminen, M. (2011). Fecal hormones as non-invasive population monitoring method for reindeer. *The Journal of Wildlife Management*, 75(6): 1426-1435. <https://doi.org/10.1002/jwmg.185>
- Mostacedo, B. & Fredericksen, T. S. (2000). Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal. BOLFOR, Santa Cruz, Bolivia. <http://www.bio-nica.info/biblioteca/mostacedo2000ecologiavegetal.pdf>
- Pavitt, A. T. Walling, C. A., Möstl, E., Pemberton, M. and Kruuk, L. E. B. (2015). Cortisol but not testosterone is repeatable and varies with reproductive effort in wild red deer stags. *General and Comparative Endocrinology*, 222: 62-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.07.009>
- Pérez, O. (2014). Patrones de secreción de progesterona, estrógenos y testosterona en venado cola blanca veracruzano (*Odocoileus virginianus veraecrucis*) durante un ciclo anual en la zona centro del estado de Veracruz. (Tesis Maestría). Universidad Veracruzana. Veracruz, México 1-53 pp.
- Pelletier, A., Bauman, J. and Festa-Bianchet, M. (2003). Fecal testosterone in bighorn sheep (*Ovis canadensis*): behavioural and endocrine correlates. *Canadian Journal of Zoology*, 81: 1678-1684. <https://doi.org/10.1139/Z03-156>
- Ronsberry, C., Conner, M. and Lancia, R. (2001). Behavior and dispersal of White-tailed deer during the breeding season. *Canadian Journal of Zoology*, 79(1): 171-174. <https://doi.org/10.1139/z00-186>
- Rosales, S. & Villanueva, J. (2014). Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en bosques de Pinus duranguensis Martínez en el municipio de Durango. Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en cinco bosques de coníferas. M. R. Pérez, comp. 83-110 pp. Mexico. SAGARPA, INIFAP, CENID, COMEF.
- Sánchez-Rojas, G., Aguilar-Miguel, C. and Hernández-Cid, E. (2009). Estudio poblacional y uso de hábitat por el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en un bosque templado de la Sierra de Pachuca, Hidalgo, México. *Tropical Conservation Science*, 2(2): 204-214. <https://doi.org/10.1177/194008290900200207>
- Sánchez-Rojas, G., Gallina, S. and Equihua, M. (2004). Pellet morphometry as a tool to distinguish age and sex in the mule deer. *Zoo Biology*, 23: 139-146. <https://doi.org/10.1002/zoo.10119>
- Shipka, M. P., Rowell, J. E. and Sousa, M. C. (2007). Steroid hormone secretion during the ovulatory cycle and pregnancy in

- farmed Alaskan reindeer. *Journal of Animal Science*, 85: 944-951. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-589>
- Soto, M. A., Salame-Méndez, A., Ramírez-Pulido, J., Yáñez, L. and Armenta, M. A. (2004). Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo mexicano en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana*, 20(2): 187-196. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372004000200012
- Taillon, J. & Côté, S. D. (2008). Are faecal hormones levels linked to winter progression, diet quality and social Rank in Young ungulates? An experiment with white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) fawns. *Behavioural Ecology and Sociobiology Journal*, 62: 1591-1600. <https://doi.org/10.1007/s00265-008-0588-2>
- Vega, D. M., Gutiérrez, M. V. and Reyes, J. L. (2016). Densidad poblacional de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en dos UMAs de Durango, México. *Vidsupra*, 8(2): 24-28.
- Yoshimura, S., Sakamoto, S., Kudo, H., Sassa, S., Kumai, A. and Okamoto, R. (2003). Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*, 68(5): 439-445. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(03\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(03)00045-X)