

# GUÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EDAD DEL CIERVO IBÉRICO (*Cervus elaphus hispanicus*) A TRAVÉS DE SU DENTICIÓN: REVISIÓN METODOLÓGICA Y TÉCNICAS DE ELECCIÓN

CONCEPCIÓN AZORIT CASAS<sup>1</sup>

## RESUMEN

La determinación de la edad de los ciervos cazados es fundamental e imprescindible para valorar tanto la calidad individual como la calidad de la población en su conjunto y pone en perspectiva cuestiones sobre gestión y manejo. La determinación de la edad es la mejor fuente de información para evaluar los resultados de la gestión desarrollada, monitorizar el cumplimiento de los objetivos marcados a medio y largo plazo, y valorar las consecuencias de prácticas de manejo anteriores. También constituye una información básica imprescindible para realizar predicciones sobre el futuro demográfico de las poblaciones a gestionar, bien sea para incrementar su densidad o para limitarla. Y además, es necesario conocer la edad con el mayor detalle y precisión posibles cuando se investigan temas como crecimiento corporal, reproducción, supervivencia o longevidad. Este trabajo recopila los resultados más destacados de la puesta a punto de diversos métodos y técnicas de determinación de edad en el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) del sur de España, a partir del estudio de ciervos cazados en Sierra Morena Oriental y de edad conocida. Se revisan antecedentes, y fundamentos metodológicos haciendo especial referencia a las técnicas esqueletocronológicas es decir, al uso de marcas de crecimiento en tejidos dentales evidenciadas mediante histología convencional o petrografía. Se discuten y explican las limitaciones y errores intrínsecos a cada método a modo de guía práctica para veterinarios, biólogos y gestores interesados.

**Palabras clave:** Determinación de edad, Ciervo ibérico, *Cervus elaphus hispanicus*, sur de España, erupción dental, primer molar, líneas de reposo, cemento dental, esqueletocronología.

---

<sup>1</sup> Área de Zoología del Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén, 23071, España. E-mail: cazorit@ujaen.es

## ABSTRACT:

Aging of hunted deer is essential to evaluate both the individual quality and the quality of the population as a whole, and puts into perspective questions about management and handling. The age determination is the best source of information to evaluate the results of the management undertaken, to monitor the achievement of objectives developed both medium and long term and to evaluate the consequences of the practices of previous management. It also constitutes as basic essential information to make predictions about the demographic future of the populations to manage, whether to increase their density or to limit it. It is also necessary to know the age with the greatest detail and precision as possible when subjects such as body growth, condition, reproduction, survival or longevity are investigated.

This paper collects the most outstanding results of various methods and techniques for determining the age of the Iberian Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in the south of Spain, from the study of deer hunted in

Oriental Sierra Morena and of a known age. Background is reviewed and methodological fundamentals with special reference to skeletochronology, the use of marks of growth in dental tissues evident through conventional histology or petrography. The limitation and intrinsic error to each method are discussed and explained as a kind of practical guide for interested veterinary, biologists and managers.

**Keyword:** aging, Iberian red deer, *Cervus elaphus hispanicus*, south Spain, teeth, first molar, rest lines, skeletochronology.

## 1. INTRODUCCIÓN:

El ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) es la especie de caza mayor más emblemática de la Península Ibérica y su gestión supone una preocupación mayor por motivos tanto medioambientales como económicos. Una de las herramientas más valiosas para el aprovechamiento sostenible de la especie es el conocimiento de su pirámide y dinámica poblacional. Así, necesitamos resolver interrogantes en relación a la densidad, la tasa de renovación de la población, o la determinación de la edad de los individuos que forman parte de ella. De hecho, la proporción entre los distintos grupos de edad es uno de los factores más influyentes en la calidad ecológica de una comunidad animal de manera que sin la presencia de un número adecuado de ciervos maduros, o una proporción de edades adecuada, no se asegura un comportamiento social equilibrado. Por todo ello, para algunos autores el conocimiento de la tasa de edades es incluso más importante que el conocimiento del número total de individuos (1, 2).

La correcta determinación de la edad es también clave cuando queremos comparar poblaciones sometidas a diferentes condiciones ambientales, o para monitorizar

los resultados de actuaciones de gestión dirigidas a mejorar las cualidades físicas o cinegéticas de una especie en un hábitat concreto. Ningún carácter estructural o fisiológico cuantificable es independiente de la edad. Ni el estado reproductivo, ni el peso corporal, ni tampoco el tamaño de la cornamenta pueden ser valorados correctamente sin conocer la edad. Aunque cornamentas bien desarrolladas pueden ser consideradas indicadoras de una buena condición corporal, la calidad cinegética de dos poblaciones de ciervos no puede ser comparada enfrentando únicamente el tamaño de las cornamentas de los ciervos cazados sin referenciar la edad de los mismos (3,4). En la práctica, la determinación de la edad de los animales cazados es fundamental e imprescindible para valorar la calidad individual de los ciervos así como la calidad de la población en su conjunto y pone en perspectiva cuestiones de manejo y gestión. La determinación de la edad es la mejor fuente de información para determinar el éxito del tipo de gestión desarrollada en cada finca, para valorar el cumplimiento de los objetivos marcados a medio y largo plazo, o las consecuencias de prácticas de manejo anteriores. También constituye una información básica necesaria para realizar predicciones sobre el futuro demográfico de las poblaciones a gestionar, bien sea para incrementar su densidad o para limitarla (5). Y además, es necesario conocer la edad con el mayor detalle y precisión posibles cuando se investigan temas como crecimiento corporal, reproducción, supervivencia o longevidad.

La edad se conocería con precisión si los animales se marcaran al nacer. Sin embargo, esto no suele ocurrir por lo que, desde siempre se ha descrito y utilizado una gran cantidad de métodos de datación tanto en animales domésticos como silvestres (1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). Concretamente en cérvidos, los métodos tradicionales de determinación de edad se han basado en cambios en la conformación corporal, coloración del pelaje, cambios en la cornamenta y cambios en las características dentales como el recambio y desgaste dentarios, ampliamente utilizados desde la antigüedad. A todos estos métodos se les ha llamado **métodos cinegéticos** (14) y en la mayoría de los casos aportan información sobre el grupo de edad al que pertenece el animal, aunque a veces sólo es posible la distinción entre crías, jóvenes y viejos. Los basados en la dentición han sido siempre más fiables, pero una vez completada la erupción de toda la dentición permanente hay que recurrir al desgaste dental o a métodos que usan marcas de crecimiento periódicas presentes en tejidos duros. A éstos se les ha llamado **métodos esqueletocronológicos** (15), y son métodos de elección cuando se requiere conocer la edad con el mayor detalle y precisión posibles ya que se consideran capaces de informar sobre la edad *absoluta* del animal (8, 10, 16).

Muchos autores llaman la atención sobre la importancia de la *exactitud* y *precisión* en la determinación de la edad ya que errores mínimos pueden ocasionar fallos im-

portantes en la interpretación de las tablas de vida y dar lugar a la toma de decisiones incorrectas en la gestión, con consecuencias graves en la población y su hábitat (17, 18). La existencia de diferencias en la fiabilidad de la datación según procedimientos y dientes utilizados (19), subespecies, ambientes o poblacionales (20, 21) hace necesaria la validación de cada método siempre que se emplea por primera vez en una nueva especie o subespecie. Así, en el caso del ciervo ibérico la utilización de criterios propios obtenidos a partir de estudios en nuestras latitudes resulta especialmente indicada. Pero, aunque son muchos los estudios referidos a la datación de ciervos centroeuropeos (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, entre otros), en la Península Ibérica estos estudios han sido más escasos y recientes. La mayoría basados en criterios morfológicos (30, 31) o en criterios dentales como erupción o desgaste dental (32, 33, 34, 35). El uso de las marcas de crecimiento en el cemento o la dentina de incisivos no se inicia hasta principios de los años 90 en nuestro país (36, 37), y no es hasta finales de esa década cuando se realizan estudios detallados sobre la validez de las técnicas esqueletocronológicas y su fiabilidad según piezas dentales, tejidos y tipo de muestras (38). A partir de entonces se establecen procedimientos estandarizados para el recuento e interpretación de las citadas marcas periódicas en ciervos mediterráneos (39).

Este trabajo recopila los resultados más destacados de la puesta a punto de diferentes técnicas de determinación de edad del ciervo ibérico en el sur de España, partiendo del estudio de ciervos cazados así como de ciervos de edad conocida. Se revisan antecedentes, fundamentos metodológicos y procedimientos, haciendo especial referencia a las técnicas esqueletocronológicas, es decir, al uso de marcas de crecimiento periódico evidenciadas en tejidos duros mediante histología convencional o petrografía. Se aportan resultados inéditos sobre la exactitud de la datación usando preparaciones de molares sin descalcificar en comparación con las histológicas de dientes descalcificados. Se discuten limitaciones y errores intrínsecos a cada método, así como las ventajas de los métodos preferentes según los casos a modo de guía práctica para veterinarios, biólogos y gestores interesados.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS:

Los trabajos revisados estudiaron un total de 558 ciervos de ambos sexos cazados entre 1993-97 en monterías y cazas selectivas de Sierra Morena Oriental (Jaén). Más recientemente, para investigar la validez de procedimientos petrográficos de forma comparada con procedimientos histológicos, se estudiaron 207 ciervos cazados entre 2007-2008. A partir de necropsias de campo se obtuvieron sus mandíbulas para el posterior estudio dental. Se dispuso de 3 ciervos adultos de *edad conocida* nacidos en

distintas fincas de Sierra Morena de Jaén que fueron marcados en su primer año de vida (un macho llamado *Bartolo* de 9 años y dos hembras *Jara* y *Rosa* de 5 y 13 años, respectivamente), además de 20 crías de la granja experimental de la Universidad de Castilla la Mancha en Albacete.

### 2.1. Erupción y reemplazamiento

Para determinar el patrón y tiempo de erupción y reemplazamiento dentarios se estudió la dentición de 20 crías nacidas en cautividad, en la granja experimental antes citada, mediante procedimientos manuales durante jornadas rutinarias de manejo, además de 158 ciervos (56 machos, 87 hembras y 15 de sexo no registrado) con dentición incompleta (erupción dentaria en curso) de los que se conocía la fecha exacta de muerte y el mes de nacimiento. La edad se determinó con metodología y simbología descritas previamente (32, 33, 40, 41).

### 2.2. Marcas de crecimiento periódicas en tejidos dentales

Las marcas de crecimiento parecen ser el reflejo de un acúmulo de tejido que tiene lugar de forma más rápida e intensa en un periodo y que cesa o se reduce en otro momento del año. El efecto de este acúmulo diferencial es la aparición de capas alternas de distinto grosor (unas anchas y otras más estrechas), y de distinto aspecto y densidad óptica, que en realidad indican distintas fases de la odontogénesis, cementogénesis u osteogénesis. Actualmente está aceptado que las capas anchas que aparecen en el cemento dental (u otros tejidos) son las que resultan de periodos de rápido crecimiento (42), y las marcas estrechas, a las que muchos autores llaman *líneas de detención de crecimiento o de reposo*, resultan de periodos de depósito lento (43, 44). Pero el desconocimiento de las causas que provocan estas marcas, así como las variaciones detectadas en cuanto a la época de crecimiento o reposo según el área geográfica o la subespecie (16), así como la existencia de diferencias en la fiabilidad de la datación según procedimientos, dientes (19), subespecies, ambientes o poblacionales (20, 21) hace necesaria su validación para el ciervo ibérico (38) y para ello un protocolo de trabajo con una serie de pasos concretos:

1º. Confirmar la formación de marcas periódicas en dientes de ciervo ibérico y averiguar el tipo de preparación, diente y zona con marcas más visibles y fácilmente interpretables para la determinación de la edad (45), 2º.- Averiguar la periodicidad anual en la formación de cada marca así como la época de mayor crecimiento y reposo

(47), 3°.- Determinar la edad de aparición de las primeras marcas formadas en cada diente (46), 4°.- Establecer un método estandarizado para su recuento e interpretación que evite en lo posible problemas de subjetividad (39) y 5°.- Estimar la precisión y fiabilidad de la datación, así como el error que se puede cometer al determinar la edad de un ciervo usando un procedimiento u otro y finalmente valorar técnicas, métodos y dientes preferentes (39).

Para evidenciar en detalle las marcas de crecimiento en diferentes tipos de tejidos y zonas de cada diente se realizaron preparaciones histológicas de un total de 815 dientes (521 incisivos, 222 molares y 72 caninos) pertenecientes a 521 ciervos machos y hembras de entre 6 y 15 años de edad. Se utilizó un microtomo convencional Leica para muestras descalcificadas. El procedimiento se describe en trabajos previos (45). Brevemente: 1) extracción de dientes de la mandíbula, fijación y preservación de los dientes en una solución de formol al 10 %, 2) descalcificación de los dientes con una solución comercial de ácido hipoclorico y polivinil-prolidona al 14% (TBD-® Shandon) durante tiempo variable según el tipo de pieza dental, 3) inclusión en parafina y cortes de 4-5  $\mu\text{m}$  con microtomo convencional en diferentes orientaciones y zonas del diente, 4) tinción de rutina con Hematoxylina-Eosina, y 5) observación con microscopio de luz transmitida (Leica Leitz LaborluxS) y/o polarizada (Nikon E800 FL-DIC) conectados en ambos casos a una cámara color Sony 3CCD DXC-950P y ordenador Pentium 200 MMX.

Con el fin de comparar la eficacia y precisión de las técnicas histológicas convencionales con las petrográficas, más rápidas y versátiles que no requieren descalcificación dental previa, se realizaron cortes mediante procedimientos petrográficos de los  $M_1$  de 207 ciervos de los que también se realizaron preparaciones histológicas con microtomo convencional. Se utilizaron dos procedimientos petrográficos para la preparación de molares: A) Preparación de láminas delgado-pulidas y B) Obtención de secciones gruesas pulidas, mediante cortes de molares también sin descalcificar usando un procedimiento simplificado del anterior. Las láminas delgado-pulidas del  $M_1$  se realizaron según lo descrito (46). Brevemente: 1) corte longitudinal con una cortadora tipo Diamant boart, y selección de corona y almohadilla interradicular, 2) esmerilado en placas de vidrio con carborundum, 3) adherencia de la preparación a placa de vidrio con ayuda de una placa calentadora y pegamento de dos componentes tipo epoxy mounting media tipo microtec, 4) varios cortes con cortadora Petrothin (thin sectioning system de Buehler, USA) hasta un grosor de 50-20  $\mu\text{m}$ , 5) pulido con paño de diamante en máquina Planopol-V, 6) observación con lupa (Leica Zoom tm 2000 con luz reflejada).

Para una correcta interpretación de las marcas de crecimiento es necesario conocer su periodicidad de formación (anual, semestral, bianual, etc.) y a qué edad del animal, aparece la primera marca en cada diente y tejido. La periodicidad fue determinada a partir del cemento dental de 82 de ciervos de más de 4 años de edad cazados a lo largo de todas las estaciones del año. Este estudio se basó en el registro de la situación y grosor de la última capa de cemento observado en la almohadilla interradicular del primer molar ( $M_1$ ). Para la edad de aparición de las primeras marcas se analizaron dientes (tanto incisivos, como molares y caninos) en distinto grado de erupción para después establecer un procedimiento estandarizado de recuento e interpretación de las marcas para la datación (39, 47).

Para la valoración de la exactitud y precisión del método se realizaron preparaciones histológicas convencionales de 64 incisivos y 55 molares de 61 ciervos de 4-44 meses de edad (39). De 20 de estos ciervos se estudiaron sus molares tanto a partir de preparaciones petrográficas como histológicas.

### **2.3. Desgaste dental:**

El estudio cuantitativo del desgaste dental en incisivos y molares se desarrolló a partir de 136 ciervos entre machos y hembras según lo descrito en trabajos previos (35) y utilizando medidas similares a las de otros trabajos de referencia (48). La edad de estos animales oscilo entre los 5 y los 163 meses de edad y fue estimada a partir de marcas en el cemento celular del primer molar. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS (1992) y se llevaron a cabo análisis de varianza así como procedimientos GLM para determinar influencia de factores como sexo, densidad, gestión, climatología o hábitat. Se estableció un patrón de desgaste que permite establecer amplias clases de edad en ciervos del área de estudio.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

### **3.1. Patrón de erupción y reemplazamiento dentarios**

La dentición de un ciervo adulto consta de 4 incisivos inferiores, 1 canino superior, 3 premolares superiores y 3 inferiores, y 3 molares superiores y 3 inferiores, ya que en el proceso evolutivo los rumiantes han perdido los incisivos superiores y el canino inferior se ha transformado en un incisivo más, aproximándose al resto de los incisivos inferiores. Como en la mayoría de los artiodáctilos (excepto en los suidos),

en el ciervo también se ha desaparecido el primer premolar por lo que los premolares existentes son en realidad el 2º, el 3º y el 4º aunque aquí los llamemos primero, segundo y tercero, respectivamente.

Todos los mamíferos placentarios presentan dientes de leche o deciduos que son sustituidos por los permanentes o definitivos en momentos concretos de la vida del animal, siendo los molares los únicos dientes que no tienen un predecesor de leche. La aparición y pérdida de dientes de leche y la erupción de dientes permanentes ocurren en cada especie siguiendo un orden determinado y en periodos cronológicos relativamente independientes del estado fisiológico del animal (1). Mientras que en una misma especie la secuencia de erupción suele permanecer constante, el momento de erupción puede verse alterado por factores genéticos o ambientales (40). El patrón de erupción y reemplazamiento dentario del ciervo centroeuropeo, se conoce detalladamente gracias a los trabajos de investigadores alemanes (27, 49, 50), ingleses (22, 23, 51) o franceses (52, 53), pero en España existen pocos estudios al respecto, a excepción de los realizados en el norte de la Península (32), incompletos por no disponer de animales menores de 7-8 meses de edad ni informar sobre el reemplazamiento de incisivos, o los de ciervos del sur (33). Las variaciones en el momento y secuencia de erupción de los dientes permanentes del ciervo ibérico se muestran en la Tabla 1 comparado con lo publicado en otras regiones para otras subespecies de ciervo.

En la Figura 1 se muestran 5 mandíbulas que pueden ser utilizadas como patrón dental de otras tantas clases de edad, con diferentes fases de erupción dental donde la dentición de leche va siendo sustituida por dentición permanente. El ciervo ibérico a los 2-3 meses de edad presenta una dentición constituida por dientes de leche (ver Figura 1. 0a) y en ocasiones muestran premolares de leche aún en erupción. El primer diente permanente en emerger a través de la encía es el primer Molar ( $M_1$ ). Empieza a aparecer a los 3-4 meses de edad, no termina de erupcionar hasta los 5 meses y se hace plenamente funcional (cuando su cara oclusal contacta con la del molar superior en la masticación) a los 6 meses de edad (Figura 1. 1a). En ciervos de las montañas Cantábricas, especímenes de 7-8 meses muestran un patrón de desgaste en la superficie de masticación del  $M_1$  coincidente con lo observado en nuestros ciervos a la misma edad (32). El tiempo de erupción del primer molar en nuestros ciervos coincide con el rango establecido para ciervos de Escocia (51), pero es posterior a lo publicado para ciervos alemanes (27, 49) en los que la erupción se establece a los 4 meses de edad. Estas diferencias pueden deberse a las diferencias en nomenclatura y consideración o no de distintos grados de erupción o funcionalidad dental.



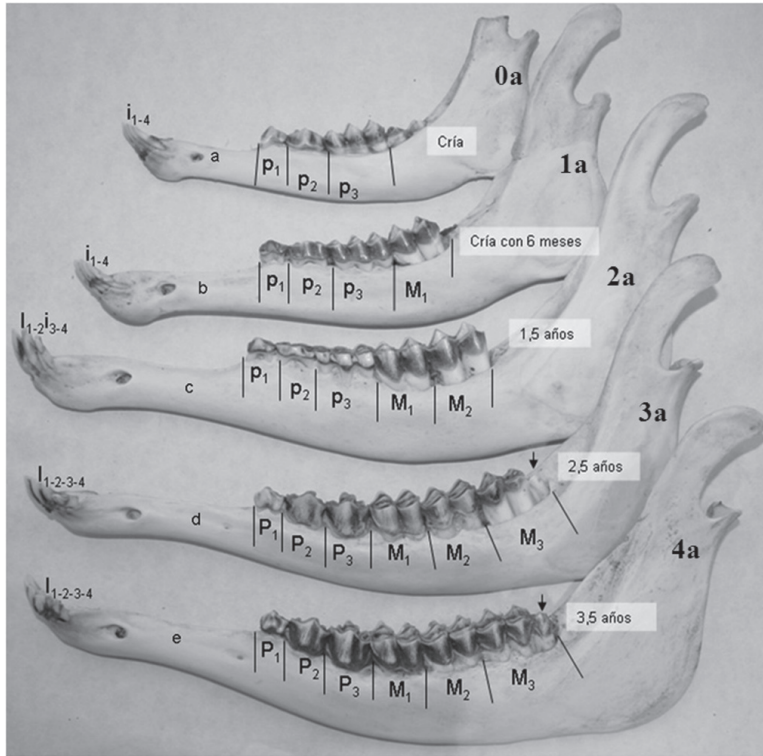


Figura 1.- Fases de la erupción de dientes permanentes en el ciervo ibérico. Letras minúsculas para los dientes de leche y mayúsculas para dientes definitivos y premolares numerados según su orden de aparición en la mandíbula, en vez de considerar su lugar desde el punto de vista evolutivo.

Tabla 1.- Erupción de la dentición permanente del Ciervo (*Cervus elaphus*)

Orden y mes de erupción de los dientes permanentes											
<i>Presente estudio para Cervus elaphus hispanicus en la mitad sur de la Península Ibérica</i>											
M <sub>1</sub>	I <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	I <sub>2</sub> C	I <sub>3</sub> I <sub>4</sub>	Premolares	M <sub>3</sub>	3 <sup>a</sup> Cúspide			Autores	
6	14-15	15-16	17-18	25-26	27-30	31-32	37-44			(33)	
<i>Otras subespecies y latitudes</i>											
M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	C	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	M <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>1</sub>	Autores
5-12	12-14	15	15-17	15-18	18-20	21-23	24-27	27-30	27-30	27-30	(53)
4	12	14	16	17	19	19	21	25	25	25	(49)
4	12	14	15	16	19	19	21	25	25	25	(27)
5	13	-	-	-	-	-	26	-	-	-	(29)
4-6	12-15	12-15	19	21	-	21-28	33	21-28	21-28	21-28	(51)
-	-	15	-	-	-	-	-	-	24	-	(16)

En el ciervo ibérico el primer incisivo permanente ( $I_1$ ) se observa totalmente erupcionado y sin desgaste dental a los 14-15 meses, coincidiendo con un segundo molar ( $M_2$ ) que no ha terminado aún de emerger, y es a los 15-16 meses cuando esta muela aparece erupcionada totalmente. El segundo incisivo ( $I_2$ ) completa su erupción a los 17-18 meses igual que el canino permanente. Un carácter muy distintivo del tercer premolar de leche son sus tres cúspides. La Figura 1. 2a muestra la dentición típica de los animales llamados *varetos* o *primaldas* (en el caso de las hembras) que al año y medio tienen casi siempre la mitad de los incisivos de leche y la mitad permanentes, y las dos primeras muelas totalmente funcionales. A los 27-30 meses aparecen los premolares totalmente erupcionados siendo visibles sus cúspides sobre la mandíbula a los 25-26 meses de edad. El estado de erupción del tercer premolar descrito a la edad de 20 meses para ciervos del norte de la Península Ibérica (32) coincide con lo observado en Sierra Morena. De los estudios con subespecies norteñas, los resultados que más se asemejan a los nuestros son en los que el  $I_1$  erupciona cuando el animal tiene aproximadamente 15 meses y el último premolar cuando tiene unos 24 (16, 51). La erupción del tercer molar en ciervos alemanes tiene lugar antes que en el ciervo ibérico según algunos autores como se observa en la Tabla 1.

Aunque Eidmann ya en 1932 (27) señala dicha erupción también a los 29-31 meses de edad coincidiendo con nuestras observaciones. Las diferencias pueden deberse a la consideración o no de la erupción de la tercera cúspide de este molar. En el ciervo ibérico, el tercer molar es el último diente permanente que aparece erupcionando totalmente sus primeras dos cúspides a la edad de 31-32 meses mientras que la tercera cúspide sólo es visible si eliminamos los tejidos de la encía (ver Figura 1. 3a). Esta tercera cúspide completa su erupción desde los 37 a los 44 meses, momento en el que presenta coloración oscura pero sin tener todavía desgaste en su cara oclusal (Figura 1. 4a).

Como en el ciervo ibérico la erupción de todos los dientes permanentes, incluyendo la tercera cúspide del tercer molar, se produce de forma completa a los 37-44 meses de vida del animal, es posible determinar la edad con bastante fiabilidad y detalle hasta los tres años y medio. A partir de entonces tenemos que utilizar otros criterios como el desgaste dental o la esqueletocronología.

### 3.1.1. Retraso en la erupción de dientes permanentes

Un hallazgo importante en nuestros ciervos ha sido la detección de un porcentaje significativamente alto de casos en los que el reemplazamiento de algunos dientes

permanentes aparece retrasado (33). Cerca de un 20% de los animales presentaron retraso en la erupción de los incisivos permanentes. Concretamente un 18.75% de los ciervos mostraron retraso en la erupción del  $I_1$ , apareciendo además animales menores de 18 meses con la primera y segunda muelas totalmente funcionales pero aún con todos los incisivos de leche. Esto puede evidenciar diferencias en el desarrollo general provocado por carencias nutricionales como consecuencia de factores ambientales o poblacionales adversos ya que estos animales son prácticamente el grupo de los cazados en 1994 y 1995, que nacieron muy tarde (finales de julio-agosto) en años malos de extrema sequía. Por el contrario, los animales cazados en 1997 presentaron a la misma edad los dos primeros incisivos permanentes totalmente erupcionados (Figura 1. 2a), además de mandíbulas más grandes y cornamentas de mayor calidad (3, 33).

Autores ingleses (51) encuentra que algunos ciervos raquíuticos mantienen todos sus incisivos de leche aún teniendo ya dos molares y comenta que algunos individuos de dos años y medio, con tres molares, mantienen premolares de leche. Este dato también ha sido constatado en un 8,33% de las hembras de Sierra Morena. La determinación del momento de erupción dental así como conocer estas variaciones específicas y locales, es interesante no sólo para determinar la edad correctamente, sino para interpretar las marcas de crecimiento en los distintos tejidos dentales en los estudios esquelétocronológicos (9, 10, 16).

Estos retrasos en la erupción dental condicionan la aparición de las primeras marcas de crecimiento y pueden provocar errores de interpretación.

### 3.2. Utilidad del desgaste dental en la determinación de la edad

Los resultados en los estudios del desgaste dental en el ciervo ibérico indican diferencias de desgaste también entre sexos, destacando un mayor desgaste en los molares de los machos, probablemente debido a diferencias en el uso del hábitat y al tipo de alimento consumido (34, 35). Además los ciervos de fincas pequeñas y con mayor densidad presentaron mayor desgaste, influyendo también el tipo de gestión. Debido a estos factores de variación el desgaste es un método que necesariamente ha de ser tomado con precaución en la determinación de la edad y siempre habiendo descrito previamente un patrón de desgaste propio de una población en un hábitat determinado. Si en la Figura 1 se muestra el tipo de dentición que tienen los ciervos desde que nacen hasta que termina la erupción de todos los dientes permanentes, la Figura 2 describe el desgaste dental desde los 4 hasta los 13 años de edad. La Figura 2. 4b (vista oclusal de la mandíbula 4a en la Figura 1) muestra el desgaste dental a los

3-4 años de edad. En las mandíbulas de 4,5-6,5 años de edad (Figura 2. 5b), entre otros detalles podemos observar cómo la dentina expuesta en la cara oclusal de los molares dobla la anchura del grosor del esmalte, todavía son evidentes los infundíbulos de todos los molares. En el  $M_2$  se muestra evidente la línea de la corona (LC= línea de separación entre corona y raíz) y la dentina del metacono contacta con la del protocono. En las mandíbulas de los ciervos de 5,5-8,5 años (Figura 2. 6b) han desaparecido los infundíbulos de la cara oclusal del  $M_1$ , y en la  $M_3$  es evidente la línea de la corona (LC) pero la dentina del hipocono y paracono aun no contactada. En las mandíbulas de ciervos de 7,5-13,5 años prácticamente han desaparecido los infundíbulos de los molares  $M_1$  y  $M_2$  y el del hipoconulo del  $M_3$  (Figura 2. 7b).

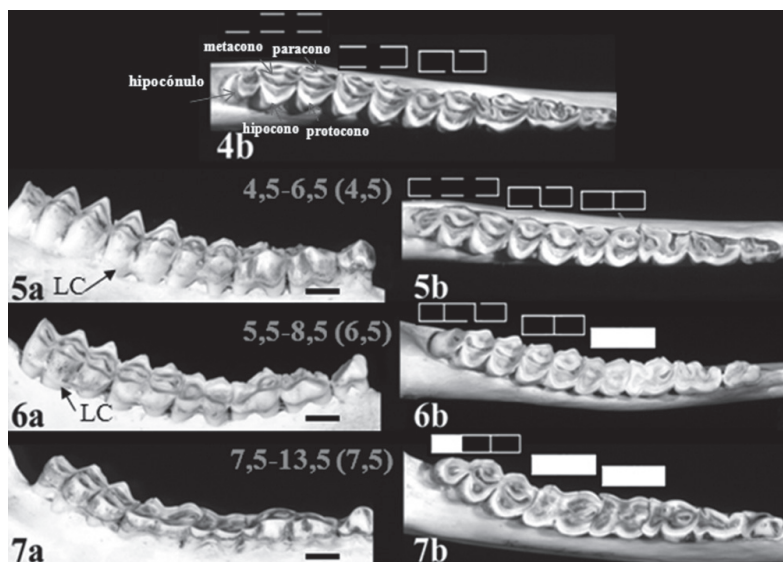


Figura 2.- Patrón de desgaste dental de ciervos de 4 a 13 años de edad. (LC= línea de la corona que aparece en  $M_2$  a partir de los 4 y en  $M_3$  a partir de los 6 años de edad).

En Sierra Morena Oriental utilizando el reemplazamiento dentario y el patrón de desgaste dental conjuntamente es posible establecer 7 clases de edad, y aunque existe un mayor solapamiento y una menor precisión y fiabilidad a medida que aumenta la edad del animal, el método es óptimo para el conocimiento de la tasa de edades en estudios generales de población.

### 3.3. Interpretación y uso de marcas de crecimiento periódicas en tejidos dentales

#### 3.3.1. Consideraciones generales sobre tejidos dentales y esqueletocronología

El término “esqueletocronología”, utilizado con más frecuencia por autores franceses, fue propuesto por primera vez por Castanet *et al.* en 1977 (15) para designar una técnica que venía siendo utilizada desde las primeras décadas del siglo XX para la determinación de la edad en vertebrados. Esta técnica está basada en la observación de marcas naturales repetitivas, de manera estacional, inscritas en distintos tejidos esqueléticos en crecimiento. El fenómeno de aparición de marcas o zonas de crecimiento estacionales, o anuales ha sido documentado en una gran variedad de tejidos duros como: tejidos dentales, hueso dermal del cráneo, vértebras, tejido perióstico de alrededor de los huesos, escamas, espinas y otolitos de peces, entre otros. Estas marcas o estructuras incrementales pueden ser estudiadas en cortes histológicos, en secciones gruesas pulidas o láminas delgado-pulidas, observadas con luz transmitida, polarizada o reflejada. Los primeros trabajos de determinación de la edad con métodos esqueletocronológicos fueron los de Clerc (1927) y Harris (1927) (54) basados en estructuras incrementales observadas en hueso. Los primeros estudios en los que se utilizaron dientes fueron realizados por investigadores alemanes que usaron marcas de crecimiento anuales en la dentina de los incisivos de ciervo (*Cervus elaphus*) (Eidmann 1932) (27). A partir de estos trabajos y de los realizados para la determinación de la edad en pinnípedos (55, 56), se extiende el uso de esta técnica, tanto en vertebrados acuáticos como en terrestres, con gran auge en los años 60 y 70 para estudios de dinámica de población y manejo de ungulados silvestres.

Los primeros tejidos utilizados fueron el hueso y la dentina, pero es el cemento dental el preferido para la determinación de la edad a partir de los trabajos en incisivos de alce (*Alces alces*) (57), en oso (*Ursus americanus*) (58) y en el primer molar de ciervo (22, 23, 51). Esto se debe a que al contrario que el hueso, rara vez el cemento está sujeto a algún tipo de remodelado. En cuanto a la dentina, las marcas de crecimiento utilizadas son las formadas en la dentina secundaria que crece hacia la cavidad pulpar rellenándola, por lo que su uso se limita al momento en el que la citada cavidad de la pulpa dental se completa dejándose de formar nuevas capas de dentina.

El cemento es un tejido parecido al hueso y a la dentina, formado por una matriz orgánica en la que posteriormente se depositan sales inorgánicas, principalmente fosfato cálcico (hydroxiapatita). La base orgánica del cemento está compuesta casi en su totalidad por colágeno, pero también contiene un número de proteínas no colagénicas entre las que destacan los glucosaminoglicanos y proteoglicanos, aunque la mayoría

de las proteínas no colagénicas del cemento no se conocen bien. El cemento dental se localiza alrededor de las raíces de los dientes de todos los mamíferos, pero también puede estar presente en la corona dental de molares de algunos herbívoros con alto grado de *hipsodontia* como es el caso del caballo y en la corona de algunos roedores o algunos mamíferos marinos. El colágeno del cemento tiene dos orígenes: intrínseco y extrínseco. El intrínseco está sintetizado por los cementoblastos, que se diferencian a partir de las células mesenquimales del ligamento o membrana periodontal y depositan cemento sobre la superficie de la dentina a nivel de la raíz, y el extrínseco, mayoritario en determinados tipos de cemento, que es sintetizado por fibroblastos, en el mismo ligamento periodontal en grandes haces que son los conocidos como fibras de Sharpey. Estas fibras extrínsecas en haces llegan a mineralizarse en la matriz del cemento sirviendo de anclaje de la raíz del diente al ligamento o membrana periodontal. La función del cemento parece ser la de fijación y sujeción del diente al alveolo dental, aunque el crecimiento continuo del cemento a lo largo de toda la vida puede también estar compensando la pérdida de altura del diente por el desgaste de la corona.

Todo el cemento que envuelve a las raíces dentales no es igual, sino que existen varios tipos con distintas características y localización. El primer cemento que se forma alrededor de la raíz de los incisivos, formando una primera capa distinta a las capas de cemento que se depositan después, se llama **cemento intermediario o hialino**. Está constituido por una banda estrecha (10-20  $\mu\text{m}$  en la mayoría de las especies) de tejido calcificado situado entre la línea de separación de la dentina y los otros tipos de cemento que se depositan después. Algunas veces se confunde con la capa granular de Tomes de la dentina. Los otros dos tipos de cemento dental más abundantes son el **cemento acelular** que se encuentra en los laterales de la raíz de los dientes y el **cemento celular** que se encuentra en la zona apical de la raíz y en la almohadilla de cemento que se forma entre las raíces de los molares. El cemento celular se deposita más rápidamente que el acelular y se caracteriza por la presencia de cementoblastos que han quedado atrapados dentro de la matriz de cemento. Estas células pueden permanecer con vida durante algún tiempo como cementocitos en un estado de reposo, pero como el cemento no está nutrido por vasos o capilares sanguíneos, estas células mueren y dejan huecos o lagunas que dan a este cemento un aspecto característico y fácil de identificar. El cemento celular suele ser más ancho y tiene más cantidad de colágeno intrínseco pero pocas o prácticamente ninguna fibra de Sharpey. Al contrario, el cemento acelular se caracteriza por que los cementoblastos, debido a que es depositado relativamente despacio, permanecen en la superficie del cemento y no llegan a ser incluidos o embebidos por el tejido. De esta manera, el cemento acelular

no incorpora cementocitos y no tiene lagunas como en el caso del cemento celular. Además, el cemento acelular normalmente contiene una gran variedad de colágeno extrínseco (fibras de Sharpey) y tiene relativamente pocas fibras de colágeno intrínseco.

Se ha comprobado la existencia de diferencias importantes en cuanto al proceso y la tasa de cementogénesis entre los distintos tipos de cemento, pero el mecanismo molecular mediante el que se produce su formación todavía es desconocido. Tampoco se conocen las causas de que tanto el cemento celular como el acelular, así como el resto de tejidos en los que aparecen marcas estacionales, tengan un crecimiento periódico que se refleja en la aparición de capas alternas que pueden ser utilizadas para la determinación de la edad.

### 3.3.2. *Dientes, tejidos y métodos para identificar marcas de crecimiento en el ciervo ibérico*

En el ciervo ibérico las marcas de crecimiento son observadas tanto en dentina como en cemento de incisivos, molares y caninos como se muestra en las Figuras 3 y 4. Los caninos fueron los menos apropiados para la identificación y distinción de marcas de crecimiento ya que aunque éstas fueron evidentes en dentina, no fue siempre así en el cemento radicular. El tejido de elección fue el cemento dental, al igual que en estudios precedentes ya que la interpretación de las marcas en la dentina fue muy difícil en todas las piezas dentales, principalmente por que son mas finas aparecen muy próximas unas a otras y en grupos (Figuras 3d-e) lo que complica distinguir las primarias de las secundarias o las marcas incrementales iniciales formadas en la dentina (46).

Las zonas de elección son: el cemento celular de la zona interradicular del primer molar (Figuras 3b, 3g, 4b-h) y el cemento acelular de la raíz de los incisivos (Figuras 3a, 3c, 3f, 3i, 4a) ambos observados a través de cortes longitudinales, debido a que sobre todo de incisivos, se evidencia una mayor región dental permitiendo confirmar la continuidad de líneas de reposo y marcas de crecimiento a lo largo del diente. Se diferencian mejor las líneas primarias y se hace posible la identificación de la línea de separación entre dentina y cemento (Figuras 3i, 4a). La mayoría de las muestras de incisivos observadas con luz transmitida (Figura 3c) o polarizada (Figura 4i) mostraron fibras de Sharpey con orientación constante siempre perpendicular a la línea de separación entre dentina y cemento, al contrario de lo encontrado en otros estudios (79).

En relación al tipo de preparación, son los cortes histológicos obtenidos con microtomo convencional los óptimos. Permiten la observación de mayor cantidad

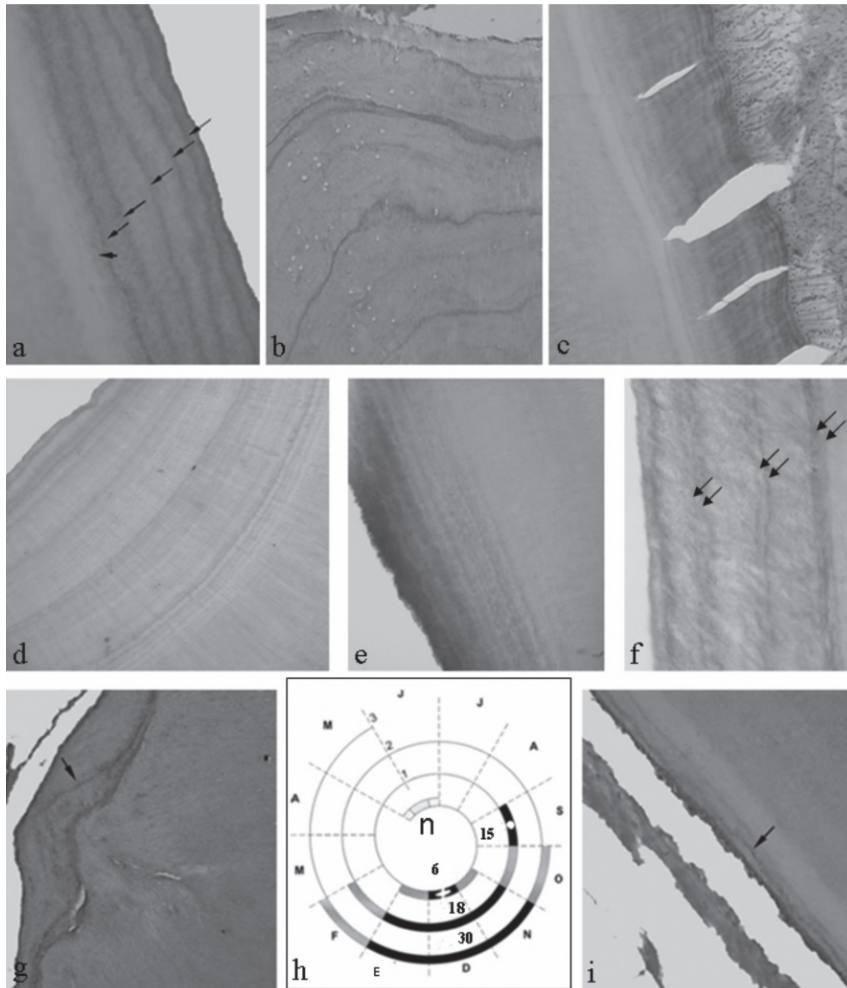


Figura 3.- Preparaciones histológicas de 4-5 micras obtenidas a partir dientes descalcificados incluidos en parafina, cortadas con microtomo convencional y teñidas con hematoxilina-eosina. a) primer incisivo permanente. b) primer molar de ciervo mostrando líneas de reposo y líneas secundarias entre las capas anchas de cemento celular (ver lagunas). c) primer incisivo permanente mostrando líneas de crecimiento en cemento acelular, fibras de Sharpey y membrana periodontal. d) líneas de crecimiento de dentina de incisivo. e) marcas de crecimiento en dentina de canino. f) líneas de reposo dobles en cemento acelular de incisivo. g) primer molar de un ciervo de 15 meses de edad cazado en septiembre. La flecha señala la primera línea de reposo formada. h) Esquema de formación de marcas de crecimiento para proceso estandarizado de datación. El círculo blanco indica formación de primera línea de reposo en incisivos. línea blanca a los 6 meses indica formación de primera línea de reposo en molares. n= época de nacimientos. i) primer incisivo permanente del mismo ciervo. La flecha señala la primera línea de reposo formada. Se observa también la línea de separación entre dentina y cemento y membrana periodontal.



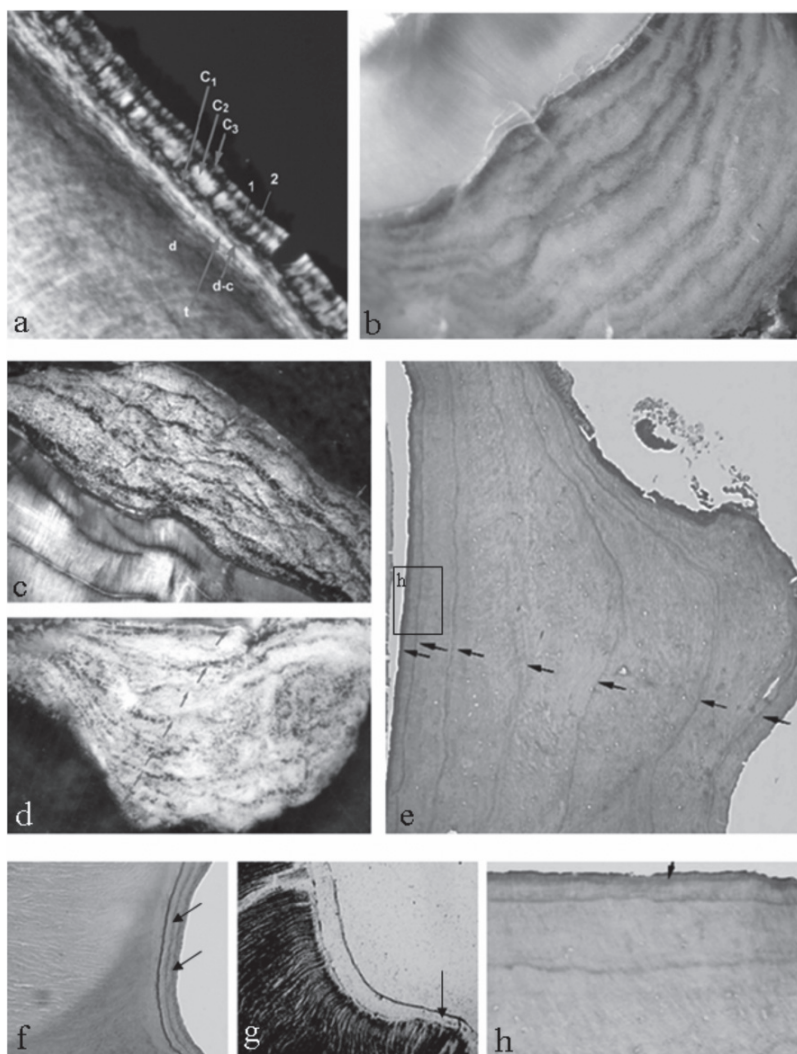


Figura 4.- a) preparaciones histológicas de 4-5 micras de incisivo observado con microscopio de luz polarizada d= dentina, d-c= línea de separación entre cemento y dentina, t= capa granular de Tomes, c1-3= capas de cemento acelular consecutivas, 1-2= líneas de reposo. Se aprecian fibras de Sharpey y membrana periodontal. b) preparación gruesa pulida de la almohadilla interradicular del M1 de ciervo de 11 años de edad, observada con microscopio estereoscópico y luz reflejada c) y d) preparaciones delgado-pulidas de 25 micras observadas con microscopio de luz transmitida e) preparación histológica de 4-5 micras del primer molar de un ciervo cazado en febrero a la edad de 78-80 meses. f) sección histológica de 4-5 micras de M1 obtenida con microtomo convencional y observada con microscopio de luz transmitida. Se observan las dos primeras líneas de reposo, g) Sección delgado-pulida de 25 micras del mismo molar observada con microscopio de luz transmitida. No se aprecia la primera línea de reposo, aunque sí la segunda h) detalle ampliado de las primeras marcas del ciervo de la figura e.

de detalles de la histología dental, facilitan la identificación fiable de las primeras marcas de crecimiento y reposo así como de la línea de separación entre dentina y cemento tanto en molares como en incisivos, y en los incisivos incluso la identificación de la capa granular de Tomes en la dentina. Sin embargo, en las secciones pulidas es mucho más difícil distinguir las primeras marcas, así como otros detalles importantes. Las Figuras 4f y 4g muestran el mismo molar preparado mediante histología convencional y petrografía.

En cualquier caso, en casi todas las preparaciones se pueden observar marcas secundarias o accesorias. Algunas muestras de molares mostraron líneas accesorias en el interior de capas anchas de cemento celular (Figura 3b) que han sido relacionadas con el debilitamiento físico que sufren algunos machos en el periodo de celo (51), pero que han sido también descritas en hembras (59). En la región apical de los incisivos aparece gran cantidad de líneas accesorias como característica del cemento celular de esta zona (14, 60) dificultando el recuento e interpretación a este nivel. En algunos ciervos ocasionalmente también se han observado líneas dobles en el cemento acelular de incisivos (Figura 3f) similares a las marcas irregulares descritas en otras subespecies (61). Y en animales muy viejos las líneas aparecen muy juntas y más difícilmente cuantificables a la vez que las primeras capas de cemento pueden desaparecer debido a la erosión dental por el proceso de masticación tanto en incisivos como en molares. La identificación de líneas accesorias, secundarias, falsas, dobles o suplementarias es esencial para una determinación correcta de la edad.

### 3.3.3. Periodicidad en la formación de marcas de crecimiento

Las *marcas de crecimiento* parecen ser el resultado de fluctuaciones en la tasa y naturaleza de la deposición de tejidos calcificados que reflejan diferentes eventos de la vida del animal. Aunque las causas que las originan han sido objeto de un amplio debate en la literatura, éstas aún no se han determinado satisfactoriamente. Algunos autores consideran que tales marcas tanto en tejidos dentales como en hueso pueden estar relacionadas con cambios estacionales de clima, alimentación, cambios endocrinos y/o cambios regionales (1). Muchos otros opinan que las líneas estrechas corresponden a una restricción en la dieta (8, 24, 62, 63, 64, 65), pudiendo estar también influidas por cambios en el fotoperiodo (66, 67). Pero lo cierto es que los procesos fisiológicos para su desarrollo, así como su regulación son casi desconocidos. Debido al desconocimiento de las causas y mecanismos que las ocasionan es necesario determinar su periodicidad, el número de incrementos y líneas de reposo que se producen por año, así como la época de formación de casa tipo de marca para su correcta interpretación.

En algunos ungulados tropicales, como es el caso del ciervo de cola blanca venezolano (*Odocoileus virginianus venez.*) que es capaz de reproducirse todo el año, las marcas de crecimiento pueden formarse a intervalos variables de seis meses a más de un año (68). En peces (69, 70, 71), algunos anfibios urodelos (72, 73) y algunos mamíferos marinos (74) aparecen dos ciclos de crecimiento al año. Pero en la mayoría de los mamíferos terrestres tanto carnívoros (75) como bóvidos y cérvidos (8, 57, 76, 77,) aparece un ciclo de crecimiento anual, formándose cada año una capa ancha de *crecimiento* y otra estrecha de *reposo*. No obstante, existen amplias variaciones en cuanto a las épocas correspondientes a los periodos de crecimiento o reposo dependiendo de la localización geográfica y de la subespecie (16). Así, en los ciervos de Escocia el crecimiento se observa en verano-otoño y las paradas de crecimiento en invierno-primavera mostrándose las líneas de reposo o detención de crecimiento principalmente desde enero hasta abril (51). En Noruega y Dinamarca las marcas finas de detención de crecimiento se observan también en primavera desde marzo a mayo (78).

En el ciervo ibérico de Sierra Morena el cemento interradicular del primer molar presenta dos marcas por año, una amplia formada en primavera-verano cuyo desarrollo termina en agosto-septiembre y una estrecha que se forma durante otoño-invierno parece que como resultado de un “reposo” en el crecimiento del cemento dental. Las línea de reposo o detención de crecimiento aparece con mas frecuencia desde noviembre a enero, con un pico de formación en diciembre (47). Estas líneas aparecen también antes de enero en ciervos franceses (14). Nuestras observaciones también coinciden con lo observado en otros ungulados del área Mediterránea (79) que muestran líneas estrechas en invierno (diciembre) y anchas en verano. En ciervos de Nueva Zelanda las líneas de reposo se desarrollan desde julio a octubre coincidiendo también con el invierno del hemisferio sur (24).

En el área Mediterránea no es el invierno la época más desfavorable desde el punto de vista trófico por lo que, la aparición de líneas de reposo en invierno y no a finales de verano (época limitante) puede estar apoyando las teorías en relación a cambios endocrinos relacionados con el fotoperiodo como influyentes en la formación de las citadas marcas (66, 67).

### 3.3.4. *Las primeras marcas de crecimiento y reposo y procedimiento estandarizado de datación.*

En los caninos no fue posible determinar el momento de aparición de las primeras marcas de crecimiento periódicas a pesar de disponer de material suficiente de edad conocida, debido a la gran variabilidad encontrada entre individuos. Sólo fue posible

determinar con exactitud la edad de aparición de las primeras marcas en el cemento de incisivos y molares, por lo que los caninos, a pesar de ser piezas accesibles y fáciles de obtener incluso en animales vivos, no resultaron ser esqueletocronológicamente útiles para datar ciervos ibéricos.

Como se describe en trabajos previos (39) en todas las preparaciones histológicas de incisivos permanentes ( $I_1$ ) de ciervos menores de 15 meses se observa una capa de cemento hialino de anchura variable, mientras que a los 15 meses, coincidiendo con el final de la erupción del diente, se observa una línea fina a la que se ha llamado *línea de oclusión* justo después de la capa de cemento hialino. También en otros artiodáctilos ha sido descrita esta línea oclusal incluso antes de que el incisivo hubiera completado el cierre de la raíz dental (79). En los incisivos de ciervos de 18 meses de edad, después de la línea de separación entre dentina y cemento, aparece la capa de cemento hialino, después la *línea de oclusión* y a continuación una segunda capa de cemento de grosor variable. A partir de los 18 meses la segunda *línea de reposo* aparece coincidiendo con la época de detención del crecimiento en noviembre-enero. En la siguiente primavera-verano se forma otra capa de cemento acelular adicional y así sucesivamente. En los molares ( $M_1$ ) la primera capa de crecimiento en el cemento interradicular se desarrolla durante la estación de crecimiento primavera-verano cuando el molar está en fase de erupción a través de la encía, mientras que la primera línea de detención de crecimiento se forma durante el primer invierno, justo cuando el ciervo tiene 6 meses y el molar se hace funcional, es decir cuando choca con su homólogo del maxilar. A esta línea que corresponde con el periodo de menor crecimiento en el cemento dental (noviembre-enero) también la podríamos llamar línea oclusal ya que también coincide con la oclusión molar. La segunda capa de crecimiento se deposita durante la siguiente primavera-verano y la siguiente línea fina de reposo durante el siguiente otoño-invierno y así sucesivamente.

En síntesis, las primeras marcas de crecimiento anchas se forman tanto en incisivos como en molares durante la erupción dental y la primera línea estrecha de reposo o detención de crecimiento aparece a los 6 meses en molares ( $M_1$ ) y a los 15 meses en incisivos ( $I_1$ ) coincidiendo con la oclusión dental. La segunda línea de reposo aparece tanto en molares como en incisivos a los 18 meses de edad coincidiendo con la detención del crecimiento en otoño-invierno, y cada línea fina de *reposo* de crecimiento supone un año más de vida del animal (39, 47). Las Figuras 3g y 3i, correspondientes a preparaciones histológicas del primer molar e incisivo de un ciervo de 15 meses de edad, donde se observan estas primeras marcas en detalle. La determinación de la edad puede realizarse contando las capas anchas o las líneas finas tanto en incisivos como en molares. Pero es más fácil el recuento de las líneas de reposo. Como

se esquematiza en la Figura 3h un ciervo que haya nacido en mayo-junio y cuyos dientes molares e incisivos hayan erupcionado según el patrón habitual a los 6 y 15 meses respectivamente, presentarán dos líneas finas a los 18 meses, 3 a los 30 meses y así sucesivamente. Cada línea sucesiva indica un año más en la vida del ciervo. En consecuencia, la edad en años de un ciervo se estima a partir del número de líneas de reposo menos 0,5 años.

También es posible estimar la edad en meses conociendo el mes de muerte y asumiendo una hipotética época de nacimiento, que en el área de estudio habitualmente va de mayo a junio (ver Figura 4f por ejemplo). Pero cuando el mes de muerte es desconocido deducir la edad en meses es más difícil, especialmente en ciervos cazados entre febrero y octubre, ya que puede haber una diferencia de 6 meses entre dos animales que muestren el mismo número de líneas de reposo por que éstas tienen lugar después de septiembre, entre noviembre y enero como sabemos. En estos casos el análisis de la anchura de la última capa de cemento formada puede resultar útil. Por ejemplo, un ciervo muerto en octubre mostrará una capa ancha de cemento en el borde mientras que otro muerto en enero o febrero mostrará una última línea de reposo muy próxima a una última capa de cemento muy delgada que crecerá durante los siguientes 9 meses hasta la formación de la siguiente línea de reposo. En general, esto es fácil de observar en molares con capas de cemento celular más anchas que las del cemento acelular de incisivos.

### 3.3.5. *Fiabilidad, precisión, errores asociados y limitaciones*

Según algunos autores (8, 10, 80) la ventaja de la esqueletocronología en comparación con otras técnicas es que, una vez validada sobre una especie concreta, constituye un método *absoluto* de determinación de la edad individual. Esta técnica es considerada una de las herramientas disponibles más útiles para la investigación y manejo de la vida silvestre (16). Uno de sus principales valores en investigación es poder ser utilizada como referencia en la evaluación de otros métodos de estimación de edad (81), y también tiene una aplicación interesante en arqueología (79, 82, 83, 84). Sin embargo, se ha reconocido la existencia de un error asociado al método y la necesidad de estimar la frecuencia y la magnitud de este error (85, 86). Además, el grado de precisión de esta técnica no es siempre el mismo, varía según los animales y según procedimientos. Este método es más preciso para mamíferos que viven varios años o incluso varias décadas, que se reproducen una vez durante cierto periodo del año (por ejemplo los ungulados, carnívoros y pinnípedos), y pierde precisión para determinar la edad en pequeños mamíferos que viven 1-2 años y se reproducen varias

veces por año (8). Algunos investigadores llaman la atención sobre la existencia de dificultades en la identificación, recuento e interpretación de marcas de crecimiento según dientes y tipo de muestra, así como debido a la existencia de una gran variabilidad entre observadores (8, 17, 19, 59). Las discrepancias en los resultados podrían ser debidas a diferencias en las técnicas de preparación de los dientes, diferencias en el método de recuento e interpretación, o a diferencias geográficas o fisiológicas entre especies diferentes. Por todo ello, el procedimiento de datación debe ser valorado para cada tipo de subespecie, diente o tipo de preparación, y requiere de un entrenamiento por parte del observador (88).

La precisión en la estimación de la edad del ciervo ibérico fue diferente según el diente usado y según la técnica empleada. Como se muestra en la Tabla 2 el acierto fue del 75% y 64% usando molares descalcificados (método histológico) y sin descalcificar (petrografía) respectivamente, y del 49% usando preparaciones histológicas de incisivos descalcificados. Cuando consideramos un margen de error de  $\pm 1$  con respecto a la edad real el porcentaje de aciertos aumenta hasta el 99%, 92% y 86% usando molares descalcificados, sin descalcificar o preparaciones histológicas de incisivos, respectivamente. Siendo en todos los casos los errores de subestima mas frecuentes que los de sobreestimación de la edad.

**Tabla 2. Frecuencias de error cometido en la determinación de la edad del ciervo ibérico cuando usamos marcas de crecimiento en incisivos o molares a partir de preparaciones previa descalcificación o sin descalcificar (en el caso de molares). Estimaciones para ciervos de edad conocida de 4-44 meses de edad.**

Tipo de error		SUB-ESTIMACIÓN				SOBRE-ESTIMACIÓN		
		-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
<i>Preparaciones histológicas con microtomo convencional</i>								
Frecuencia del error	M <sub>1</sub> (n=55)	0	1,1	21,7	75,0	2,2	0	0
	I <sub>1</sub> (n=64)	3,4	10,2	32,2	49,5	5,1	0	0
<i>Preparaciones petrográficas de molares sin descalcificar</i>								
Frecuencia del error	M <sub>1</sub> (n= 20)	0	8,2	25,8	64,4	1,6	0	0

En términos generales se acepta que en la datación con marcas de crecimiento la exactitud debe estar cercana al 70% y ser del 90% si consideramos un margen de error de 1 año con respecto a la edad real (87). Los rangos de error usando molares son satisfactorios según estos criterios, tanto a partir de muestras descalcificadas como sin descalcificar. Pero usando incisivos los errores son mayores, siendo la precisión de la

estima inferior a lo observado en estudios similares (88, 89, 90). El uso de incisivos está en el límite de lo aceptable ya que además, se han producido errores de subestima de hasta 3 años, no detectados usando molares. Este error podría ser incluso mayor si el estudio hubiera incluido animales mayores de 44 meses de edad, ya que en animales muy viejos las primeras líneas aparecen muy juntas y son más difícilmente cuantificables a la vez que las primeras capas de cemento pueden quedar compactadas debido a la erosión dental o a la presión por el proceso de masticación (27).

Las variaciones de exactitud y precisión entre dientes son debidas a diferencias en el número de líneas o marcas contabilizadas. De todos los ciervos en los que se comparó el número de marcas tanto en incisivos como en molares, el 41% presentó menos marcas en  $I_1$ . A pesar de que los incisivos fueron cortados con microtomo convencional previa descalcificación, que permite una mejor visualización de su histología en detalle, en muchos de ellos no fue posible identificar la primera línea de reposo durante el segundo año de vida del animal. Esto puede ser debido al retraso en la erupción dental de manera que si incisivos permanentes erupcionan después de los 18 meses de edad se formará una única línea de reposo en lugar de dos. El retraso en la erupción del  $I_1$  constituye una fuente de error importante en el área de estudio ya que se ha detectado en un 18.75% de los ciervos estudiados retraso en la erupción del (3.1.1.), y difícil de corregir en un procedimiento estandarizado. Una vez completado el reemplazamiento dentario no es posible saber si un animal adulto ha tardado más o menos en mudar sus dientes de leche.

Las discrepancias entre molares parecen ser debidas a diferencias entre métodos de preparación de muestras. El cemento celular de la almohadilla interradicular observado a partir de preparaciones histológicas (4-5 micras de grosor), muestra un mayor número de líneas de reposo siendo visibles las primeras marcas formadas así como más fáciles de distinguir líneas accesorias o irregulares. Cuando observamos secciones de esta misma zona de los molares en preparaciones petrográficas de grosor superior a 15 micras, las líneas de reposo son más difíciles de identificar, especialmente las primeras marcas formadas (ver Figura 3e-h). Incluso se ha observado que en preparaciones petrográficas las marcas depositadas durante los tres primeros años de vida son más difíciles de distinguir que las que se forman con posterioridad (45, 46, 85). La primera línea de reposo que tiene lugar durante el primer año de vida en el ciervo ibérico puede no ser detectada a partir de preparaciones delgado-pulidas sin descalcificar (ver Figura 4f y 4g). Pero este tipo de diferencias no son difíciles de corregir a través de un proceso estandarizado de recuento. La precisión de la estima de a edad en mamíferos mediante recuento de líneas o marcas en el cemento dental

puede ser mejorada si tenemos un método estandarizado y un trabajo previo de validación a modo de referencia para la especie y/o población objeto de estudio (91).

Cuando usamos molares descalcificados (3.3.4) al número de líneas contadas se les resta 0,5 para determinar la edad en años, pero cuando usamos preparaciones petrográficas es necesario sumar de 1 a 2 al número total de líneas contadas. Sólo se resta 0,5 cuando la preparación obtenida es de mucha calidad y con certeza se puede observar la primera línea formada. De hecho, todos aquellos autores que usan secciones de molares sin descalcificar (24, 51) o usan microtomo de congelación (60) encuentran que la primera marca de reposo es observada durante el segundo invierno de la vida del animal. La primera línea de reposo detectada por la mayoría de los autores que usan este tipo de preparaciones corresponde a la segunda línea de reposo observada usando preparaciones histológicas de piezas descalcificadas, por ello estos autores añaden 1 al número de marcas contabilizadas para obtener la edad correcta (51).

Las preparaciones delgado-pulidas de molares son rápidas de realizar, menos costosas que las histológicas y más conservativas. Por todo ello, se recomienda su uso cuando la cantidad de animales a datar es grande, pero requieren de un proceso de entrenamiento por parte del observador para una correcta interpretación.

Los investigadores y/o gestores deben ser conscientes del error que se comente con cada método y la elección del método de datación ha de ir en función del grado de precisión que requieran los objetivos de gestión o investigación marcados. Cuando se requiere información rápida y determinar los grupos de edad durante trabajos de campo la combinación de desgaste y reemplazamiento ha sido utilizada satisfactoriamente (92, 93, 94).

#### 4. CONCLUSIONES

El establecimiento de protocolos estandarizados para cada especie y población y un entrenamiento previo del observador en todos los métodos de datación reduce errores por subjetividad. Los errores cometidos en la datación deben ser sólo los propios o intrínsecos a cada método.

La erupción dental permite determinar la edad hasta los tres años y medio y una combinación de desgaste y erupción dental establecer al menos 7 clases de edad útiles en estudios de población.



En cuanto a métodos esqueletocronológicos se aconseja usar marcas de crecimiento y reposo en el cemento celular interradicular del primer molar inferior en detrimento del uso de incisivos.

Con muestras de molares ( $M_1$ ) previa descalcificación la edad en años se estima restando 0,5 años al número total de líneas de reposo contadas en el cemento celular interradicular. La fiabilidad es la máxima registrada, del 75% (99% considerando un error de  $\pm 1$  año).

Para conseguir una precisión similar usando preparaciones delgado-pulidas de molares sin descalcificar se requiere un ajuste consecuente a la calidad de la preparación. Según los casos es necesario sumar de 1 a 2 años al número de líneas de reposo contadas. Sólo se resta 0,5 cuando la primera marca es ciertamente visible.

## AGRADECIMIENTOS:

A Julian Garde López-Brea y Tomás Landete de la Universidad de Castilla la Mancha, a propietarios, gestores y guardas de fincas cinegéticas en Sierra Morena Oriental como El Friscalejo, El Morron de las Mujeres, El Mencho, La Alameda, Valquemado o Lugar Nuevo,...entre otras. A taxidermistas como Alfonso Blanco y Juan Pleités, a empresas como Monterías Cencerra y Monterías Chamocho. A los Departamentos de Mineralogía de la Universidad de Granada, Geología de la Universidad de Jaén, Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba y a la Estación Biológica de Doñana, especialmente a: Alfonso, Aniceto Méndez, Antonio Piedra y Ernesto García. También a Mario Martínez Pulido, José Hervás, Rafael Carrasco y en especial Mohamed Analla, Joaquín Muñoz-Cobo quien orientó los trabajos, y a G.A. Klevezal, G. Matson y B. Mitchell quienes los revisaron y mejoraron, o facilitaron importante información inicial.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Bourlière, F., Spitz, F. 1975. Les critères d'âge chez les Mammifères. In: Problèmes D'écologie: La démographie des populations de Vertébrés. Pp: 53-76. Eds. M. Lamotte & F. Bourlière. Masson et Cie. París.
2. Riney, T. 1982. Study and Management of large Mammals. Eds. John Wiley and sons. New York.
3. Azorit, C., Analla, M., Carrasco, R., Muñoz-Cobo, J. 2002a. Influence of age and environment on antler traits in Spanish red deer. Zeitschrift für Jagdwissenschaft 48: 137-144.
4. Azorit, C., Analla, M., Carrasco, R.J., Carrasco, A., Muñoz-Cobo, J. 2002b. Astas, esqueleto y edad del ciervo de Sierra Morena Oriental: estudio de correlación. Anales de Biología 24: 169-174.

5. Johnston, D.H., Joachim, D.G., Bachmann, P., Kardong, K.V., Stewart, R.A., Dix, L.M., Strickland, M.A., Watt, I.D. 1987. Aging furbearer using tooth structure and biomarkers. In: Wild furbearer Management and Conservation in North America Ontario, Canada. Pp: 228-243. Eds. Novak, M., Baker, J.A., Obbard, M.E., Malloch, B.
6. Aparicio, G. 1946. Fenotipología Animal. Ministerio de Agricultura, Madrid.
7. Aparicio, G. 1956. Exterior de los animales domésticos. Morfología externa. Imp. Moderna. Córdoba.
8. Klevezal, G.A., Kleinenberg, S.E. 1967. Age determination of mammals from annual layers in teeth and bones. Translation by Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1969, No. 5433.
9. Morris, P. 1972. A review of mammalian age determination methods. Mammal Review 2: 69-104.
10. Morris, P. 1978. The use of teeth for estimating the age of wild mammals. Pp: 483-494 in Butler, P.M., Joysey, K.A. editors. Development, function and evolution of teeth. Academic Press, London, United Kingdom.
11. Larson, J.S., Taber, R.D. 1980. Criteria of sex and age. In: Wildlife Management Techniques Manual. 4th edition. Ed. Schemitz S.D. Wildlife Society. Washington D.C.
12. Sáenz de Buruaga, M., Lucio, A.J., Purroy, F.J. 1991. Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegéticas. Diputación Foral de Álava, Gobierno Vasco.
13. Dimmick, R.W., Pelton, M.R. 1994. Criteria of sex and age. In: Research and management techniques for wildlife and habitats. Pp: 169-214. Ed. Bookhout, T.A. Fifth Edition. The Wildlife Society, Bethesda, MD. 740 pp.
14. Quéré, J.P., Pascal, M. 1983. Comparaison de divers critères de détermination de l'âge individuel chez le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) de France. Annales des Sciences Naturelles-Zoologie 13: 235-252.
15. Castanet, J., Meunier, F., Ricqlès, A. 1977. L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les vertébrés poikilothermes: données comparatives et essai de synthèse. Bulletin Biologique de la France et de la Belgique 111: 183-202.
16. Grue, H., Jensen, B. 1979. Review of the formation of growth lines in tooth cementum of terrestrial mammals. Danish Review of Game Biology 11: 1-48.
17. Roseberry, J.L. 1980. Age determination of white-tailed deer in the Midwest. Methods and problems. White-tailed deer population management in the north central states. North Central Section of the Wildlife Society, Midwest Fish and Wildlife Conference 41: 73-82.
18. Vincent, J.P., Angibault, J.M., Bideau, E., Gaillard, J.M. 1994. Le problème de la détermination de l'âge: Une source d'erreur négligée dans le calcul des tables de vie transversales. Mammalia 58: 293-299.
19. McCullough, D.R. 1996. Failure of the tooth cementum aging technique with reduced population density of deer. Wildlife Society Bulletin 24:722-724.
20. Harris, S. 1978. Age determination in the red fox (*Vulpes vulpes*): an evaluation of technique efficiency as applied to a sample of suburban foxes. Journal of Zoology 184: 91-118.
21. Schemnitz, S.D. (ed.) 1980. Wildlife Management Techniques Manual. 4<sup>th</sup> ed. The Wildlife Society. Washington. 575 p.
22. Mitchell, B. 1963. Determination of age in Scottish red deer from growth layers in dental cementum. Nature, London 198: 350-351.
23. Lowe, V.P.W. 1967. Teeth as indicators of age with special reference to red deer (*Cervus elaphus*) of known age from Rhum. Journal of Zoology London 152: 137-152.
24. Douglas, M.J.W. 1970. Dental cement layers as criteria of age for deer in New Zealand with emphasis on red deer, *Cervus elaphus*. New Zealand Journal of Science 13: 352-358.

25. Almasan, H.A., Rieck, W. 1970. Untersuchungen der Zahnstruktur zur Altersbestimmung beim Rotwild (*Cervus elaphus* L.). Zeitschrift für Jagdwissenschaft 18: 222-224.
26. Ueckermann, E., Scholz, H. 1976. Vergleich der ersatzdentinbildung im 1. Scheidezahn und der zementzonenbildung im 1. Molar mit dem abnutzungsgrad der backenzähne im Unterkiefer beim Rothirsch (*Cervus elaphus* L., 1958). Zeitschrift für Jagdwissenschaft 22: 65-74.
27. Müller-Using, D. 1981. Rotwildalter-Merkblatt. Seventh edition. D. J. V., Bonn, Germany.
28. Godawa, J. 1989. Age determination in the Red deer. Acta Theriologica 34(28): 381-384.
29. Brown, W.A., Chapman, N.G. 1991. The dentition of red deer (*Cervus elaphus*) a scoring scheme to assess age from wear of the permanent molariform teeth. Journal of Zoology 224: 519-536.
30. Costa, L. 1991. Ordenación y gestión de la caza mayor. En: Manual de ordenación y gestión cinegética. Pp: 259-296. Ed. Alvarado Corrales. IFEBA, Badajoz.
31. Arenas, A., Perea, A. 1993. El Ciervo en Sierra Morena. Eds. A. Arenas y A. Perea. Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Córdoba.
32. Mariezkurrena, K. 1983. Contribución al conocimiento del desarrollo de la dentición y el esqueleto postcranial de *Cervus elaphus*. Munibe 35: 149-202.
33. Azorit, C., Analla, M., Carrasco, R., Calvo, J.A., Muñoz-Cobo, J. 2002c. Teeth eruption pattern in red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) from southern Spain. Anales de Biología 24: 193-200.
34. Azorit, C., Analla, M., Carrasco, R., Muñoz-Cobo, J. 2003a. Determinación de la edad por desgaste dental en el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*, Erxleben, 1777) (Mammalia, Cervidae). Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sec. Biol.) 98(1-4): 123-134.
35. Azorit, C., M. Analla, R. Carrasco, and J. Muñoz-Cobo. 2003b. Efecto del sexo, densidad y año de muerte, sobre el desgaste dental del ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*, Erxleben, 1777) (Mammalia, Cervidae) en Sierra Morena, España. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sec. Biol.) 98(1-4): 115-122.
36. Braza, F., Soriguer, R.C., San José, C., Delibes, J.R., Aragón S., Fandos, P., León, L. 1994. Métodos para el estudio y manejo de cérvidos. Junta de Andalucía, Sevilla.
37. Soriguer, R.C., Fandos, P., Bernaldez, E., Delibes, J.R. 1994. El ciervo en Andalucía. Eds. Soriguer, R.C., Fandos, P., Bernaldez, E., Delibes, J.R. Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla.
38. Azorit, C. 1999. Estudio de la edad y su aplicación a la gestión cinegética del ciervo en Sierra Morena Oriental. Tesis doctoral. Universidad de Jaén. 280 p.
39. Azorit, C., Muñoz-Cobo, J., Hervás, J., Analla, M. 2004. Aging through growth marks in teeth of Spanish red deer. Wildlife Society Bulletin 32(3): 702-710.
40. Attwell, C.A.M. 1980. Age determination of the blue wildebeest *Connochaetes taurinus* in Zululand. South African Journal of Zoology/Suid Afrikaanse Tydskrif vir Dierkunde 15(3): 121-130.
41. Moore, N.P., Cahill, J.P., Kelly, P.F., Hayden, T.J. 1995. An assessment of five methods of age determination in an enclosed population of fallow deer (*Dama dama*). Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy 95B: 27-34.
42. Phillipson, S., Lindsog, S, Flock, A. 1990. Mineralization of and cementoblast attachment to original and reparative cementum. Scandanavian Journal of Dental Research 98:295-300.
43. Davis, W.L. 1986. Oral Histology. Ed. W.B. Saunders. Philadelphia, PA.
44. Jones, S.J. 1981. Dental Tissues. In: Dental Anatomy and Embriology. Pp 66-209. Ed. Osborne, J.W. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
45. Azorit, C., Hervas, J. Analla, M. Carrasco, R., Muñoz-Cobo, J. 2002d. Histological thin-sections: a method for the microscopic study of teeth in Spanish red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Anatomia Histologia Embryologia (Journal of Veterinary Medicine, Series C) 31:224-227.
46. Azorit, C., Analla, M., Hervas, J., Carrasco, R., Muñoz-Cobo, J. 2002e. Growth marks observation: preferential techniques and teeth for ageing of Spanish red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Anatomia Histologia Embryologia (Journal of Veterinary Medicine, Series C) 31:303-307.

47. Azorit, C., Muñoz-Cobo, J., Analla, M. 2002f. Seasonal deposition of cementum in first lower molars from *Cervus elaphus hispanicus*. *Mammalian Biology* 67:1-3.
48. Kierdorf, U., Becher, J. 1997. Mineralization and wear of mandibular first molars in red deer (*Cervus elaphus*) of known age. *Journal of Zoology London* 241: 135-143.
49. Wagenknecht, E. 1980. *Der Rothirsch*. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
50. Drescher, H. 1989. *Das Rotwild*. Landbuch-Verlag GmbH. Hannover.
51. Mitchell, B. 1967. Growth layers in dental cement for determining the age of red deer (*Cervus elaphus* L.). *Journal of Animal Ecology* 36: 279-293.
52. Lotze, K. 1968. Comment juger un cerf?. Ed. Gerfaut, Paris.
53. ONC (Office National de la Chasse) 1984. *Le Cerf d'Europe*. Paris.
54. Castanet, J., Smirina, E. 1990. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. *Annales des Sciences Naturelles-Zoologie* 11: 191-196.
55. Scheffer, V.B. 1950. Growth layers on the teeth of *Pinnipedia* as an indication of age. *Science* 112(2907): 309-311.
56. Laws, R. 1952. A new method of age determination for mammals. *Nature, Lon.* 169(4310): 972-974.
57. Sergeant, D.E., Pimlott, D.H. 1959. Age determination in moose from sectioned incisor teeth. *The Journal of Wildlife Management* 23(3): 315-321.
58. Rausch, R.L. 1961. Notes on the Black Bear, (*Ursus americanus*, Pallas), in Alaska, with Particular Reference to Dentition and Growth. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 2(26): 77-107.
59. Lockard, G.R. 1972. Further studies of dental annuli for aging white-tailed deer. *The Journal of Wildlife Management* 36: 46-55.
60. Ohtaishi, N., Kaji, K., Miura, S, Wu, J. 1990. Age determination of the white-lipped deer (*Cervus albirostris*) by dental cementum and molar wear. *Journal of Mammal Society, Japan* 15: 15-24.
61. Rice, L. 1980. Influences of irregular dental cementum layers on aging deer incisors. *The Journal of Wildlife Management* 44: 266-268.
62. Ransom, A.B. 1966. Determining the age of white-tailed deer from layers in cementum of molars. *The Journal of Wildlife Management* 30: 197-199.
63. Boozer, R.B. 1969. Cementum annuli versus tooth wear aging of the white-tailed deer of Alabama. Dissertation, Auburn University, Auburn, Alabama, USA.
64. Miller, F.L. 1974. Age determination of caribou by annulations in dental cementum. *The Journal of Wildlife Management* 38: 47-53.
65. Hass, A. 1977. Contribution a l'étude des appositions de ciment dentaire au niveau des molaires chez *Cervus elaphus* L. These n°32. Université Louis Pasteur Strasbourg I Faculté Chirurgie dentaire.
66. Saxon, A., Higham, C.F.W. 1968. Identification and interpretation of growth rings in the secondary dental cementum of *Ovis aries* L. *Nature* 219(5154): 634-635.
67. Stallibrass, S. 1982. The use of cement layers for absolute ageing of mammalian teeth: a selective review of the literature, with suggestions for further studies and alternative applications. In *Ageing and sexing animal bones from archeological sites* (eds Wilson, B., Grigson, C., Payne, S.) Pp. 109-126. BAR British Series 109.
68. Brox, P.A. 1972. Age determination of Venezuelan white-tailed deer. *The Journal of Wildlife Management* 36: 1060-1067.
69. Meunier, F.J., Lecomte, F., Rojas-Beltrán, R. 1985. Mise en évidence de doubles cycles annuels de croissance sur le squelette de quelques teleostes de Guyane. *Bulletin de le Société Zoologique de France* 110(3): 285-289.
70. Lecomte, F., Meunier, F.J., Rojas-Beltrán, R. 1985. Mise en évidence d'un double cycle de croissance annuel chez un Silure de Guyane, *Arius couma* (Val., 1839) (Teleostei, Siluriforme, Ariidae)

- à partir de l'étude squeletochronologique des épines des nageoires. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris 300: 181-184.
71. Lecomte, F., Meunier, F.J., Rojas-Beltrán, R. 1986. Données préliminaires sur la croissance de deux téléostées de Guyane, *Ariun proops* (Ariidae, Siluriformes) et *Leporinus friderici* (Anostomidae, Characoidei). *Cybio* 10: 121-134.
  72. Caetano, M.H., Castanet, J., Francillon, H. 1985. Détermination de l'âge de *Triturus marmoratus* (Latreille 1800) du Parc National de Peneda Gerês (Portugal) par squeletochronologie. *Amphibia-Reptilia* 6: 117-132.
  73. Caetano, M.H., Castanet, J. 1987. Experimental data on bone growth and age in *Triturus marmoratus*. 4th Meeting of the European Society of Herpetology. Nijmegen 1987: 87-90.
  74. Klevezal, G.A., Myrick, A.C. 1984. Marks in tooth dentine of female dolphins (Genus *Stenella*) as indicators of parturition. *Journal of Mammalogy* 65(1): 103-110.
  75. Zapata, S.C., García Perea, R., Beltrán, J.F., Ferreras, P., Delibes, M. 1997. Age determination of Iberian lynx (*Lynx pardina*) using canine radiograph and cementum annuli enumeration. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 62: 1-5.
  76. Novarowski, 1965. Cemental deposition as an age criterion in bison, and the relation of incisor wear, eye-lens weight, and dressed bison carcass weight to age. *Canadian Journal of Zoology* 43: 173-178.
  77. Klevezal, G.A., Pucek, M. 1987. Growth layers in tooth cement and dentine of European bison and its hybrids with domestic cattle. *Acta Theriologica* 32(9): 115-128.
  78. Ahlen, I. 1965. Studies on the red deer (*Cervus elaphus* L.) in Scandinavia. III Ecological investigations. *Viltrevy* 3: 177-376.
  79. Lieberman, D.E. 1994. The biological basis for seasonal increments in dental cementum and their application to archaeological research. *Journal of Archaeological Science* 21: 525-539.
  80. Pascal, M., Castanet, J. 1978. Méthodes de détermination de l'âge chez le chat haret des îles Kerguelen. *Terre et Vie* 32: 529-555.
  81. Mitchell, B., Youngson, R.W. 1969. Teeth and age in Scottish Red Deer a practical guide to age assessment. Ed.: Red Deer Commission. Inverness.
  82. Bourque, B.J.K., Morris, K., Spiess, A. 1978. Determining the season of death of mammal death of mammal teeth from archeological sites: A new sectioning technique. *Science* 199(4328): 530-531.
  83. Lieberman D.E., Meadow, R.H. 1992. The biology of cementum increments (with an archaeological application). *Mammal Review* 22: 58-77.
  84. Sanchez-Villagra, M.R. 2010. Suture closure as a paradigm to study late growth in recent and fossil mammals: a case study with giant deer and dwarf deer skulls. *Journal of Vertebrate Paleontology* 30(6): 1895-1898.
  85. Gasaway, W.C., Harkness, D.B., Rausch, R.A. 1978. Accuracy of moose age determinations from incisor cementum layers. *The Journal of Wildlife Management* 42: 558-563.
  86. Dapson, R.W. 1980. Guidelines for statistical usage in age-estimation techniques. *The Journal of Wildlife Management* 44: 541-548.
  87. Matson, G. 1981. Workbook for cementum analysis. Matson's, Milltown, Montana, USA.
  88. Hamlin, K.L., Pac, D.F., Sime, C.A., Desiml, R.M., Desek, G.L. 2000. Evaluating the accuracy of ages obtained by 2 methods for Montana ungulates. *The Journal of Wildlife Management* 64: 441-449.
  89. Rolandsen, C.M., Solberg, E.J., Heim, M., Holmstrøm, F., Solem, M.I., Sæther, B.E. 2008. Accuracy and repeatability of moose (*Alces alces*) age as estimated from dental cement layers. *European Journal of Wildlife Research* 54: 6-14.

90. Asmus, J., Weckerly, F.W. 2011 Evaluating precision of cementum annuli analysis for aging mule deer from southern California. *The Journal of Wildlife Management* **75(5)**: 1194-1199
91. Fancy, S.G. 1980. Preparation of mammalian teeth for age determination by cementum layers: a review. *Wildlife Society Bulletin* **8**: 242-248.
92. Carranza, J., Mateos, C., Alarcos, S., Sanchez-Prieto, C.B., Valencia, J. 2008. Sex-specific strategies of dentine depletion in red deer. *Biological Journal of the Linnean Society* **93**: 487-497.
93. Jacobson, H.A., Reiner, R.J. 1989. Estimating age of white-tailed deer: tooth wear versus cementum annuli. *Proceeding of Annual Conference. Southeast Association of Fish and Wildlife Agencies* **43**: 286-291.
94. Hall, G.P., Murray, P.J., Byrne, M.J. 2012. Is Tooth Wear a Reliable Means of Aging Wild European Fallow Deer in Tasmania, Australia? *Wildlife Society Bulletin* **36(1)**: 124-129.