

Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay



Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay



Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA)

Universidad de la República (UdelaR)

Editor: Franco Teixeira de Mello



Montevideo, Uruguay 2019

Imagen tapa: espécimen de *Bartramia longicauda* en captura nocturna para su marcado y toma de muestras. Foto: Luciano Liguori.

Comisión Honoraria de Experimentación Animal
CHEA 2018. Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay.
Comisión Honoraria de Experimentación Animal.
Editor: Franco Teixeira de Mello. Montevideo, Uruguay. CSIC.

ISBN 978-9974-0-1728-3



1ª edición, diciembre 2019

Derechos reservados

Queda prohibida cualquier forma de reproducción, transmisión o archivo en sistemas recuperables, sea para uso privado o público por medios mecánicos, electrónicos, fotocopiadoras, grabaciones o cualquier otro, total o parcial, del presente ejemplar con o sin finalidad de lucro, sin la autorización expresa del editor.

ISBN: 978-9974-0-1728-3

Impreso en Uruguay

PRÓLOGO

La producción de conocimiento en disciplinas biomédicas, la conservación de la diversidad de nuestra fauna, la necesidad de anticipar y mitigar el impacto del cambio climático, entre otras actividades, todavía requieren del uso de animales de experimentación. Es decir, a pesar del gran número de tareas en las que su uso ha sido erradicado y racionalizado, fundamentalmente por el avance de métodos estadísticos, es todavía indispensable el empleo de animales en experimentación y, en términos absolutos, su número crece de la mano del progreso de la ciencia. En este marco, la tendencia actual es encarar el uso de los animales de experimentación con actitud proactiva, responsable y comprometida con asegurar el máximo bienestar posible a los seres que son sacrificados para este fin. Este libro es un excelente ejemplo de eso al enfocarse, con mirada honesta, idónea y actualizada en el manejo de campo de las principales especies silvestres autóctonas con las que se trabaja en el país.

La Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA) ha estado preocupada en capacitar y actualizar a sus funcionarios (docentes y no docentes) y a sus estudiantes en las técnicas de uso y manejo de animales de experimentación desde su creación en el año 2002. Ha trascendido en mucho sus cometidos al convertirse en el organismo rector a nivel nacional de la capacitación de los usuarios de animales en experimentación, docencia e investigación a través del dictado de cursos habilitantes que cumplen los más altos estándares internacionales desde hace 15 años. Con responsabilidad y visión nacional, ha coadyuvado a que Uruguay sea uno de los pocos países en el mundo que acredita a los diferentes niveles de usuarios de animales en experimentación mediante una formación presencial homogénea y equivalente. Por otra parte, muy tempranamente en su accionar, la CHEA ha reconocido dos grupos de animales peculiares que representan una proporción importante de las especies usadas en investigación en la Universidad de la República y en el país: los animales productivos y los animales no tradicionales de experimentación, para los cuales han desarrollado políticas concretas tendientes a la elaboración de recomendaciones específicas, así como al entrenamiento dirigido según la especialización de sus usuarios.

La CHEA ha acuñado el nombre de Animales No Tradicionales de Experimentación (ANTE) para englobar a todas las especies de animales vertebrados de uso poco común en investigación biomédica, en los que las recomendaciones de manejo establecidas para los animales de experimentación tradicionales no son completamente aplicables. Los ANTE imponen al menos dos desafíos inte-

resantes a la hora de pautar su manejo: en primer lugar son, por definición, un grupo diverso no relacionado de especies para el que es imposible pensar en recomendaciones generalizadas; en segundo lugar, son mayormente especies de animales silvestres, que por tanto implican capítulos novedosos de regulaciones, no previstos en las normativas tradicionales. En este libro editado por Franco Teixeira de Mello, excoordinador, y actual representante del CURE ante la CHEA, se propone una visión exhaustiva del uso de los ANTE en el país a través de la voz de investigadores uruguayos protagonistas de la generación de conocimiento en el área. Luego de dos capítulos introductorios que posicionan la temática en el plano ético y de las regulaciones vigentes, el libro se enfoca en el manejo de campo de especies silvestres de todas las clases de vertebrados: peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Seguidamente, el libro describe experiencias de manejo concretas desarrolladas por investigadores uruguayos sobre especies de mamíferos icónicos como el venado de campo, los lobos y leones marinos, y los murciélagos, así como sobre las políticas de erradicación de especies exóticas. Finalmente, el libro propone un extenso capítulo estadístico centrado en la importancia del diseño experimental para optimizar los resultados obtenidos con el uso de animales de experimentación.

Destaco la utilidad de este libro como guía práctica de manejo, como material de apoyo para los cursos de capacitación de la CHEA, así como para la consulta diaria a la hora de diseño y ejecución de muestreos y experimentos que involucren ANTE. Pero mucho más destaco la conciencia y generosidad de los autores al compartir su experiencia forjada en años de trabajo. En ese crisol de aportes se construye este libro, que es mucho más que la suma de las partes, es la primera compilación exhaustiva y sistemática de las experiencias de manejo de campo de animales vertebrados del país.

Ana Silva

*Profesora Agregada, Laboratorio de Neurociencias,
Facultad de Ciencias, Universidad de la República*

*Exrepresentante por Facultad de Ciencias ante la
Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República
Ex Presidente de la Comisión Nacional de Experimentación Animal*

Contenido

PRÓLOGO.....	3
CAPÍTULO 1	
Consideraciones éticas sobre el uso de animales no humanos en experimentación. Las tres erres como base para la regulación de la experimentación animal	
<i>Annabel Ferreira - Natalia Uriarte.....</i>	9
CAPÍTULO 2	
Principios rectores asociados a la experimentación con animales vertebrados. La realidad en Uruguay y sus regulaciones	
<i>Martín Breijo - Laura Domínguez</i>	18
CAPÍTULO 3	
Experimentación con animales no tradicionales: desde el muestreo de campo al laboratorio	
<i>Franco Teixeira de Mello</i>	27
CAPÍTULO 4	
Colecta y manejo de peces en el ambiente: énfasis en peces de aguas continentales	
<i>Franco Teixeira de Mello</i>	32
CAPÍTULO 5	
La construcción de un modelo experimental a partir de una especie silvestre: el caso de los peces eléctricos uruguayos	
<i>Ana Silva.....</i>	57

CAPÍTULO 6

Colecta y manejo de anfibios en el ambiente

Raúl Maneyro..... 70

CAPÍTULO 7

**Métodos alternativos para el estudio de anfibios en campo:
bioacústica en anuros desde los organismos a las comunidades**

Lucía Ziegler- Andrés Canavero..... 79

CAPÍTULO 8

**Métodos alternativos para el estudio de anfibios en campo:
fotoidentificación**

Ernesto Elgue..... 91

CAPÍTULO 9

Colecta y manejo de reptiles en el ambiente

Santiago Carreira..... 98

CAPÍTULO 10

**Métodos alternativos para el estudio de reptiles en campo: modelos
artificiales**

Inés da Rosa - Arley Camargo..... 108

CAPÍTULO 11

**Colecta y manejo de aves en el ambiente y métodos alternativos
para el estudio en campo**

Matilde Alfaro - Joaquín Aldabe..... 121

CAPÍTULO 12

Avances de estudios en Uruguay: experimentación en mitigación de la captura incidental de aves marinas en pesquerías industriales

Sebastián Jiménez - Andrés Domingo 141

CAPÍTULO 13

Captura y manejo de mamíferos medianos y grandes en el campo

Ariel Farías,..... 154

CAPÍTULO 14

Captura y manejo de micromamíferos en el campo

Diego Queirolo 169

CAPÍTULO 15

Métodos alternativos para el estudio de mamíferos en campo: métodos directos e indirectos

Ariel Farías 181

CAPÍTULO 16

Avances de estudios en Uruguay: pautas para la captura de ejemplares de venado de campo

Susana González,..... 192

CAPÍTULO 17

Avances de estudios en Uruguay: protocolos de manipulación de lobos y leones marinos

Valentina Franco-Trecu - Helena Katz 198

CAPÍTULO 18

Avances de estudios en Uruguay: murciélagos

Ana L. Rodales - Germán Botto 207

CAPÍTULO 19

**Avances de estudios en Uruguay: el dilema del control y
erradicación de las especies exóticas invasoras ante los
requerimientos de la opinión pública**

Gabriel Laufer..... 224

CAPÍTULO 20

Desarrollo estadístico como herramienta experimental

Matías Arim - Mariana Meerhoff..... 238

CAPÍTULO 1

Consideraciones éticas sobre el uso de animales no humanos en experimentación. Las tres erres como base para la regulación de la experimentación animal

Annabel Ferreira¹ - Natalia Uriarte²

La mayor parte de los grandes avances de la investigación biológica contemporánea se funda, en gran medida, en el trabajo de numerosos equipos de investigadores que experimentan con animales. Sin ese continuo caudal de resultados experimentales ni la medicina humana ni la animal habrían podido desarrollarse. Pero esta actividad científica no está libre de objeciones, intensificadas en los últimos años por parte de quienes manifiestan preocupación por el bienestar y los derechos de los animales o, más ampliamente, por aspectos éticos de la relación de los humanos con los animales.

Los cuestionamientos de filósofos y activistas, entre otros, han dado lugar a una “nueva ética para el trato de los animales” (Fox, 1988; Reagan, 1989; Singer, 1990; Gruen, 1995; Donaldson & Kymlicka, 2011) que ha influido para que muchos científicos dejen de pensar en los animales como meros autómatas o “reactivos biológicos” y comiencen a considerarlos como seres capaces de sentir y de merecer una consideración moral.

El propósito de este capítulo es informar, muy someramente, acerca de algunos antecedentes, el marco teórico y las discusiones recientes respecto a “la cuestión animal”, en particular la relacionada a la práctica de la experimentación con animales, una discusión que parece hoy tan necesaria como inevitable. Creemos que la reflexión crítica, tomando en cuenta todas las vertientes involucradas,

-
- 1 - Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay.
- Laboratorio de Experimentación Animal, Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay.
anna@fcien.edu.uy
 - 2 - Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay.
- Laboratorio de Experimentación Animal, Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay.
natiuria@fcien.edu.uy

abre nuevas posibilidades, teóricas y prácticas, para procurar dar respuestas a los actuales cuestionamientos morales que la experimentación con animales recibe.

Algunos antecedentes

En el pasado, la confianza absoluta en la autoridad de los científicos y en los beneficios progresivos que produciría el avance del conocimiento, que en muchos campos recurría al uso de animales en experimentos, enfrentaba escasas objeciones. El convencimiento de que nuestra especie dominaba el mundo y se distinguía del resto por poseer atributos superiores, tales como alma, razón o lenguaje, parecía bastar para desatender esos cuestionamientos (Midgley, 1983).

De acuerdo a la perspectiva entonces predominante, a los hombres compete imperar sobre la naturaleza, incluso si, como creía Bacon (1561-1626), solo podemos mandar a la naturaleza si la obedecemos (Bacon, 1854). Los derechos de la humanidad sobre la naturaleza eran, para la mayoría, un don de Dios o, para agnósticos y escépticos, una consecuencia de su exclusivo y privilegiado papel inquisidor y realizador.

La ausencia de autonomía en la decisión, la inexistencia de capacidad autocrítica, la incapacidad de planificación, la no posesión de lenguaje elaborado y de pensamiento o la incapacidad de asumir responsabilidades por lo actuado serían, en opinión de algunos, características distintivas de los animales no humanos que los excluirían de una comunidad moral que sólo comprendería a los humanos o, en el mejor de los casos, los colocaría en un plano moral diferente (Davidson, 1984; Frey, 1988). Con la justificación del beneficio para la especie humana de los resultados de la experimentación animal, los científicos podían hacer un uso irrestricto de las otras especies (Bernard, 1865).

Sin embargo, esas justificaciones no eliminaron la preocupación por los animales. Algunos antecedentes antiguos, como *El libro de los muertos* egipcio y el jainismo indio, prohíben el trato cruel de los animales o proponen el respeto incondicional por toda forma de vida (Bilimoria, 1995; Laurie, 1995). Observaciones más modernas, como las de Rousseau (1754) o las de Bentham (1789), enfatizan el sentimiento humano natural de compasión hacia todos los seres "sintientes" y las obligaciones de los humanos hacia los "brutos".

En décadas recientes ha aumentado la preocupación por el bienestar y los derechos de los animales en tanto seres que pueden sufrir (Fox, 1986; Frey, 1988; Singer, 1990). Las justificaciones tradicionales acerca del uso de animales para el beneficio humano han sido calificadas como "especismo", es decir discriminación y trato desigual en virtud de la pertenencia a otra especie distinta que la humana, condenable a la par que el racismo, el sexismo y otras discriminaciones hoy censuradas (Ryder, 1983; Singer, 1990). Quienes sostienen esta última posición no necesariamente equiparan al hombre con los restantes animales en todos

los aspectos, pero objetan el uso irreflexivo de seres vivos, contra su voluntad, para prácticas experimentales intrusivas, dolorosas o mortales. Advierten que las propias teorías modernas acerca de la evolución vinculan más estrechamente entre sí a las especies que las concepciones precientíficas, obligándonos a considerar que el dolor, las emociones y la comunicación son, entre otras, experiencias compartidas tanto por el hombre como por los restantes animales (Darwin, 1872; Panksepp, 1998; de Waal, 2004). Sin duda estas teorías han influido en la conciencia ética de los científicos, y han conducido a una disminución paulatina en la utilización de animales en experimentos, y a la formulación de reglamentaciones en esta disciplina.

Tres enfoques: de bienestar, ecológico y de derechos

Gran parte del debate actual sobre el tratamiento que hacemos de los animales se basa en los siguientes tres enfoques: de “bienestar animal”, “ecológico” y de “derechos básicos”.

El enfoque del “bienestar animal” señala que, desde el punto de vista moral, es importante considerar el bienestar de los animales no humanos, aunque esté subordinado a los intereses de los seres humanos. En esta visión, los animales no son meros autómatas, sino seres vivos que pueden sentir, obligando a los humanos a otorgarles una consideración moral. Esto no implica que se les atribuya la misma jerarquía moral que a los seres humanos ni que se prohíba su uso en experimentos y otras prácticas en beneficio de los humanos.

Este enfoque puede prevenir algunas formas de crueldad sin sentido o de abuso de los animales, pero se vuelve en gran medida ineficaz cuando se enfrenta a casos de explotación animal para los que hay un interés humano reconocible, incluso trivial como, por ejemplo, el uso de animales para el testeo de cosméticos.

El criterio utilitarista (Bentham, 1789; Singer, 1990), en principio, podría justificar el uso instrumental de animales no humanos con propósitos de experimentación en la convicción de que los beneficios que así se obtienen son mayores que el daño que se les ocasiona.

El enfoque “ecológico” se centra en la salud de los ecosistemas, de los cuales los animales son un componente vital, más que en el destino de los animales en tanto individuos. El holismo ecológico proporciona una crítica a muchas prácticas humanas que son devastadoras para los animales. Estas prácticas pueden ir desde la destrucción del hábitat hasta los excesos contaminantes de la agricultura industrial. Sin embargo, si el sacrificio de animales tiene un impacto neutral o incluso positivo en los sistemas ecológicos (por ejemplo, la caza sostenible o el sacrificio de individuos de especies invasoras o con superpoblación), la opinión ecológica propone favorecer la protección, conservación y/o restauración de los

ecosistemas antes que salvar la vida individual de todos los animales, admitiendo la eliminación de miembros de especies no amenazadas de extinción. Sus partidarios, defienden una visión particular de lo que constituye un ecosistema sano, natural, auténtico o sostenible y están dispuestos a sacrificar vidas animales individuales para lograr esta visión holística (Baxter & Hargroven, 1992; ver el capítulo 19).

El enfoque basado en los derechos de los animales sostiene que los animales no existen para servir intereses humanos o la vitalidad del ecosistema, sino que tienen su propio significado moral y existencia subyacente que debe ser respetada y por tanto son portadores de ciertos derechos morales (Reagan, 1983; Donaldson & Kymlicka, 2011). En versiones extremas de este punto de vista, los animales y los seres humanos serían iguales en cuanto a sus derechos básicos a la vida y a la libertad (Francione, 2000). Como argumentan muchos de sus defensores, este enfoque basado en derechos es una extensión natural de la concepción de la igualdad moral que sustenta la doctrina de los derechos humanos. Al igual que los seres humanos, los restantes animales deben ser vistos como sujetos de derecho. Y entre sus derechos inviolables estarían los de no ser torturados, encarcelados, sometidos a experimentación, separados de sus familias o sacrificados (incluso si son predadores de especies en extinción, alterando hábitats locales, o cuando se lo haga para beneficiar la salud y curiosidad humanas). No se trataría, entonces, de la relación entre experimentadores y modelos biológicos, administradores y recursos, o creadores y herramientas, sino entre seres vivos portadores de derechos que deben siempre respetarse (Reagan, 1983; Francione & Gardner, 2010; Donaldson & Kymlicka, 2011).

Muchos de aquellos que se identifican con esta posición son abolicionistas, esto es consideran que los fines no justifican los medios y que infligir dolor o muerte a animales no humanos, en base a los beneficios futuros para los humanos y otros animales, no es admisible (Reagan, 1983; Francione & Gardner, 2010).

¿Es posible conciliar estas distintas posiciones?

Debemos admitir que existe una dificultad real para fundamentar (o justificar) las prácticas científicas actuales que involucran la experimentación con animales, inclusive aquellas moderadas y restrictivas, sin caer en el "especismo" definido anteriormente. La mayoría de los científicos que hoy están activos probablemente no considere ya a los humanos como reyes de la creación y omnipotentes usuarios de la naturaleza, pero tampoco acepta las extremadas exigencias y limitaciones que el enfoque de derechos animales impondría a sus experimentos.

Un intento de compatibilizar estas posiciones encontradas consiste en definir taxativamente derechos animales posibilitando así la formulación de códigos de conducta respecto de su uso experimental (Zula *et al.*, 1994).

Las tres erres en experimentación animal: remplazo, reducción y refinamiento

La proliferación de visiones críticas sobre el uso de animales en experimentación ya mencionadas, junto con el aumento de la demanda de modelos animales con altos estándares de calidad, llevaron, en la década de los años 50 del siglo XX, al desarrollo de la Ciencia de Animales de Laboratorio. Esta disciplina tiene como objetivo mejorar la calidad de los modelos experimentales y el bienestar de los animales de laboratorio, desde una aproximación multidisciplinaria, integrando la biología de los animales de experimentación y sus requerimientos ambientales, su estandarización genética y microbiológica, la prevención y tratamiento de enfermedades, el mejoramiento de las técnicas experimentales, anestesia, analgesia y eutanasia, la búsqueda de alternativas a la experimentación animal y la discusión ética (Baumans, 2004).

La Ciencia de Animales de Laboratorio tiene sus principios guía en lo que actualmente conocemos como las tres erres: remplazo, reducción, refinamiento, inicialmente definidas por los investigadores británicos William Russell, zoólogo y psicólogo, y Rex Burch, microbiólogo, en el informe "The Principles of Humane Experimental Technique", publicado en 1959 (Russell & Burch, 1959). Desde ese momento, estas definiciones fueron cobrando importancia y hoy en día son conceptos ampliamente usados por los científicos responsables y se encuentran presentes en prácticamente todas las discusiones que involucran el bienestar de los animales de experimentación. La vigencia de estos postulados, así como las actualizaciones que se han ido incorporando en las últimas décadas, han hecho que estos principios se incluyeran en las reglamentaciones legales a nivel internacional y también en nuestro país (como se analiza en el capítulo 2).

El principio de *remplazo* plantea que siempre que sea posible el uso de animales debe sustituirse por otros métodos. Una de las propuestas de Russell y Burch fue sustituir la experimentación con vertebrados por el uso de seres "menos sintientes" como los invertebrados. Por ejemplo, actualmente una gran cantidad de investigación fundamental se realiza utilizando *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Aplysia* sp. y bacterias como modelos experimentales.

El uso de los invertebrados, empero, tampoco se ha visto libre de cuestionamientos y en algunos casos de especies con un desarrollo del sistema nervioso y capacidades cognitivas importantes, como los cefalópodos y algunos decápodos, han sido incluidos en reglamentaciones de varios países.

Actualmente se han desarrollado y validado una gran cantidad de métodos alternativos que sustituyen incluso el uso de animales invertebrados. Desde

las alternativas iniciales *in vitro* propuestas por Russell y Burch ha surgido una vasta cantidad de técnicas y modelos disponibles que utilizan células, tejidos y órganos, aislados o en cultivos, o incluso material sintético, así como modelos computacionales. A nivel internacional, existen instituciones que promueven la investigación de métodos que lleven a la aplicación de las tres erres con especial énfasis en el reemplazo (<https://www.nc3rs.org.uk/>; <https://norecopa.no>).

La *reducción* implica que el número de animales utilizado en una investigación debe reducirse al mínimo posible sin comprometer la viabilidad de los experimentos ni la validez de los resultados. Si bien es importante reducir el número de animales, lo que en parte fue posible gracias al desarrollo de la estadística de las pequeñas muestras (Fisher), se debe reconocer que los efectos biológicos pueden perderse con un número de animales demasiado pequeño. También es posible reducir el número de animales si se aumenta la cantidad de información que se obtiene en cada experimento mediante un control cuidadoso de la variabilidad, un cuidadoso diseño experimental y un análisis estadístico apropiado (ver el capítulo 20).

Russell y Burch aclaran que, si bien la reducción del número de animales es importante, esto no debe ocurrir en desmedro de las otras erres. Por ejemplo, no es aceptable reducir el número de animales a costa de disminuir el bienestar de los que se empleen. Por lo tanto, al aplicar el principio de reducción en un determinado experimento, existe una tensión entre usar el menor número de animales posible, minimizar su sufrimiento y garantizar que la calidad de la evidencia que se pueda obtener de ese experimento sea lo suficientemente alta, respetando al mismo tiempo los otros objetivos de las tres erres (Richard *et al.*, 2014).

El *refinamiento* refiere al deber de los investigadores de utilizar los métodos y técnicas más apropiados para llevar a cabo sus investigaciones de forma de minimizar la afectación del bienestar de los animales experimentales. Las técnicas de refinamiento incluyen desde el tipo de colecta, el alojamiento y manejo de forma de reducir el estrés, el entrenamiento de los animales para colaborar en la recolección de datos fisiológicos hasta el perfeccionamiento de las técnicas de cirugía y el uso de anestésicos y analgésicos adecuados para disminuir el dolor y el estrés durante los protocolos experimentales.

Además de su valor ético intrínseco, aplicar el principio de refinamiento puede dar como resultado que un experimento sea más eficaz a la hora de testar hipótesis, en la medida en que se pueda reducir la variabilidad y/o el sesgo. Esta disminución de la variabilidad contribuye también a la reducción del número de animales.

Recientemente se ha propuesto considerar a las tres erres como un “algoritmo ético” útil para aplicar en una variedad de escenarios, más allá de los experimentos de laboratorio, como, por ejemplo, la investigación de campo o el uso de

animales en la docencia de ciencias biológicas, veterinarias y médicas (Richards *et al.*, 2014).

Conclusiones

La relación del hombre con los animales no está libre de conflictos ni de dilemas éticos. La experimentación animal, por ahora indispensable tanto para la obtención de conocimientos como para el tratamiento y prevención de enfermedades, es una parte muy minoritaria del uso instrumental de animales, en comparación con la industria alimentaria, por ejemplo. La comunidad científica, particularmente la vinculada a las biociencias, tiene por delante un desafío nuevo, el de replantearse el vínculo con los animales, asumiendo que la conciencia ética actual nos obliga a una justificación mucho más rigurosa para su utilización en experimentos.

Como vimos a lo largo del capítulo, nuestros dilemas respecto de la experimentación animal con fines científicos no tienen una única respuesta satisfactoria. Hay buenos argumentos para todos aquellos que sostienen posiciones enfrentadas, sean estas favorables u opuestas a la experimentación animal.

La discusión de estos temas, los esfuerzos por reglamentar prácticas y reducir a un mínimo el número de animales utilizados y de concebir métodos alternativos, son aportes positivos para la profundización de nuestra conciencia moral y tienen un efecto práctico sobre el bienestar de los animales e incluso sobre la propia investigación científica.

La superación del trato cruel y el respeto por toda vida, aquellos postulados ya milenarios, pueden quizá concretarse, en formas compatibles con la curiosidad humana y con la urgencia por atender las demandas de las sociedades, a través de las reglamentaciones y códigos de conducta que se discuten actualmente. Una amplia participación social en la discusión del tema, involucrando a las comunidades científicas y el conjunto de la sociedad, posiblemente permita hallar soluciones consensuadas para la formulación y revisión de reglamentaciones y controles de su aplicación.

Referencias

- Bacon F. 1854. *The Great Instauration. The Aphorisms. The Works*, Basil Montague (ed. and trans.). Parry & MacMillan, Philadelphia.
- Baumans V. 2004. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Therapy* 1: 64-66.
- Baxter B, Hargroven E. 1992. *Echological justice: The animal rights/environmental ethics debate*.

- Bentham J. 1789. *The principles of moral and legislation*. Hafner Press, New York, 1948.
- Bernard C. 1865. *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Flammarion, Paris, 1952.
- Bilimoria P. 1872. *La ética india*. En P. Singer (ed.) *Compendio de Ética - Alianza Editorial*.
- Darwin C. 1872. *The expression of the emotions in man and animals*. London: John Murray, Albemarle Street.
- Davidson D. 1984. *Inquires into truth and interpretation*, Oxford University Press, Oxford.
- De Waal F. 2014. *The Bonobo and the Atheist: In Search of Humanism Among the Primates*. Norton & Company.
- Donaldson S, Kymlicka W. 2011. *Zoopolis. A Political Theory of Animal Rights* Oxford University Press, Oxford/Nueva York.
- Fox M. 1986. *The case for animal experimentation - University of California Press, Berkeley*,
- Francione G. 2000. *Introduction to Animal Rights: Your Child or the Dog*, Temple University Press, Philadelphia.
- Francione G, Garner R. 2010. *The Animal Rights Debate: Abolition or Regulation Series: Critical Perspectives on Animals: Theory, Culture, Science, and Law*. Columbia University Press.
- Frey R. 1988. Moral standing, the value of lives, and speciesism, *Between the Species*, 4, 3: 191-201.
- Gruen L. 1995. *Los animales*. En P. Singer (ed.) *Compendio de Ética - Alianza Editorial*. Madrid, 469-481.
- Laurie G A. 1995. *La ética de la antigüedad*. En P. Singer (ed.) *Compendio de Ética - Alianza Editorial*, Madrid, 63-77.
- Midgley M. 1983. *Animals and Why They Matter: A Journey Around the Species Barrier - Penguin Publishers, London*.
- Panksepp J. 1998. *Affective Neuroscience: The Foundations of Human and Animal Emotions*. New York: Oxford University Press.
- Reagan T. 1983. *The Case for Animal Rights - University of California Press, Berkeley*.
- Reagan T, Singer P. 1989. *Animal rights and human obligations - Prentice-Hall, New Jersey*.
- Regan T. 2003. *Animal rights, human wrongs: an introduction to moral philosophy*. USA: Roman & Littlefield Publishers, Inc.
- Richard M A P, Browne W J. 2014. The Place of Experimental Design and Statistics in the 3Rs, *ILAR Journal* 55: 477-485.
- Rousseau J J. 1982. *Discurso sobre el origen de la desigualdad entre los hombres (1754) - Alianza Editorial, Madrid*.
- Russell WMS, Burch RL. 1959. *The principles of humane experimental technique*. Special Edition, Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, England.

Ryder RD. 1983. *Victims of Science*. Open Gate Press Publisher.

Singer P. 1990. *Animal Liberation: A New Ethic for Our Treatment of Animals*, 2ª edición, Random House, Nueva York, 1990. 1ª edición: *Animal Liberation: A New Ethics for our Treatment of Animals*, New York Review/Random House, Nueva York, 1975.

Zula J, Rudacille D, Goldberg A. 1994. *Animals and alternatives in testing history, science, and ethics*. May Ann Liebert, inc. (ed).

Lecturas sugeridas

Donaldson & Kymlicka, 2011. *Zoopolis: A Political Theory of Animal Rights*. Este libro escrito por dos filósofos canadienses se ocupa de la relación entre humanos y animales proponiendo mejorar la teoría de los derechos de estos últimos a través de conceptos tales como ciudadanía, residencia, soberanía, etc. En resumen, proponen crear una Zoópolis conformada por animales humanos y no humanos, reconociéndoles a ambos derechos universales y relacionales.

Francione & Gardner, 2010. *The animal rights debate: abolition or regulation*. En este libro se presenta la polémica entre G. Francione, un abolicinista radical, con Gardner, un partidario de los derechos animales más moderado, que propone la regulación ("new welfarism").

Hargrove, E. C. (ed.) *The Animal Rights/Environmental Ethics Debate* (Albany, NY: State University of New York Press). Sobre el debate entre una Ética animal y una Ética ambiental.

Reagan, T., 1983. *The case for animal rights*: Propone que toda vida debería ser respetada y no usada como medio o instrumento para otro fin.

Sunstein, Cass & Nussbaum, Martha (eds.) (2004) *Animal Rights: Current Debates and New Directions* (Oxford: Oxford University Press). Presenta diferentes perspectivas legales y políticas en las campañas a favor de los derechos de los animales y sus opositores.

Sollund, R. (ed.) (2008) *Global Harms: Ecological Crime and Speciesism* (New York: Nova). En este libro se presenta el debate entre los ecologistas y los partidarios de los derechos de los animales con los ecologistas.

CAPÍTULO 2

Principios rectores asociados a la experimentación con animales vertebrados. La realidad en Uruguay y sus regulaciones

Martín Breijo¹ - Laura Domínguez²

En un momento de la evolución, el hombre empezó a generar preguntas prácticas y/o existenciales que en algunos casos trató de contestar a través del uso de animales. En este sentido, los primeros “científicos” como Aristóteles, Hipócrates, Galeno, entre otros, estudiaron las semejanzas y diferencias entre los órganos de los animales y los del hombre, intentando interpretar fenómenos biológicos o del funcionamiento de órganos. Uno de los primeros textos disponibles fue escrito por Aristóteles en el año 350 a. C. cuyo título en latín es *De Partibus Animalium* (sobre las partes de animales), el cual aborda temas de anatomía y fisiología y provee información sobre órganos, tejidos y fluidos presentes en los animales. Fue así que las primeras respuestas, dieron lugar a nuevas preguntas, iniciando de esa manera un camino de amplificación de preguntas y respuestas donde la utilización de animales con fines de investigación también se fue incrementando. Gracias a ese camino se han generado conocimientos que han permitido mejoras sustanciales en la calidad de vida del hombre, a través de avances en áreas vinculadas a la salud, a la producción de alimentos, etc., entre otras.

Junto con el avance del conocimiento y los cambios culturales que ellos conllevan, la percepción de la comunidad sobre la utilización del uso de animales en experimentación también fue cambiando. Es un hecho que determinados procedimientos experimentales realizados en el pasado con animales hoy no son aceptados como válidos, tanto desde el punto de vista científico como ético.

Como la mayoría de los procesos de cambio, este camino ha estado contaminado de procesos dolorosos, conflictos y luchas de poder entre defensores y detractores del uso de animales en actividades de investigación. Con una varie-

-
- 1 Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, Udelar. Uruguay. mbreijo@fmed.edu.uy
 - 2 Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Farmacología, Laboratorio de Experimentación Animal-Facultad de Química, Udelar. Uruguay. Idoming@fq.edu.uy

dad de argumentos, mayormente válidos, que van desde la defensa de la importancia de la generación de conocimiento hasta el reconocimiento del derecho de los animales a no participar de experiencias dolorosas, los distintos integrantes de la comunidad debatieron y seguirán debatiendo sobre cuál es el camino correcto a seguir.

En el año 1959, W. Russell y R. Burch proponen en su libro *The principles of Humane Technique*, principios rectores de la investigación con animales, reconociendo que no es por sí misma deseable, pero es necesaria para el avance del conocimiento. Este libro de alguna manera se convirtió en un mojón en la experimentación con animales, ya que reconoce la existencia de un problema ético vinculado al uso de animales y propone un camino rector de los procedimientos experimentales. En éste, se sugiere que en todo procedimiento experimental se debe aplicar el concepto de las tres erres (reemplazo, reducción y refinamiento). El *reemplazo* refiere a que siempre que sea posible debemos evitar experimentar con animales utilizando métodos alternativos de investigación (simulaciones y/o modelos matemáticos, etc.). La *reducción* sugiere que siempre debemos utilizar el menor número de animales posible (para ello, se debe de tener un diseño estadístico apropiado para el experimento a realizar) y el *refinamiento* refiere al compromiso de utilizar en un trabajo experimental los procedimientos e instrumentos más adecuados para evitar generar en los animales sufrimientos innecesarios (siempre debemos preguntarnos si el procedimiento o los instrumentos seleccionados son los que hubiéramos utilizado, si nosotros fuéramos los afectados por el experimento).

La defensa de las tres erres en investigación ha sido desde entonces la base de la redacción de las legislaciones modernas a nivel mundial que regulan el uso de animales con fines de docencia e investigación.

Reglamentaciones sobre experimentación animal en Uruguay

Uruguay no ha sido ajeno a las implicancias académicas y éticas que conlleva el uso de animales en procesos experimentales y su comunidad ha discutido los caminos a seguir. Las primeras señales procedieron de la Universidad de la República y la Sociedad de Medicina Veterinaria que, en el año 1998, elevaron un anteproyecto de ley al parlamento sobre regulaciones en el uso de animales con fines experimentales. Dos años más tarde (año 2000), la Universidad de la República aprobó la "Ordenanza Universitaria sobre uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria" (Res. N°11 de CDC de 21/12/1999 - Distr. N° 295/99-DO. 21/2/2000), la que establece la creación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), responsable de articular y fomentar acciones destinadas a dar cumplimiento a dicha ordenanza en la comunidad científica universitaria.

La CHEA, integrada por delegados de las Facultades involucradas en actividades de investigación con animales, tiene como cometido principal hacer cumplir a todo el personal que trabaja con animales de experimentación los imperativos éticos de conducta que propone la comunidad internacional. La ordenanza propone el cumplimiento de estos lineamientos a través de dos mecanismos: a) la formación y actualización continua de todo el personal que trabaja con animales de experimentación a través de cursos de capacitación, donde se estimulará el interés humanitario por dichos animales; y b) la vigilancia y aplicación de acciones disciplinarias por parte de la autoridad universitaria frente a incumplimientos de las disposiciones y reglamentaciones vigentes.

Con el objetivo del cumplimiento de la ordenanza, en la UdelaR se inicia un camino de capacitación y construcción de estructuras, tomando como modelo los lineamientos establecidos por la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia de Animales de Laboratorio (FELASA), la que define tareas y responsabilidades en la cadena de producción de animales y experimentación, y tiene un sistema de acreditación del personal para autorizar la realización de dichas tareas. A su vez, define la necesidad de formación de comités de ética en las instituciones donde se realiza experimentación animal para que oficien de organismo evaluador y asesor de los protocolos experimentales.

En ese marco, la UdelaR, a través de la CHEA, inició el proceso de formación y acreditación del personal involucrado en la experimentación con animales a través de cursos y seminarios o validando la formación obtenida por docentes de la UdelaR en el exterior. Asimismo, promovió la creación de las comisiones de ética en el uso de animales (CEUAS) en cada servicio universitario donde se desarrollen actividades experimentales. Basados en los antecedentes generados por la CHEA-UdelaR y en las presiones generadas por la comunidad en pos de la mejora de los derechos de los animales a nivel nacional, en el año 2009 se aprobaron dos leyes sobre esta temática, la ley N° 18741, sobre tenencia responsable de animales, y la ley N° 18611, sobre utilización de animales en actividades de Experimentación, Docencia e Investigación Científica. La Ley 18611, crea la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA), integrada por una amplia representación con delegados de distintas instituciones nacionales (de los ámbitos público y privado, tales como Institutos de Investigación, UdelaR, empresas del sector de especialidades veterinarias farmacéuticas, así como de instituciones reguladoras ministeriales, entre otros) involucradas en la experimentación animal, así como delegados de organizaciones sociales (con personalidad jurídica) que trabajan en la protección de los derechos de los animales. Por otra parte, se establece la obligatoriedad de que las instituciones que hacen experimentación animal estén registradas en la CNEA, y para ello es requisito tener su CEUA, integrado al menos por un veterinario, un investigador y un representante de la sociedad civil, los cuales serán responsables frente a la ley de las actividades experimentales que se realizan en sus respectivas instituciones. Esta ley aseguró

la obligatoriedad, a nivel nacional, de respetar los lineamientos generales del uso de animales establecidos en las disposiciones redactadas por la Comisión Nacional de Experimentación Animal.

En este nuevo contexto, todas las instituciones nacionales (incluida la UdelaR) que deseen utilizar animales en procesos experimentales deben cumplir las mismas reglamentaciones e instrumentar un sistema de registro que sea auditable por inspectores designados por la CNEA. Este sistema de registro puede tener un formato diferente según la institución o la actividad realizada, pero debe documentar los experimentos realizados, el número de animales utilizado, así como el personal involucrado. Todo el personal debe estar acreditado frente a la CNEA para realizar tareas experimentales y esa acreditación debe ser renovada cada 5 años.

Documentación vinculada a la experimentación animal en Uruguay

Con la aprobación de la Ordenanza Universitaria y la creación de la CHEA se iniciaron los sistemas de formación de personal y registro de acreditados en nuestro país (solo para la UdelaR). Con pequeñas modificaciones las acreditaciones personales siguieron el modelo exigido por la FELASA para sus integrantes. La acreditación personal en Uruguay puede ser en las siguientes categorías: A, B, C1 y C2. La categoría A refiere a las personas encargadas del mantenimiento diario de los animales (alimentación, limpieza, higiene de salas, toma de muestras de animales o de ambiente). La categoría B refiere al personal vinculado a la realización de los experimentos (técnico experimentador), que debe tener conocimientos en bienestar animal, en evaluación de signos de estrés, en salud ocupacional y poder realizar maniobras con los animales, incluido el manejo de anestesia y analgesia. Finalmente, la categoría C está vinculada a personas responsables de dirigir los experimentos con animales. Para acceder a esta acreditación se requiere que la persona previamente haya obtenido la acreditación B, haya realizado un posgrado o especialización luego de obtener su título de grado y que cuente con una trayectoria de trabajo (proyectos, formación de recursos humanos y artículos publicados). Este nivel de acreditación se divide en 2 variantes: acreditación C1, vinculada a especialistas en ciencia de animales de laboratorio (equivalente a categoría D de FELASA) y C2 asociada a investigadores consolidados que utilizan la experimentación animal en sus líneas de investigación. Todas las acreditaciones tienen una vigencia de 5 años a partir de su expedición, debiendo gestionar su renovación, así como su cambio de categoría en caso de considerarlo acorde a la trayectoria y la formación del acreditado.

Con la aprobación de la ley 18611, el camino recorrido por la UdelaR se expande a nivel nacional, siendo obligatorio el registro y la acreditación del personal vinculado a la experimentación animal. La CNEA inicia así un proceso de acreditación de personas físicas (Sistema Nacional de Acreditaciones Personales,

SisNAP) e instituciones (Registro Nacional de Instituciones) vinculadas a la experimentación animal en Uruguay, siguiendo los mismos criterios adoptados por la Universidad. En esta oportunidad las acreditaciones personales previamente emitidas por la CHEA-UdelaR fueron avaladas por la CNEA. Entre los años 2010 y 2014 (primera gestión de la CNEA), esta comisión de alcance nacional registró un total de 287 personas físicas de diferentes instituciones, las cuales fueron acreditadas en una de las cuatro categorías anteriormente descritas y un total de 27 instituciones fueron habilitadas para realizar trabajos que involucran el uso de animales de experimentación (fuente: Informe CNEA 2010-2014).

Una vez que las personas físicas gestionan y obtienen su acreditación, están habilitadas para participar en los procesos experimentales con animales. Sin embargo, su actividad debe estar enmarcada obligatoriamente dentro de un protocolo experimental. Un protocolo experimental es un documento donde se describen las razones que justifican la experimentación con animales, los procedimientos involucrados y el personal acreditado que llevará a cabo el trabajo. Este protocolo debe ser presentado ante el CEUA de la institución correspondiente, a los efectos de que lo estudie y defina su aceptación, recomendaciones o rechazo.

Por ley, todas las instituciones registradas ante la CNEA deben contar con una comisión de ética que evalúe los procedimientos realizados por su institución. Dicha comisión evalúa en primera instancia la pertinencia del protocolo, basado en las justificaciones técnico-científicas, la información en literatura actualizada disponible, y la financiación disponible para la ejecución del protocolo. A su vez se analiza si los procedimientos involucrados respetan los principios de las tres erres, utilizando los modelos y procedimientos adecuados, con el menor número de animales posible y con personal acreditado. Una vez que el CEUA de esa institución aprueba el protocolo experimental, el grupo de investigación implicado en el protocolo, queda autorizado para iniciar los trabajos correspondientes. Los protocolos experimentales tienen una vigencia máxima de 5 años, necesitando un nuevo aval del CEUA (renovación) si el grupo necesita continuar con su proceso experimental más allá de este período. Por otra parte, si el grupo culminó con los experimentos utilizando todos los animales autorizados por el CEUA, el protocolo se da por finalizado. En cambio, si el grupo de investigación requiere más animales para cumplir los objetivos planteados en un protocolo vigente, tiene la posibilidad de solicitar una ampliación de los animales solicitados, a través de una nota dirigida a su CEUA que lo justifique.

Es importante resaltar que la UdelaR mantiene desde el año 2005 una base de datos de la actividad experimental con animales de cada uno de sus servicios y del personal acreditado. Desde el año 2013 la CHEA (UdelaR) desarrolla una plataforma digital con el fin de mantener un registro centralizado de todos los procedimientos experimentales con animales y el personal involucrado. Por

tal razón los protocolos experimentales deben realizarse en un formato *on-line*, el cual, una vez finalizado, se envía electrónicamente al CEUA correspondiente para su aprobación. Esta información se almacena en un servidor que físicamente se encuentra en la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la UdelAR, y se analiza anualmente con el fin obtener insumos para la definición de las políticas universitarias a seguir en el tema de animales de experimentación.

Evolución, particularidades y desafíos vinculados al trabajo con animales de experimentación

Las especies de rata y ratón que hoy utilizamos como animales de laboratorio han estado históricamente muy cercanos al hombre y por esa razón se las han denominado especies comensales (del latín *cum mensa* que significa que comen de la misma mesa). Los inicios del comensalismo entre humanos y ratones datan de miles de años. Las primeras pinturas que describen ratones son del Neolítico (entre 7.500 y 5.700 a. C.) sugiriendo que durante este período estos animales eran considerados sagrados. Por otra parte, existen reportes de que, 3.000 años atrás, los ratones fueron utilizados como mascotas en Europa, China y Japón (Keeler, 1931, Morse, 1978). Esta estrecha relación entre el hombre y estos animales posiblemente fue una de las razones por las cuales los primeros científicos realizaron sus experimentos con ellos.

La rata y el ratón de laboratorio son relativamente fáciles de criar, no consumen grandes cantidades de alimento y no tienen requerimientos nutricionales específicos o costosos. Por otra parte, es posible mantenerlos en condiciones de cautiverio con ambientes controlados de luz y temperatura, no hibernan y tienen un ciclo corto intergeneracional. Además, las progenies son grandes y toleran la endogamia con facilidad, comparados con otras especies. Por todas estas razones la rata y el ratón han sido las especies de elección en la investigación biomédica. Dicha preferencia ha derivado en un profundo conocimiento de estas especies, especialmente sobre su comportamiento y sus condiciones de bienestar. Hoy en día existe mucha bibliografía con recomendaciones y sugerencias sobre su mantenimiento y/o manejo.

Los conocimientos desarrollados sobre rata y ratón de laboratorio, se contraponen con los conocimientos disponibles sobre otro conjunto de especies animales que son también utilizadas en investigación a las que denominamos animales no tradicionales de experimentación (ANTE). El término ANTE engloba algunas especies de vertebrados que históricamente han sido poco utilizadas en investigación biomédica y para quienes los criterios sobre manejo, alimentación, alojamiento, métodos paliativos del dolor, técnicas de eutanasia, etc., establecidos para los animales de experimentación tradicionales, no son completamente aplicables. En este grupo se incluyen mayoritariamente animales vertebrados

silvestres, los cuales deben ser manejados con una cautela adicional a la de cualquier animal de experimentación tradicional, ya que la intervención del hombre puede causar efectos en sus poblaciones y a su vez estos animales pueden ser portadores de patógenos potencialmente zoonóticos.

El trabajo experimental con ANTE presenta como principales desafíos, trabajar con especies con alta variabilidad genética y en ambientes no controlados. La variabilidad entre individuos lleva, entre otras cosas, a la necesidad de incrementar el número de observaciones para definir una variable, mientras que cambios en el ambiente pueden condicionar las respuestas observadas en nuestro objeto de estudio. Por tal razón, variables como el clima, la nutrición, el suelo, la presencia de otras especies, etc., deben estar incluidas en el modelo de estudio.

Una gran cantidad de los trabajos experimentales realizados en campo con ANTE buscan responder preguntas que aporten al entendimiento de la biología de las especies y, a partir de las respuestas, poder generar planes de conservación. En otros casos se trata de entender el funcionamiento de los ecosistemas y las interacciones entre diferentes niveles de organización jerárquica, o evaluar respuestas de los individuos, poblaciones o comunidades a los impactos que realiza el hombre en el ambiente. En estas investigaciones con ANTE no se estudian individuos o una sola población, sino que se realizan estudios a nivel de comunidades. En estos casos se trabaja con múltiples especies y múltiples variables ambientales, donde la variabilidad entre individuos de una misma especie tiende a perder importancia o, por el contrario, se trata de capturar el efecto de dicha variabilidad, para la generación de respuestas representativas. En muchos casos se trabaja con la estructura de tallas y/o grupos funcionales, donde pierde relevancia la identidad de la especie a la hora de buscar respuestas a las preguntas planteadas.

El trabajo con animales silvestres puede involucrar riesgos biológicos mayores para los operadores que el trabajo con animales tradicionales, ya que *a priori* se desconoce el estado sanitario de los ejemplares que se utilizan. Por tal razón los niveles de protección del personal abocados a estos proyectos deben adecuarse a los niveles de riesgos biológicos que deben ser evaluados previamente al inicio del proyecto. Es importante resaltar que muchas veces no existe experiencia internacional o referencias donde estudiar muchos de los aspectos relacionados al trabajo con determinados ANTE, por lo que la experiencia de trabajo previa en muchos casos es de importancia capital. Por este motivo es recomendable que antes de iniciar los experimentos se recurra a la experiencia de aquellos profesionales que se han enfrentado previamente al manejo de dichos animales y a los riesgos que esto involucra.

Los animales tradicionales de experimentación son manejados en instalaciones que llamamos bioterios o laboratorios de experimentación animal. Sin embargo, muchas de las actividades experimentales con ANTE, por ejemplo la

colecta de ejemplares, se desarrollan entera o parcialmente en predios tanto públicos como privados ajenos a la institución abocada a la investigación. Por tal razón, para realizar dichos experimentos es necesario solicitar autorización a las autoridades públicas y/o privadas que correspondan, según sean animales vertebrados acuáticos o terrestres, así como a los propietarios y/o responsables de esos lugares. En el caso de vertebrados terrestres la autorización de colecta y transporte se debe tramitar en la División Fauna de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (MVOTMA) y en el caso de vertebrados acuáticos ante la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Dichas autorizaciones son independientes de las solicitudes de aval de Protocolos de Experimentación que se realizan ante la CHEA, y son de entera responsabilidad de los interesados.

Por último, otro grupo de animales vertebrados que se utilizan para son los denominados animales de interés productivo. Este grupo incluye aquellos animales domésticos destinados a la producción principalmente de alimento (carne y leche). Las investigaciones con ellos se centran básicamente en aspectos productivos, reproductivos y/o de salud animal, en la medida en que repercuten positivamente en la eficiencia de los sistemas y cadenas productivas, y en la mejora de la salud de las comunidades que se alimentan y conviven con ellos. Desde el punto de vista experimental, los desafíos que representan el uso de este grupo de especies son similares a los expuestos previamente para los ANTE. Sin embargo, el investigador que trabaja con estos animales generalmente cuenta con un mayor número de variables controladas vinculadas a aspectos genéticos, sanitarios y/o nutricionales.

En suma, la actividad experimental con animales está en permanente evolución, y junto con cada avance en el conocimiento a través del uso de animales, se generará un nuevo dilema ético vinculado a si el resultado se obtuvo de forma "digna" o "indigna", "humana" o "inhumana". Esta discusión probablemente finalice cuando la generación de conocimiento ya no dependa del uso de animales. Mientras tanto, será importante mantener un diálogo continuo entre diferentes actores de la sociedad procurando construir una realidad mejor de la que hoy disponemos.



CAPÍTULO 3

Experimentación con animales no tradicionales: desde el muestreo de campo al laboratorio

Franco Teixeira de Mello¹

Cuando pensamos en experimentación animal, o directamente realizamos una búsqueda en la web, lo primero que surge es la imagen de un científico con túnica blanca y guantes manipulando un animal en un laboratorio, en general una rata blanca, o imágenes que muestran primates con diferentes accesorios en sus cabezas. Asociado a estas representaciones surgen cuestionamientos éticos en contra de la experimentación animal, así como argumentos a favor, como ha sido abordado en los capítulos anteriores. En general las imágenes muestran lo que consideramos animales tradicionales en contextos de experimentación tradicional. Sin embargo, difícilmente surge la idea de la experimentación animal fuera de un laboratorio con animales que no son tradicionales en investigación. ¿Qué es un animal no tradicional de investigación? Las principales características de los animales tradicionales están asociadas al desarrollo de líneas de cría mantenidas en bioterios donde se busca la mayor homogeneidad somática, genética y sanitaria, y en nuestro país se utilizan básicamente ratas y ratones de diferentes cepas. Por el contrario, los animales no tradicionales (ANTE) en general comprenden individuos de muy diversas especies y grupos taxonómicos, que usualmente son capturados en la naturaleza y pueden ser mantenidos en el campo o en laboratorio. Dependiendo del objetivo del trabajo, generalmente interesa incluir la mayor heterogeneidad somática y genética y, además, en el momento de colecta se conoce muy poco o nada sobre el estado sanitario del individuo. Por este motivo existe un gran interés en generar conocimientos básicos, tanto teóricos como prácticos sobre la captura, el manejo y el mantenimiento de ANTE, sobre los cuidados y métodos de sacrificio apropiados, así como de seguridad en el trabajo con estos animales. Es necesario considerar que cualquier tipo de manipulación, colecta o transporte de animales vertebrados silvestres se considera experimentación con ANTE, ampliando de esta manera la visión clásica que re-

1 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, Udelar. Uruguay. frantei@cure.edu.uy, frantei@fcien.edu.uy

duce a la experimentación a aquellas manipulaciones que se realizan dentro de un laboratorio. En nuestro país se trabaja con todos los grupos de vertebrados: peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, y toda investigación que implique una interacción que pueda afectar el comportamiento, generar estrés o directamente capturar y manipular especies de vertebrados debe ser protocolizada y contar con un responsable de dicho protocolo (ver categoría C2).

Los principales retos que se presentan a la hora de trabajar con ANTE están asociados a la falta de metodologías y procedimientos estandarizados desde la colecta hasta el manejo, e incluso la eutanasia, sobre todo si se considera el conocimiento a nivel de las diferentes especies. Aunque mucha de esta información se obtiene de protocolos generados en otros países para grupos taxonómicos similares, a nivel local existe un gran desarrollo en base a la propia experiencia de los investigadores. El desarrollo y adaptación de metodologías en ANTE incluye el aprendizaje sobre la colecta y manipulación de múltiples especies e individuos, el uso de anestésicos para varias especies a la vez (por ejemplo, si trabajamos a nivel comunitario en peces), el efecto de la temperatura ambiental en el uso de anestésicos, las variaciones temporales y espaciales de las poblaciones y cómo deberían considerarse en el diseño del muestreo y el manejo de los animales, así como la generación de métodos alternativos.

La mayor parte de la investigación que se realiza con ANTE se puede dividir en tres grandes grupos, dependiendo de los objetivos, donde la mayoría de las restricciones a la investigación surge de los requerimientos ambientales del grupo taxonómico con el que se propone trabajar.

Monitoreo en campo

El monitoreo en campo que no incluye el transporte de animales suele ser el más frecuente o el que emplea un mayor número de individuos ANTE, incluyendo todos los grupos de vertebrados. Los objetivos de estos estudios son muy diversos e involucran diferentes grados de manipulación de los animales, como se verá en los siguientes capítulos. La mayoría de estos estudios están focalizados en aportar información sobre la diversidad de especies, entender la relación de las especies con variables ambientales, su distribución espacio temporal, generar información sobre aspectos de la biología, como ser alimentación y reproducción de las diferentes especies. Además, una parte importante del monitoreo suele estar enfocado a analizar los efectos de las actividades humanas sobre las diferentes especies, así como el desarrollo de programas de biomonitoreo. Según el grupo con el que se trabaje y los objetivos el monitoreo de campo puede ir desde la simple observación a distancia (ej. aves) o la grabación de sonidos (ej. anfibios; Fig. 1), que generalmente no requieren un protocolo de experimentación. El monitoreo también puede implicar la captura de ejemplares para obtención de datos, que puede incluir toma de muestras (ej. sangre) y marcado para

recaptura, que se practica básicamente en todos los grupos de ANTE. Considerando otros objetivos, como el análisis de la dieta y estudios reproductivos por ejemplo en peces, es necesaria la captura y eutanasia de un número importante de individuos.

Es claro que el monitoreo en campo tiene muchas complejidades que dependen de los diferentes grupos taxonómicos, siendo de vital importancia un correcto diseño de muestreo con una clara determinación del número de sitios y réplicas necesarias para responder a las preguntas planteadas. En la mayoría de los casos las metodologías de muestreo no permiten discriminar las especies o el número de individuos que se capturan (ej. colecta de peces con redes). En cambio, el uso de redes en tierra para la captura de aves y murciélagos suele ser más controlable ya que es posible observar y controlar cada vez que un individuo es atrapado. Otras metodologías pueden no ser selectivas, incluso entre diferentes grupos de vertebrados, como es el caso de las trampas *pit-fall* que, como se verá en los próximos capítulos, son usadas tanto para anfibios, como para reptiles y micromamíferos.

En resumen, cuando trabajamos con una estrategia de monitoreo donde se trata de obtener una muestra representativa de las especies y sus abundancias relativas con el objetivo de entender sus relaciones con diferentes variables ambientales (espaciales y temporales), es cuando se tiene menos control del número de especies e individuos que se capturan, e incluso se pueden capturar grupos de vertebrados muy ajenos a nuestro objetivo. En general, estos abordajes no admiten el remplazo de la captura por otros modelos, por lo que el refinamiento y la reducción adquieren particular relevancia. Contar con un diseño de muestreo claro y que apunte a responder claramente las preguntas que nos planteamos es de suma importancia para reducir el número de capturas no deseadas. Por otra parte, estos muestreos pueden finalizar con la liberación de los individuos en el campo o con la eutanasia, por lo que resulta fundamental contar con los conocimientos necesarios para reducir el sufrimiento animal a la mínima expresión posible. En este sentido, algunos aspectos están aún sin resolver, como por ejemplo las posibles interacciones entre los anestésicos y su interferencia con reacciones bioquímicas o contaminantes que se pretendan medir en los individuos capturados.



Figura 1. Foto de *Boana pulchella* localizada por su canto en la noche. Salida de campo CHEA-ANTE 2014. (Foto: Franco Teixeira de Mello).

Captura y experimentación en campo

Si bien la captura, marcado y liberación puede ser considerada dentro de este bloque, algunas investigaciones realizan experimentos en campo con el objetivo de controlar determinadas variables en un contexto de realismo que se perdería en el laboratorio. La captura y posterior experimentación en campo incluye un bajo número de capturas y en general está dirigida a una o pocas especies. En este caso es evidente que las técnicas de muestreo deben ser apropiadas para una captura rápida, selectiva y de pocos individuos, o lo más inocua posible, como para permitir la liberación de los individuos que no sean de interés.

Por ejemplo, los experimentos en campo se pueden usar para evaluar tasas de consumo o crecimiento de una especie en un determinado ambiente (Fig. 2). Si el experimento dura varios días o meses, y su culminación no incluye la eutanasia de los animales, su liberación debe analizarse con mucha cautela, ya que al estar recluidos en un nuevo ambiente y manipulados podrían ser más vulnerables a adquirir enfermedades. Si se observan signos de enfermedad o mala condición, se recomienda no liberar a los animales, ya que podrían transmitir enfermedades y afectar a las poblaciones locales.



Figura 2. Experimentos en campo, izquierda: para evaluar el efecto de la depredación de peces sobre las comunidades de macroinvertebrados en arroyos, derecha: para evaluar efectos en cascadas tróficas en lagos. (Fotos: Franco Teixeira de Mello).

Captura, transporte y experimentación en laboratorio

En este caso se agrega un grado de complejidad que será fuertemente dependiente del grupo con el que estemos trabajando. Los peces, anfibios y reptiles son los grupos más transportados desde el campo al laboratorio y en cada caso es necesario conocer los requerimientos de transporte necesarios para evitar el estrés y/o muerte de ejemplares. Los principales cuidados están relacionados con las condiciones de temperatura, humedad y oxígeno. En muchos casos la dificultad se presenta una vez que hemos llegado al laboratorio, ya que se deberán replicar determinadas condiciones del ambiente, necesarias para mantener los individuos en condiciones saludables. En algunos casos se trabaja en lograr condiciones que permitan la reproducción en el laboratorio para estandarizar determinadas características de los individuos y para no depender cien por ciento de nuevas capturas. En Uruguay este desarrollo ha estado principalmente centrado en la cría de diferentes especies de peces (ej. *Austrolebias* spp., *Australoheros facetus*, *Cnesterodon decemmaculatus* y *Gymnotus omarorum*). En todos los casos el desarrollo de las condiciones de cría de una especie requiere de muchos intentos, siguiendo requerimientos de especies similares y experiencia de los investigadores. En el caso particular de la madrecita (*Cnesterodon decemmaculatus*), en los últimos años se ha avanzado en la generación de protocolos y estandarización para su cría en laboratorio. Estos avances provienen principalmente de Argentina, ya que esta especie se emplea como especie modelo para evaluar efectos de diferentes contaminantes a diferentes niveles de organización, desde daños genéticos hasta efectos en tejidos y órganos. Quizás dentro de unos años esta especie sea considerada un modelo tradicional donde existan diferentes cepas que sean seleccionadas con características para determinados estudios, como ha ocurrido con el “zebrafish” (*Danio rerio*).

CAPÍTULO 4

Colecta y manejo de peces en el ambiente: énfasis en peces de aguas continentales

Franco Teixeira de Mello¹

Diversidad de peces en Uruguay

Uruguay integra la región neotropical, una de las regiones biogeográficas de mayor biodiversidad del planeta. En el país hay registradas unas 670 especies de peces, de las cuales se estima que alrededor de 250 habitan en los sistemas de agua dulce. Actualmente en nuestro país se siguen describiendo nuevas especies de peces y se amplía la distribución de las que aún no se encontraban confirmadas para nuestro territorio (e. g. González-Bergonzoni *et al.*, 2009; Zarucki *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 2013). Esta diversidad está acompañada por una gran variedad de hábitos y ciclos de vida, desde especies principalmente piscívoras como el dorado (*Salminus brasiliensis*), las tarariras (*Hoplias* spp.), el surubí (*Pseudoplatystoma corruscans*) y las pirañas (*Pygocentrus nattereri*, *Serrasalmus* spp.) hasta especies que se encuentran en la base de las redes tróficas y que se alimentan principalmente de detritus (iléofagos) como el sábalo (*Prochilodus lineatus*) y los sabalitos (*Cyphorax* spp. y *Steindachnerina* spp.). Algunas especies son migradoras de grandes distancias, mientras que la mayoría de las especies se estima que son migradoras locales o que no realizan migraciones; actualmente muy pocos estudios están enfocados en esta área de investigación. Algunas especies son nadadoras de la columna de agua, otras viven asociadas a los sedimentos o a plantas y algunas especies viven enterradas en el sedimento (e. g. *Scleronema* spp., *Bunocephalus* spp.). A esta diversidad también se suma una gran variedad de estrategias reproductivas, incluyendo peces con fecundación interna (ovovíparos y vivíparos), si bien la mayor parte de especies presentan fecundación externa. A su vez, muchas especies de peces exhiben diferentes formas de cuidado parental, desde más simples a muy elaboradas, mientras que un número importante de especies no cuida de su descendencia. En referencia a este punto, excepto casos puntuales, en Uruguay no conocemos el ciclo ni la época repro-

1 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, UdelaR. Uruguay. frantei@cure.edu.uy, frantei@fcien.edu.uy

ductiva de los peces de agua dulce. Los peces anuales del género *Austrolebias*, son de las pocas especies muy estudiadas: se caracterizan por dejar sus huevos fecundados enterrados en el sedimento en ambientes temporales que se secan en el verano. Una vez que estos sistemas comienzan a tener agua en el otoño e invierno los huevos eclosionan. El gran interés en el ciclo reproductivo de estas especies radica en que son los únicos vertebrados que presentan diapausa en su desarrollo embrionario, una adaptación que les permite ocupar estos sistemas temporales.

La multiplicidad de especies y características biológicas de los peces les permite vivir en prácticamente todos los ambientes acuáticos de nuestro país; esto hace que sea uno de los grupos de vertebrados donde se realiza una mayor captura de individuos con fines de investigación, y es el grupo de vertebrados que representa la mayor dificultad para estimar el número de individuos con los cuales se trabajará. Esta dificultad está dada en gran medida por la variabilidad que pueden presentar las capturas, incluso en un mismo ambiente. Dicha variabilidad puede ser muy grande entre épocas del año e incluso entre horas del día (Gelós *et al.*, 2010; Teixeira de Mello *et al.*, 2010; Gonzalez-Bergonzoni *et al.*, 2016). Esto impone desafíos a la hora de seleccionar los métodos de muestreos acordes a los sistemas que se planea muestrear, a los objetivos planteados y a las especies que se quieren capturar. Por ejemplo, los sistemas pueden ser charcos temporales, lagos y lagunas, cañadas, arroyos y grandes ríos. A su vez, estos sistemas pueden diferir en otras variables ambientales, incluyendo sistemas de muy baja profundidad (ej. 20-30 cm) a ambientes muy profundos (ej. > 10 m), con diferentes velocidades de corriente, presencia o ausencia de vegetación, así como diferentes tipos de sustratos.

Metodologías de muestreo de peces

Las primeras evidencias de pesca se remontan al paleolítico, donde se desarrollaron las primeras artes para la pesca de sobrevivencia. Se considera pesca al arte de capturar diferentes especies acuáticas y artes de pesca al conjunto de técnicas y herramientas utilizadas en la captura de especies acuáticas. Muchos de los métodos actuales de pesca como el uso de anzuelos, nasas y redes se han mantenido con pocas modificaciones durante miles de años.

Las artes de pesca se pueden dividir en dos grandes grupos, con importantes implicancias en el tipo de información que se obtiene y, por ende, la interpretación que se debe realizar de los resultados. Las artes de pesca pasivas, son las que dependen de la actividad de los peces (Hamley, 1975; Rudstam *et al.*, 1984) y, por ende, de factores intrínsecos (e. g. ciclos circadianos; Reeb, 2002) y variables extrínsecas (e. g. luz y temperatura; Stoner, 2004; Linlokken & Haugen, 2006; Gelós *et al.*, 2010). Mientras que las artes de pesca activas, son las que dependen

de la actividad que nosotros realizamos con ellas y no necesariamente de la actividad de los peces.

A continuación, se describen las principales artes de pesca y su uso actual en investigación.

Artes de pesca activas

Calderín de mano

El calderín se utiliza en ambientes de poca profundidad, generalmente dominados por vegetación acuática, y permite principalmente la pesca de pequeños peces. En Uruguay es muy utilizado para la colecta de peces anuales, como es el caso de *Austrolebias* en charcos temporales, y para la colecta en las zonas litorales vegetadas en sistemas de mayor tamaño por ejemplo para la captura de Gymnotiformes (Fig. 1). Sin embargo, en ambientes profundos o sin vegetación este arte de pesca pierde efectividad y no es utilizado.



Figura 1. Izquierda: colecta de *Austrolebias* spp. en charcos temporales con diferentes tipos de calderines. Foto: Marcelo Loureiro. Derecha: colecta de *Gymnotus omarorum* refugiados en *Echornia crassipes* con calderín. Foto: Franco Teixeira de Mello (salida de campo curso CHEA ANTE 2013).

La pesca con calderín permite la cuantificación de individuos asociada al esfuerzo de muestreo, por lo que en general los datos se expresan como captura por unidad de esfuerzo (CPUE), medido en tiempo o en número de veces que se pasa el calderín. En ambientes similares se puede realizar el mismo esfuerzo de muestreo, sin embargo en sistemas de diferente tamaño es común utilizar un esfuerzo relativo al tamaño del sistema.

En el momento de la colecta el muestreo no es selectivo a una especie determinada, sin embargo, como generalmente no provoca daños en los peces, es posible seleccionar los individuos o las especies deseadas. En el caso de la pesca

de Gymnotiformes se emplea una radio para la amplificación de las señales eléctricas que emiten estos peces, por lo que la captura es muy dirigida (ver capítulo 5). Si bien se pueden capturar otros peces asociados, su liberación es inmediata.

La pesca con calderín permite la colecta de peces evitando niveles de estrés elevados en los individuos y sin generar daños mayores, por lo que es un método adecuado para colectar individuos que pretendemos mantener vivos para tomar fotografías, realizar experimentos de campo o transportarlos al laboratorio (Fig. 2).



Figura 2. *Austrolebias wolterstorffi* capturada en charco temporal con calderín de mano, acondicionada para la toma de fotografías en campo.

Redes de arrastre

La red de arrastre es una red con una línea flotante (en la superficie) y una línea con plomos (en el fondo) y, como dice su nombre, se la opera arrastrando. Se trabaja con dos operadores, uno en cada extremo, y dependiendo del tamaño de la red y la profundidad se puede operar caminando o en embarcaciones. El arrastre se comienza desde aguas adentro hacia el litoral y los dos operadores se van aproximando entre sí a medida que avanzan hacia la orilla formando una U con la red (Fig. 3). De esta forma los peces quedan encerrados sin poder huir. Dependiendo del tamaño de la red y el tamaño de malla, puede servir para la captura de peces de muy diferentes tamaños. Las redes de arrastre pueden ser rectangulares simples con un solo tamaño de malla, o pueden ser redes con forma de embudo donde los extremos laterales (alas) en general tienen una apertura de malla mayor y donde el copo o bolsa central suele tener una apertura de malla menor y es donde los peces quedan atrapados.

Las zonas con muchas rocas y ramas suelen dificultar el arrastre, ya que la red se atasca. A su vez, para pescar en zonas litorales con plantas, se deben usar

redes pequeñas que permitan ser levantadas antes de llegar a tierra, evitando de esta forma dificultades asociadas a la carga de plantas al sacar la red.

La pesca con redes de arrastre permite la cuantificación de individuos asociada al área que se barre, aunque en los casos donde el ambiente no permite un arrastre completo es muy difícil realizar un cálculo preciso. Al igual que con las redes de mano, en el momento de la colecta el muestreo no es selectivo a una especie determinada, sin embargo, como generalmente no provoca daños en los peces, es posible seleccionar los individuos o las especies deseadas. La velocidad para sacar los peces de la red al retirarla del agua es un factor importante para reducir el riesgo de pérdida de peces pequeños, en particular si la red contiene muchas plantas, restos vegetales o algas filamentosas. En estas ocasiones es recomendable la presencia de más operarios para colectar los peces.



Figura 3. Pesca con red de arrastre en zona litoral. Fotos: Izquierda Guillermo Goyenola. Derecha: Iván González-Bergonzoni.

A otra escala, el sistema de red de arrastre es utilizado en los sistemas marinos, con redes operadas por dos barcos.

Redes atarraya de lance

La red atarraya es una red circular que es lanzada por un solo operario y pueden ser de diferentes diámetros y tamaños de malla. Aunque a medida que aumenta el diámetro aumenta la dificultad de lance, en todos los casos se necesita de un operario con gran experiencia, existiendo diferentes modalidades de lance. En el lance la red debe extenderse y caer sobre la superficie del agua formando un círculo mientras que es sostenida por una cuerda que sujeta la red desde el centro (Fig. 4). Una vez que la red llega al fondo se recoge la cuerda y se cierra la red. Estas redes capturan peces de muy diversas tallas y se pueden utilizar en sitios con profundidades variables, a mayor profundidad es recomendable un mayor diámetro de red. El muestreo con estas redes se utiliza en ambientes

de aguas abiertas y son efectivas incluso en ambientes con profundidades que no permiten operar redes de arrastres. A su vez se pueden lanzar tanto desde fuera como dentro del agua. Sin embargo, este arte de pesca no es efectivo en zonas con vegetación muy densa o con ramas donde se pueden enganchar. Para la cuantificación con este método se considera el área de la circunferencia, y solo deben considerarse los lances donde la red se logra abrir completamente.

En el momento de la colecta el muestreo no es selectivo a una especie determinada, sin embargo, esta colecta generalmente no provoca daños en los peces, y es posible seleccionar los individuos o las especies deseadas.



Figura 4. Lance de red atarraya, río Cuareim. Foto: Marcelo Loureiro

Pesca eléctrica

La pesca eléctrica surge como una alternativa a las artes de pesca activa descritas, desarrollada para la colecta de peces con fines científicos en las décadas de los 30 y 40 (Burr 1931; Haskell 1940).

Se denomina pesca eléctrica al arte que emplea corriente eléctrica para la captura de peces. Dicho método consiste en la generación de un campo eléctrico de suficiente amplitud como para atontar a los peces, efecto conocido como galvanonarcosis. Para ello se introduce en el agua un cátodo y un ánodo (calderín) y el operador cierra el circuito con un interruptor. Un pez que se encuentra entre estos electrodos forma parte de un circuito cerrado y parte de la corriente fluye a través de su cuerpo.

Por ser una metodología en la cual usamos electricidad y nos movemos en el agua, debemos tener ciertas precauciones que son fundamentales y que quienes estén operando conozcan en profundidad. Todos los operarios deben contar con botas de goma altas (*waders*), conocer cuál es la forma rápida de desactivar el equipo en caso de accidentes y conocer la localización de los electrodos antes de comenzar el muestreo. En ningún caso se debe operar este equipamiento sin compañía en el campo, y se debe operar en zonas de baja profundidad, tanto

para optimizar la eficiencia del equipo, como para disminuir riesgos asociados a su uso. En sistemas de aguas turbias y con muchos obstáculos como ramas, troncos y grandes piedras es importante moverse lentamente, con cuidado, con el fin de evitar caídas, y mientras se camina es importante que el operador lleve liberado el interruptor.

El pulso eléctrico afecta el comportamiento de los peces y éstos pueden ser fácilmente capturados, en general muy pocos peces mueren y se pueden liberar los peces que no son de interés. La corriente eléctrica es generada por una fuente que puede ser baterías (12 V, una o varias) o generadores a combustible. En el mercado existen diferentes equipos de pesca eléctrica, incluyendo algunos que se transportan en la espalda tipo mochila (Fig. 5) y otros que permanecen en la orilla y se ingresa al agua solo con el sistema de cables (Fig. 6). Los primeros tienen mayor autonomía de movimiento y en el caso de los segundos el operador no tiene que cargar el equipo en su espalda que en algunos casos pueden superar los 15 kilogramos. Estos dos formatos de equipos son los que se utilizan en nuestro país. También existen embarcaciones de pesca eléctrica utilizadas para sistemas más profundos y cuando se requiere cubrir tramos más grandes, pero estos equipos hasta el momento no se han utilizado en Uruguay.



Figura 5. Pesca eléctrica de mochila. Arriba: equipo a baterías. Abajo: equipo a motor. Fotos: Marcelo Loureiro.

La efectividad de la pesca eléctrica es afectada por varios factores que incluyen principalmente el voltaje, tamaño y forma de los electrodos, la duración del pulso eléctrico, la conductividad del agua, del pez y del sedimento, la temperatura del agua, la distancia del pez al electrodo, el tamaño del pez, la sensibilidad de las diferentes especies, la profundidad y transparencia del agua, así como la experiencia del operador.

La conductividad del agua y la conductividad de los peces afectan la captura y están asociados al voltaje de los equipos. En sistemas de muy baja conductividad ($< 20 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) la pesca es menos efectiva, ya que la corriente eléctrica

encuentra mucha resistencia, mientras que en los sistemas donde el agua tiene mucha conductividad ($> 2.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) la electricidad difícilmente afecta al pez, sin embargo se puede adaptar el voltaje y el amperaje para mejorar la efectividad de los equipos. En el caso que la conductividad del agua y la del pez sean similares, el efecto del pulso eléctrico es mayor; esta conductividad es alrededor de los $115 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. En los casos en que la conductividad del agua sea muy baja, se debe incrementar el voltaje de salida o el tamaño de los electros para bajar la resistencia del agua. Si usamos voltajes altos (ej. 1.200 V) se generan tres problemas, la necesidad de equipos especiales, se reduce la seguridad de los operadores y el pulso eléctrico suele ser letal para los peces que se encuentran cerca de los polos. La resistencia del agua se puede superar incrementando el tamaño de los electrodos, para lo que es aconsejable contar con electrodos intercambiables. En los casos de conductividades altas ($> 2.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) si aplicamos un voltaje alto la corriente fluirá fácilmente por el agua y la resistencia generada por el pez (por una menor conductividad corporal) hará que la corriente no afecte al pez. En estos casos es recomendable disminuir el voltaje y aplicar mayor amperaje, pudiendo llegar a los 60 amperes, siendo el factor limitante la fuente de poder (recomendaciones de Smith Root, desarrolladores de equipos de pesca eléctrica).



Figura 6. Pesca eléctrica con generador. Foto: Franco Teixeira de Mello.

La temperatura influye indirectamente este arte de pesca al afectar la conductividad del agua. Se debe considerar que al aumentar la temperatura existe un incremento de la conductividad. A su vez, existen sedimentos que conducen la corriente y en esos casos el pulso pierde efectividad. En Uruguay, en general, no existe problema con la conductividad que limite el empleo de la pesca eléctrica. Sin embargo, en algunas zonas del río Uruguay, que se caracteriza por presen-

tar bajos valores de conductividad ($< 70 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), los sustratos arcillosos pueden reducir la eficiencia de los pulsos eléctricos (observación personal).

El tamaño de los electrodos, principalmente el del ánodo, así como la distancia a la cual se encuentra el pez, afectan fuertemente el shock eléctrico que recibe el pez. La distancia de los peces al electrodo es un factor importante, ya que el campo eléctrico es efectivo hasta una distancia de entre 5 a 10 radios del ánodo (calderín). Por lo tanto, cuanto más cerca esté el pez del ánodo, más fácil será capturarlo. De forma similar, cuanto más grande sea el ánodo, mayor área de pesca cubrirá (ej. 10 cm de diámetro cubre $6,16 \text{ m}^{-2}$, 20 cm cubre un área de $10,18 \text{ m}^{-2}$). Sin embargo, frente a dos ánodos de diferente tamaño el pez que recibirá una mayor descarga será el que se encuentre cerca del ánodo de menor diámetro, mientras que un pez que se encuentre más distante recibirá una mayor descarga del ánodo de mayor diámetro. Por lo tanto, los ánodos de pequeño tamaño provocan una descarga de mayor voltaje en el pez cuando este se encuentra cerca y la descarga pierde rápidamente el poder a medida que nos alejamos del ánodo. Por esta razón, podemos considerar que los ánodos de menor tamaño son mejores cuando se quiere identificar con mayor precisión el lugar donde se encontraba el pez (ej. estudios de microhábitat).

Otro factor importante es la sensibilidad de las especies al pulso eléctrico, debido a que hay especies que claramente son menos sensibles o más veloces (ej. *Synbranchus marmoratus* es una especie difícil de capturar). Otras especies simplemente pueden ser más difíciles de colectar porque viven debajo de las piedras (ej. especies de la familia Loricariidae). Frente a estos casos es recomendable presionar y liberar el interruptor varias veces mientras se está efectuando el pulso eléctrico, ya que esto permite que los peces continúen moviéndose entre cortes del campo eléctrico y puedan salir de sus refugios. El tamaño de los peces es otro factor que influye de forma importante la efectividad de la captura. Por ejemplo, dentro de una misma especie, los individuos más grandes son más sensibles a la corriente eléctrica, ya que la corriente absorbida es proporcional a la superficie corporal (es atravesado por más líneas del campo). Por ello, debemos tener precaución con los peces grandes ya que el *shock* que recibirán será mayor al que recibirán los pequeños. Por otra parte, si un pez grande se encuentra en el borde del campo, será muy difícil atraparlo, ya que con un movimiento rápido se alejará varios metros del campo eléctrico.

La eficacia de la pesca eléctrica también depende del tiempo que se efectúa el pulso eléctrico. Mientras se realiza el pulso los peces nadan hacia el ánodo por un efecto denominado galvanotaxia, sin embargo, una vez que se detiene el pulso, los peces se recuperan y se alejan rápidamente. Otro factor importante es la visibilidad, la captura de los peces es más efectiva cuando el operador logra visualizarlos, por lo que es más eficaz en arroyos de baja profundidad y en sistemas de aguas claras. Siempre es recomendable el uso de lentes polarizados para

una mejor visibilidad de los peces y de los obstáculos. A su vez, la pesca se debe realizar caminando aguas arriba para evitar la turbidez generada por la remoción del sedimento. Como esto no se puede evitar cuando se pesca en el litoral de los lagos, en estos ambientes suele ser más efectivo pescar desde arriba de un bote. El factor sorpresa también es importante por lo que es recomendable realizar pulsos separados y no mantener constantemente el interruptor presionado. Si caminamos realizando una descarga continua el borde del campo eléctrico puede ir alertando a los peces y éstos escapar con mayor facilidad. Cuando la velocidad del agua es muy fuerte también disminuye la efectividad de la captura debido a que los peces son difíciles de ver y son rápidamente arrastrados aguas abajo. En todos estos casos la experiencia del operador es de suma importancia por lo que se recomienda un entrenamiento previo para mejorar las capturas, así como para evitar accidentes.

Finalmente, existen diferentes tipos de corriente que pueden generar los equipos de pesca eléctrica. Cuando la pesca se realiza con equipos que generan corriente alterna, que cambia la dirección del flujo de la corriente varias veces por segundo, los peces se orientan transversales a las líneas del campo generando movimientos bruscos hacia el ánodo y el cátodo con la frecuencia que tenga el ciclo de corriente alterna utilizada. Estos movimientos bruscos a altos voltajes pueden provocar la muerte del pez, fractura de vertebras y dañar el cerebro, por lo que no es recomendable su uso. La pesca eléctrica con corriente alterna solo es recomendada para la captura de pequeños peces en aguas de muy baja conductividad. Por otra parte, en la pesca eléctrica con corriente continua, que fluye en una sola dirección desde el electrodo negativo (cátodo) al electrodo positivo (ánodo), los peces que son alcanzados por el campo eléctrico son atraídos hacia el calderín. A su vez, los peces no sufren contracciones como en el caso de la corriente alterna y, en general, no ocurre la muerte de los individuos. Se ha desarrollado a su vez un método de corriente continua de pulsos, que consiste en que mientras se da el pulso eléctrico controlado por el operador, ocurren varios encendidos y apagados por segundo (frecuencia del pulso). Cada encendido y apagado hace que el pez se flexione y recupere, generando de esta forma un efecto acentuado de natación involuntaria hacia el ánodo (galvanotaxia). Este tipo de corriente, según el equipo que desarrolló este método (Smith Root), tiene varias ventajas, como ser reducción del daño ocasionado a los peces, menor gasto energético de la fuente y permite trabajar en aguas con mayor conductividad. En Uruguay se operan equipos con estas características, y no se recomienda el uso de equipos de corriente alterna.

Metodologías de pesca eléctrica en arroyos: pensando en la reducción

Algunas de las técnicas más utilizadas de pesca eléctrica incluyen la pesca eléctrica puntual (P), la de pasada simple (S-P) y la de múltiples pasadas (M-P). Las tres varían en el esfuerzo de muestreo que se realiza y por lo tanto en el número de peces colectados, así como en el tiempo de procesamiento (Gardner, 1997; Janác y Jurajda, 2007; Sály *et al.*, 2009). La pesca eléctrica puntual implica el muestreo de numerosas unidades pequeñas mediante la aplicación de electricidad en un área específica (es decir, en un punto), durante un período de tiempo seleccionado y la repetición del procedimiento a cierta distancia en una nueva área (uno o dos metros entre puntos). Las técnicas S-P y M-P tienen como objetivo muestrear la mayor cantidad posible de peces aplicando una mayor cantidad de pulsos que cubran toda el área seleccionada (Bohlin *et al.*, 1989). Según lo indicado por el nombre del método, la S-P consta de un solo muestreo en toda el área, mientras que la pesca de múltiples pasadas conlleva la realización de varias pasadas simples, utilizando un criterio preestablecido de cuándo detenerse que, a menudo, implica duplicar o triplicar el esfuerzo de pesca (y la duración) en comparación con el método S-P (Bohlin *et al.* al. 1989) (Fig. 7). Los tres métodos permiten alguna desviación de los procedimientos básicos y pueden realizarse en segmentos de arroyos cerrados (bloqueando ambos extremos con redes) o en segmentos abiertos (sin redes de bloqueo) (Peterson *et al.*, 2005).

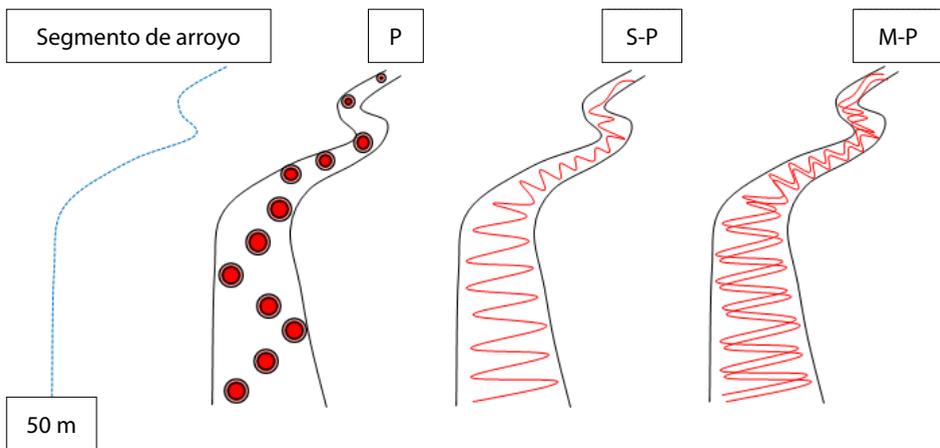


Figura 7. Métodos de pesca eléctrica. Figura: Franco Teixeira de Mello.

Los métodos de muestreo P y S-P producen datos de captura por unidad de esfuerzo (CPUE) y suelen ser rápidos y económicos; sin embargo M-P es el único método que permite la estimación del número de individuos por unidad de área y riqueza naturales. Este último método por lo general requiere más tiempo y

se captura un mayor número de individuos. Dados los elevados requerimientos de recursos financieros y humanos necesarios para muestrear peces en arroyos, la mejora de la eficiencia del muestreo sin comprometer la calidad de los datos es de importancia clave (Smith & Jones, 2005). Aunque es de esperar que las estimaciones más precisas sean proporcionadas por el método M-P, las consideraciones logísticas y éticas (considerando el número de peces capturados) pueden hacer que la aplicación de los otros métodos sea más apropiada. Para este propósito, es necesario aplicar ecuaciones de transferencia entre métodos con un esfuerzo de muestreo bajo y alto. Aunque todos los métodos anteriores se han utilizado ampliamente en publicaciones, se sabe poco acerca de su comparabilidad y el rendimiento específico con diferentes comunidades de peces. Por ejemplo, tanto el tamaño corporal de los peces como las diferencias de sensibilidad específicas entre especies, combinado con las características físicas de los arroyos, pueden causar un sesgo indeseable en los resultados obtenidos con uno u otro método debido a cambios en la eficiencia de captura (Rodgers *et al.*, 1992; Angermeier & Smogor, 1995; Baldwin & Aprahamian, 2012). Incluso en arroyos similares, los diversos atributos de las comunidades de peces, como la riqueza de especies, la densidad y distribución de tamaños, a menudo difieren entre las zonas biogeográficas y climáticas (ej. Teixeira de Mello *et al.*, 2012). La eficiencia de los métodos de muestreo y el esfuerzo de muestreo requerido para obtener resultados confiables también pueden diferir entre arroyos con comunidades de peces contrastantes. En esta línea de trabajo, considerando sistemas con comunidades de peces contrastantes, comparamos la precisión de los datos obtenidos por los métodos P y SP con los datos estimados por M-P dentro de cada sistema, realizando muestreos en varios arroyos representativos de dos regiones climáticas y biogeográficas diferentes, templada-paleártica en Dinamarca y subtropical-neotropical en Uruguay. Los resultados obtenidos a partir de la estimación por M-P se utilizaron como referencias, con el objetivo de construir relaciones para transformar de manera confiable los datos de riqueza, abundancia y estructura de tallas obtenidos con el muestreo P y S-P a valores estimados M-P. Esto permitió evaluar el desempeño de diferentes estrategias de pesca eléctrica en arroyos que muestran estructuras muy diferentes de la comunidad de peces (Teixeira de Mello *et al.*, 2012) y la aplicación de ecuaciones de transferencia para la extrapolación de los diferentes atributos de la comunidad de peces. Los análisis de regresión revelaron que los tres métodos P, S-P y M-P proporcionaron una imagen adecuada de la composición de especies y la distribución de tallas, no siendo necesaria la formulación de ecuaciones de transferencia para la comparación entre los métodos.

Por el contrario, la riqueza fue predicha mejor por S-P si consideramos las regiones de manera independiente y por P si consideramos las regiones de manera conjunta. Las ecuaciones de transferencia obtenidas para la abundancia revelaron que los datos de captura en las estimaciones de densidades por los

métodos P y S-P se pueden transformar con precisión al M-P. Las ecuaciones de transferencia generadas pueden tener gran relevancia, ya que permiten comparaciones confiables entre los datos obtenidos por diferentes métodos de pesca. También demostramos que muestreos menos intensivos pueden ser igualmente útiles para el monitoreo. La generación de este tipo de modelos ayuda a construir protocolos de muestreos en los cuales podemos reducir la captura de peces y obtener resultados similares. En este caso el nivel de reducción es contundente para ambas regiones climáticas, ya que entre la captura de peces con el método de mayor captura M-P y el de menor esfuerzo P en Uruguay se observó una reducción de 3.992 a 1.777 y en Dinamarca de 539 a 356 individuos. Las ecuaciones se pueden obtener en Teixeira de Mello *et al.* (2014) (*Environ Monit Assess* 186:1665-1677).

Artes de pesca pasivas

Redes de enmalle de espera o redes agalleras

Las redes de enmalle son el método más utilizado a nivel mundial para la colecta de peces tanto en lagos someros y profundos como en ríos, también es utilizada en sistemas marinos. En sistemas de agua dulce tiene la gran ventaja de permitir muestrear en zonas profundas no litorales (pelágicas) donde las artes de pesca antes mencionadas en general no son eficaces.

La captura con redes de espera generalmente no permite el cálculo de densidades y, en general, las capturas se expresan en función de unidades de esfuerzo de muestreo (CPUE), expresadas en redes o en área de red por una unidad de tiempo determinada.

Para la colecta con redes se deben considerar varios puntos importantes. En primer lugar, las redes no son selectivas a una determinada especie, por lo que no es un arte de pesca recomendable para la búsqueda de una especie en particular. El uso de diferentes tamaños de malla permite tener una mejor visión de la distribución de tallas de cada especie, así como la colecta de especies de diferentes tamaños. Por otra parte, la captura con redes suele permitir muy poca liberación de peces, la gran mayoría de las especies mueren en las redes, excepto algunas especies pertenecientes a la familia Loriicaridae (viejas de agua). En este sentido es de suma importancia que en los sistemas donde es posible ingresar varias veces al agua y no reviste riesgo para los operarios, durante la espera, se revisen las redes en períodos de dos a tres horas. Se debe considerar que el muestreo en un mismo sistema en diferentes momentos del año puede requerir esfuerzo de colecta diferencial. Una forma importante de regular la captura es considerar el número de redes que se trabaja. Por ejemplo, el uso de hasta 8 redes nórdicas (más adelante serán presentadas) durante toda una noche puede

implicar varias horas de trabajo de 5 a 8 personas para sacar los peces de las redes, a lo que se deben sumarse las horas para el procesamiento de dichos peces.

¿Cuántas horas debemos pescar con las redes? No es sencillo de definir y depende del conocimiento previo que se tenga del sistema. Como regla general, es conveniente comenzar con pocas redes o pocas horas de pesca para poder regular la captura, teniendo en cuenta las consideraciones asociadas a la representatividad y la validez de los datos que se están colectando. Dependiendo de los muestreos, diferentes proyectos en nuestro país han empleado de 2 a 12 horas de calado. ¿En qué horario debemos realizar el muestreo? Esto es muy dependiente de los objetivos y preguntas del proyecto. A menos que se busque evaluar cómo cambia la actividad de los peces durante el día, la colecta en general se realiza durante toda la noche o durante el amanecer y el atardecer, debido a que en estos momentos del día los peces suelen presentar su mayor actividad (Gelós *et al.*, 2010), y esto permite capturar la mayor diversidad de especies y mayores abundancias. Por otro lado, si lo que interesa es determinar las abundancias relativas de las diferentes especies, un número de horas excesivas cuando la captura es abundante puede generar problemas en la representatividad de la muestra. Esto se debe a que existe un efecto de sobresaturación de peces, por el cual, si las capturas son muy elevadas, las redes pierden su efectividad. Algunos estudios muestran que la captura no se relaciona de forma lineal con el tiempo, observándose una disminución en el número de individuos capturados a medida que se aumentan las horas de colecta (Olin *et al.*, 2004). Otro aspecto importante a considerar en el uso de redes es la predación sobre los peces atrapados por parte de piscívoros lo que puede representar un problema en el uso de este método de pesca en algunos sistemas. Por ejemplo, en nuestros sistemas podemos tener problemas importantes por ataques de tarariras (*Hoplias* spp.) y pirañas (serrasalmidae). En muchos casos algunos piscívoros de gran tamaño son atrapados precisamente por esta actividad de extracción en la red (Fig. 8).



Figura 8. Pike (*Esox lucius*) atrapado en la red al predear sobre una Perca (*Perca fluviatilis*). Foto: Franco Teixeira de Mello.

En cuanto a la representatividad de las colectas, se debe considerar la selectividad que tienen distintos tipos de redes sobre las diferentes especies, en general se observa una relación lineal entre el tamaño de los peces y el tamaño de las mallas utilizadas. Sin embargo, esa relación no existe para determinadas especies y se pueden capturar peces de un mismo tamaño, en general individuos medianos a grandes, en un mismo tamaño de malla. En nuestros sistemas este fenómeno se asocia a especies de siluriformes que cuentan con estructuras como chuzas y placas que los hacen más vulnerables a la captura. En estos casos debemos ser conscientes de que existirá una sobreestimación de la abundancia de estas especies. Por este motivo, es fundamental conocer la selectividad de las redes para tener buenas estimaciones de la abundancia relativa de las diferentes especies (Fig. 9). En nuestro país aún no se ha avanzado en el análisis de este tipo de información.



Figura 9. Se observa cómo peces siluriformes considerablemente más grandes que el tamaño de malla quedan atrapados debido a ornamentaciones corporales. Izquierda: *Paraloricaria vetula*, Derecha: *Iheringthys labrosus*. Fotos: Franco Teixeira de Mello.

Otro aspecto relevante a la hora de realizar colecta con redes es considerar el efecto, sobre todo en ríos, que puede tener el arrastre de detrito y algas filamentosas que son retenidas por las redes haciéndolas sumamente visibles y disminuyendo su efectividad de captura.

Tipo de redes y estandarización

La diversidad de redes que se utilizan en trabajos científicos es muy variada. Una de las características que define a una red es si es flotante o va al fondo, lo que está definido por el tamaño de las boyas en la línea superior y por el peso de los plomos en la línea inferior. El tamaño de las mallas es otro factor fundamental y existen infinidad de combinaciones de tamaño de malla (a cada malla se le llama paño) y largo de cada paño, así como el número de diferentes paños que se colocan en cada red. Otro factor importante en las redes de monofilamento es el diámetro del monofilamento que se utiliza para generar cada paño, ya que a medida que el diámetro aumenta la red se rompe menos pero se va perdiendo flexibilidad y por lo tanto efectividad en la captura de los peces. Otros tipos de redes llamados trasmallos están compuestos por una red de tamaño de malla pequeño cubierto a ambos lados por una malla de mayor diámetro.

Debido a la gran diversidad de tipos de redes muchas veces se hace imposible poder comparar datos entre trabajos, lo que resulta en una pérdida de información, que ya fue generada y muchas veces se debe recurrir a la realización de nuevos muestreos comparables. Por ello, es de suma importancia la estandarización de las redes que se utilizan en los diferentes ambientes.

Desde hace varios años en Uruguay hemos comenzado a utilizar redes de enmalle estandarizadas "Nordic SurveyNets", tanto en lagos como en ríos. Estas redes son utilizadas en toda Europa y están siendo incorporadas en países de

nuestra región. Cuentan con 12 paños de 2,5 metros cada uno, y una altura de 1,5 metros. Los 12 paños incluyen mallas que van desde 5 a 55 mm. También se ha estandarizado el diámetro del monofilamento que se usa para cada tamaño de malla, y el orden de cada paño en la red es el mismo. Este sistema nos permite colectar una amplia distribución de tallas de una misma especie y especies de diferentes tamaños (Fig. 10).



Figura 10. Izquierda, esquema de red estandarizada, la numeración superior que comienza en 43 muestra el tamaño de las mallas en mm y el orden de cada paño en la red. La numeración de abajo que comienza en 0,2 muestra el diámetro de la línea correspondiente a cada malla. Derecha, muestra distribución de tallas de *Crenicichla missioneira* colectados en el Río Uruguay. Foto: Franco Teixeira de Mello.

Nasas

Las nasas son otro arte de pesca pasivo, que consiste en trampas que permiten el ingreso, pero en general resulta muy difícil que los peces puedan salir. Éstas tienen una amplia diversidad de formas, tamaños y materiales de construcción y son utilizadas en diversos ambientes. En general las nasas se colocan sobre el fondo y, dependiendo de su tamaño, pueden capturar peces pequeños o grandes. Es importante vigilar con frecuencia las nasas debido a que los peces que ingresan se mantienen vivos y puede existir depredación. En este sentido, algunos especímenes grandes pueden quedar capturados intentando ingresar para alimentarse de peces más pequeños (Fig. 11), por lo que puede ser un sistema inadecuado para estudios de alimentación.



Figura 11. Se muestran dos tipos de nasa, Izquierda: nasa de malla metálica, se puede observar que los peces ingresan por los extremos en forma de embudo, luego es muy difícil encontrar la salida en el centro. Derecha: se muestra nasa con malla de red y sistema de ingreso de embudo, en la que quedó atrapada una tararira (*Hoplías malabaricus*) posiblemente intentando preñar los peces atrapados. Foto izquierda: Franco Teixeira de Mello, Foto derecha: Clementina Calvo.

Espineles/Palangres

El espinel es otro método de pesca pasiva que, a diferencia de los métodos anteriores, lleva cebo o carnada. En general se denomina espineles a los que se utilizan en sistemas de agua dulce y palangres a los utilizados en el mar, siendo estos últimos significativamente mayores. Los espineles consisten en una línea llamada línea madre, de donde surgen líneas más finas, llamadas brazoladas o reinales, las cuales tienen anzuelos en su extremo. Las brazoladas se separan entre ellas una distancia que impida que se enganchen los anzuelos de dos brazoladas diferentes (Fig. 12). Según la carnada que se utilice, el tamaño de los anzuelos, la posición donde se coloque y la hora del día, puede dirigirse a la pesca de determinadas especies o grupos de especies. Si se pretende capturar individuos vivos se deben revisar frecuentemente, ya que los individuos de la mayoría de las especies mueren rápidamente al estar capturadas por un anzuelo. Este método de colecta solo es recomendable cuando no se pueda acceder con otras artes de pesca como redes de enmalle o redes de arrastre, sobre todo si se considera utilizar como carnada a otros peces que deben ser capturados previamente.



Figura 12. Espineles utilizados en la pesca artesanal del Río Uruguay listos para ser encarnados. Foto: Nicolás Vidal.

Manipulación de los peces

Los peces son muy sensibles a la manipulación, por lo que, en casos en los que se pretende devolver los individuos al ambiente en el momento del muestreo, la manipulación debe ser rápida. Es recomendable en primera instancia colocar los peces en recipientes grandes, manteniéndolos en la sombra y, si es necesario, utilizar aireadores (Fig. 13). Este procedimiento tiene menor probabilidad de ser aplicado si los peces son capturados con redes agalleras, trasmallos o espineles.

El traspaso de peces de un recipiente a otro (por ejemplo, si se separan por especies) es recomendable que se realice con calderines pequeños como los de acuario, de manera de reducirles el daño y el estrés generado.



Figura 13. Truchas colectadas con pesca eléctrica a la espera de ser procesadas en campo. Foto: Franco Teixeira de Mello.

Dentro de las posibles manipulaciones se encuentran las técnicas de marcado de individuos para ser liberados y colectados nuevamente. El marcado permite obtener información del movimiento y crecimiento de los peces. En el mercado se encuentra una gran variedad de tipos y tamaños de marcas que se deberán seleccionar según el tamaño del pez. En Uruguay existen experiencias de marcaje de tarariras en el Río Negro (Fig. 14) y dorados en el Río Uruguay.

Por otro lado, se pueden realizar marcas directamente sobre el pez (*e. g.* retirando algunas escamas o perforando una aleta), aunque suelen tener muy poca durabilidad.

Otros métodos más modernos de marcaje incluyen la instalación de chips o radiotransmisores que permiten monitorear el movimiento de los peces. En Uruguay se han utilizado en tiburones en el medio marino y en especies migradoras como el dorado en el río Queguay.



Figura 14. Marca tipo *spaguetti* colocada en tarariras en el río Negro. Proyecto GEF DINARA FAO “Ensayo piloto de un enfoque de ecosistemas para la pesca costera en Uruguay”. Foto: Franco Teixeira de Mello.

Anestesia y eutanasia de peces

Dependiendo del objetivo del estudio, muchas veces se requiere anestésicos y registrar determinada información y, en otros casos, se requiere realizar eutanasia de los peces en el campo. Tanto para la anestesia como para la eutanasia en campo se suelen utilizar los mismos anestésicos en diferentes concentraciones y/o tiempo de exposición. Los principales anestésicos utilizados en nuestro país para el trabajo con peces en el campo son el 2-Phenoxi-Ethanol y el Eugenol (aceite de clavo). En el caso del 2-Phenoxi-Ethanol es recomendable comenzar a trabajar con soluciones de 1 ml.L^{-1} , concentración que permite anestésicos los peces y realizar procedimientos rápidos como registrar su largo y peso. Luego se lo debe dejar en un recipiente con agua del sistema y esperar a que se recupere antes de ser liberado. Si se pretende realizar eutanasia es mejor trabajar con concentraciones mayores, de 2 a 3 ml.L^{-1} . En el caso del Eugenol, primero se debe preparar una solución madre de 1:10 (Eugenol: Alcohol 95), que se utiliza en campo. Al igual que con el 2-Phenoxi-Ethanol es recomendable comenzar a trabajar con soluciones de 1 ml por litro de agua. Mientras que, para eutanasia, es mejor trabajar con concentraciones mayores a 4 a 5 ml.L^{-1} . En nuestro país, considerando el gran número de especies, es muy difícil contar con una receta que permita trabajar con todas las especies, por lo que la experiencia del investigador es fundamental a la hora de tomar determinadas decisiones. Por ejemplo, en el verano es más difícil lograr la recuperación de los individuos que en el invierno,

ya que el estrés y la capacidad de recuperación de los peces disminuye al aumentar la temperatura del agua. Si la manipulación es rápida, en muchos casos conviene medir y pesar el pez sin anestesiarlo, pero es una decisión que debe ser considerada en campo y dependerá de la experiencia previa. En el caso del uso de las redes para aquellos individuos que quedan muy enredados y aún están vivos, es recomendable sacrificarlos con un golpe en la cabeza o dislocación cervical manteniendo firme el cuerpo del pez con una mano y doblando la cabeza del pez hacia arriba con la otra mano.

Transporte de peces

Si se requiere transportar peces vivos del campo al laboratorio o estación experimental es necesario tener en cuenta varias consideraciones. Para mantener una oxigenación adecuada las bolsas o recipientes plásticos donde se colocan los peces deben cerrarse, logrando que el contenido de agua no supere un 20% del volumen. Además, se debe evitar que los recipientes reciban sol directo, ya que el aumento de la temperatura de agua puede provocar la muerte de los peces. En caso de transportar peces grandes en grandes volúmenes de agua es recomendable bajar la temperatura del agua colocando hielo, lo cual baja el metabolismo de los peces y el agua mantiene mayor concentración de oxígeno. Cuando la temperatura es elevada los peces chicos pueden ser colocados en conservadoras con hielo sin que el agua se enfríe demasiado, ya que esto también puede provocar la muerte de los peces.

Fijación y preservación

La fijación de los peces se realiza para preservar los ejemplares para su trabajo en el laboratorio pocos días después de su colecta, o incluso años después, si son depositados en una colección científica. La fijación en el campo, luego de la eutanasia, se realiza con formol 10%. Para asegurar una buena fijación, es conveniente mantener un volumen mayor de formol que el de peces, y en el caso de peces mayores a 20 cm es recomendable inyectar formol en la cavidad abdominal. Al trabajar con formol hay que considerar que: 1. el formol que se comercializa en general es formaldehído 40% y se debe diluir 10 veces para obtener la concentración adecuada de formol 10% o formaldehído 4%; 2. se debe usar protección en manos, cara y ojos con guantes, máscara y lentes, ya que el vapor del formol causa irritación en los ojos y en las vías respiratorias y afecta la piel rápidamente por contacto directo, a su vez, la exposición crónica tiene efectos cancerígenos en humanos.

Las muestras fijadas en formol sirven para múltiples análisis posteriores, como por ejemplo trabajos de isótopos estables (González-Bergonzoni *et al.*, 2015), morfometría externa y análisis óseos, análisis de contenido estomacal y pa-

rásitos, entre otros varios. En el caso de muestras guardadas por largos períodos en formol, existe una descalcificación ósea, por lo que es recomendable utilizar cuatro gramos de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y seis gramos de fosfato de sodio dibásico anhidratado (Na_2HPO_4) por litro de formol al 10% (Hughes & Cosgrove, 1990) para evitar ese proceso.

En cuanto a los medios de preservación, el mejor preservante y el más usado es el alcohol etílico al 70%. Como preservante, el alcohol etílico al 70% es un buen biocida, pero también es solvente e hidrofílico, por lo que causa que los tejidos se deshidraten y se encojan. Para estudios genéticos, por ejemplo, las muestras se preservan directamente en alcohol 95% e incluso pueden ser guardadas en freezer a -20°C . A su vez, muestras que previamente han sido fijadas en formol pueden ser preservadas en alcohol 70%, facilitando de esta forma el trabajo en el laboratorio, ya que evitan la exposición al formol. El pasaje de muestras desde formol a alcohol idealmente debe realizarse de forma secuencial, pasando de agua destilada a alcohol 10%, 30%, 50% y finalmente 70%, permaneciendo 10 minutos en cada paso. De esta manera se evita el deterioro de los tejidos del pez (Laframboise *et al.*, 1993).

Colecciones científicas

Las colecciones científicas son el destino final de muchas de las muestras que se obtienen en campo, y en ellas los individuos que se depositan deben ser acompañados del máximo de información posible. Existen diversos tipos de colecciones según el tipo de muestra o grupos taxonómicos que se preserven. Las funciones e importancia de las colecciones científicas radican en los objetos de naturaleza única que contienen, los que constituyen materia prima para generar y validar conocimiento científico. Además, preservan, conservan y mantienen disponibles los materiales y su información, de esta manera se está protegiendo un patrimonio cultural irremplazable. En este contexto, las colecciones permiten en muchos casos realizar investigaciones sustentadas en muestras ya tomadas, por lo que es una forma de reducir el sacrificio de animales, optimizar la información que se puede obtener de ellos y reducir el gasto en investigación. Además, nos permiten evaluar cambios en el tiempo, por ejemplo ¿cómo cambió el hábito trófico de una especie luego de un impacto?, o ¿cómo cambió el número de especies en un determinado lugar? Por estos motivos, la información organizada en colecciones es una herramienta indispensable para la investigación, pero también para el desarrollo de políticas y la toma de decisiones informadas para la gestión sostenible de los recursos naturales, el ordenamiento territorial y la conservación de la biodiversidad. Además, las colecciones constituyen un apoyo insustituible para la investigación en una amplia variedad de disciplinas científicas. Por otra parte, las colecciones científicas constituyen espacios que permiten

la integrar la docencia, investigación y extensión, a nivel de grado, posgrado y educación no formal en numerosas disciplinas científicas.

Referencias

- Angermeier P L, Smogor R. 1995. Estimating number of species and relative abundances in stream-fish communities: effects of sampling effort and discontinuous spatial distributions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 936-949.
- Baldwin L, Aprahamian M. 2012. An evaluation of electric fishing for assessment of resident eel in rivers. *Fisheries Research* 123: 4-8.
- Bohlin T, Hamrin S, Heggberget T G, Rasmussen G, Saltveit S J. 1989. Electrofishing - theory and practice with special emphasis on salmonids. *Hydrobiologia* 173: 9-43.
- Burr J G. 1931. Electricity as a means of garfish and carp control. *Transactions of the American Fisheries Society* 61: 174-181.
- Gardner P. 1997. Sample sizes for length and density estimation of 0+ fish when using point sampling by electric fishing. *Journal of Fish Biology* 50: 107-119.
- Gelós M, Teixeira de Mello F, Goyenola G, Iglesias C, Fosalba C, García-Rodríguez F, Pacheco JP, García S, Meerhoff M. Seasonal and diel changes in fish activity and potential cascading effects in subtropical shallow lakes with different water transparency. *Hydrobiologia* 646: 173-185.
- González-Bergonzoni I, Jepessen E, Vidal N, Teixeira de Mello F, Goyenola G, López-Rodríguez A, Meerhoff M. 2016 Potential drivers of seasonal shifts in fish omnivory in a subtropical stream. *Hydrobiologia* 768: 183-196.
- González-Bergonzoni I, Loureiro M, Oviedo S. 2009. A new species of *Gymnogeophagus* from the río Negro and río Tacuarí basins, Uruguay (Teleostei: Perciformes). *Neotropical ichthyology* 7: 19-24.
- Hamley J M. 1975. Review of gillnet selectivity. *Journal of Fisheries Research Board Canada* 32: 1943-1969.
- Haskell DC. 1940. An electrical method of collecting fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 69, 210-215.
- Hughes G W, Cosgrove J A. 1990. PH change in a formalin bórax solution with inferences about uses of neutrized formalin in vertebrate collections. *Collection Forum* 6:21-26.
- Janáč M, Jurajda P. 2007. A comparison of point abundance and continuous sampling by electrofishing for age-0 fish in a channelized lowland river. *North American Journal of Fisheries Management* 27: 1119-1125.
- Laframboise S, Rankin R M, Steigerwald M M L. 1993. Managing change: alcohol transfer at the Canadian Museum of Nature. Pp 28-33 in AM Snyder (ed.). 1992. ASIH Workshop on collection Care and Management Issues in Herpetology and Ichthyology. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Albuquerque, 52 pp.

- Linlokken A, Haugen T O. 2006. Density and temperature dependence of gill net catch per unit of effort for perch, *Perca fluviatilis*, and roach, *Rutilus rutilus*. Fisheries Management and Ecology 13: 261-269.
- Olin M, Kurkilahti M, Peitola P, Ruuhijarvi J. 2004. The effects of fish accumulation on the catchability of multimesh gillnet. Fisheries Research 68: 135-147.
- Peterson J T, Banish N P, Thurow R F. 2005. Are block nets necessary?: movement of stream-dwelling salmonids in response to three common survey methods. North American Journal of Fisheries Management 25: 732-743.
- Reebs S G. 2002. Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries 12: 349-371.
- Rodgers J D, Solazzi M F, Johnson S L, Buckman M A. 1992. Comparison of three techniques to estimate juvenile coho salmon populations in small streams. North American Journal of Fisheries Management 12: 79-86.
- Rudstam L G, Magnuson J J, Tonn W M. 1984. Size selectivity of passive fishing gear: a correction for encounter probability applied to gill nets. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 41: 1252-1255.
- Sály P, Eros T, Takács P, Specziár A, Kiss I, & Bíró P. 2009. Assemblage level monitoring of stream fishes: the relative efficiency of single-pass vs. double-pass electrofishing. Fisheries Research 99: 226-233.
- Serra W S, Zarucki M, Duarte A, Burrell E D, Teixeira de Mello F, González-Bergonzoni I, Loureiro M. 2013. First report of four characiform fishes (Ostariophysi: Characiformes) for Uruguay. Check List 9: 1576-1579.
- Smith K L, Jones M L. 2005. Watershed-level sampling effort requirements for determining riverine species composition. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 62: 1580-1588.
- Stoner A W. 2004. Effect of environmental variables on fish feeding ecology: implications for the performance of baited fishing gear and stock assessment. Journal of Fish Biology 65: 1445-1471.
- Teixeira de Mello F, Martínez G, González-Bergonzoni I. 2010. Rapid shift of the fish assemblage under contrasting light intensity scenarios during twilight in sandy beaches of Uruguay river (río Negro, Uruguay). Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay 19: 20-24.
- Teixeira de Mello F, Meerhoff M, Baattrup-Pedersen A, Maigaard T, Kristensen P B, Andersen T K, *et al.* 2012. Community structure of fish in lowland streams. Differ substantially between subtropical and temperate climates. Hydrobiologia 684: 143-160.
- Zarucki M, González-Bergonzoni I, Teixeira-de Mello F, Duarte A, Serra S, Quintans F, Loureiro M. 2010. New records of freshwater fish for Uruguay. Check List 6: 191-194.

CAPÍTULO 5

La construcción de un modelo experimental a partir de una especie silvestre: el caso de los peces eléctricos uruguayos

Ana Silva¹

Introducción

Los peces eléctricos de agua dulce neotropicales pertenecen al Orden Gymnotiformes (Mago-Leccia, 1994) y se encuentran distribuidos en una amplia zona del continente americano desde la provincia de Chiapas, en México al norte, hasta la cuenca del Río de la Plata al sur (Géry, 1969; Lowe-McConnell, 1987). Se caracterizan por presentar una modalidad sensorial peculiar, la electrorrecepción activa, que implica la emisión de descargas eléctricas de bajo voltaje (electrogenación) y su detección a través de sensores ubicados en la superficie corporal (electrorrecepción). A través de la emisión y recepción de estas señales eléctricas, los gymnotiformes son capaces de detectar la presencia de objetos en el ambiente y, por lo tanto, navegar. Como se muestra en la figura 1, la forma de onda de las descargas eléctricas y su ritmo de emisión son característicos de cada especie. Por lo tanto, las descargas eléctricas también actúan como señales de comunicación entre coespecímenes y proveen información sobre sexo, hora del día, y diversos estados fisiológicos y motivacionales de los individuos.

Los peces gymnotiformes son especialmente abundantes y diversos en la zona tropical correspondiente a las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco. Alrededor del ecuador se reconocen más de 130 especies, pero su número decrece hacia el norte y sur de la distribución. En descripciones tradicionales de ictiofauna en nuestro país (Devincenzi & Barattini, 1928; Vaz Ferreira, 1969) se reportan 6 especies de gymnotiformes: *Gymnotus carapo*, *Hypopomus brevirostris*, *Eigenmannia virescens*, *Apteronotus leptorhynchus*, *Rhamphichthys rostratus*, y *Rhamphichthys marmoratus*. En la recopilación más recientemente realizada sobre peces del río Negro con criterios taxonómicos actualizados (Serra *et al.*, 2014) se reco-

1 - Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Unidad Bases Neurales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - asilva@fcien.edu.uy

nocen: *Gymnotus omarorum* (Richer-des-Forges *et al.*, 2009), *Brachyhypopomus gauderio* (Giora & Malabarba, 2009), *Brachyhypopomus bombilla* (Loureiro & Silva, 2008), *Brachyhypopomus draco* (Giora *et al.*, 2008), y *Eigenmannia virescens* (Eigenmann, 1910). En forma más particular, el estudio biogeográfico realizado por Silva *et al.* (2003) se enfocó especialmente en la detección de peces eléctricos en nuestro país, explorando más de 200 cursos de agua dulce en sus intersecciones con las rutas nacionales y caminos vecinales. Como se muestra en la figura 1, este estudio confirmó la presencia de cuatro especies mayormente descritas en bases a individuos provenientes de nuestro país: *Gymnotus omarorum*, *Brachyhypopomus gauderio*, *Brachyhypopomus bombilla* y *Eigenmannia virescens*. Es interesante resaltar que *Gymnotus omarorum* es la única especie encontrada en todo el territorio nacional y la única que se encuentra en tributarios directos del Río de la Plata al sur del país. También es interesante destacar que *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio* (distribuida en el noreste del país) son las principales especies del Orden Gymnotiformes en Uruguay y, por tanto, con las que más se ha trabajado experimentalmente. Finalmente, es notorio que estas escasas especies australes de peces eléctricos se han adaptado a vivir en condiciones naturales propias de la zona subtropical con importantes variaciones estacionales de la temperatura del agua (en un rango de 8-33 °C) y del fotoperíodo (luz/oscuridad de 10 hs:14 hs en invierno a 14 hs:10 hs en verano), condiciones que se alejan mucho de las encontradas en zonas tropicales donde viven la mayoría de las especies de gymnotiformes.

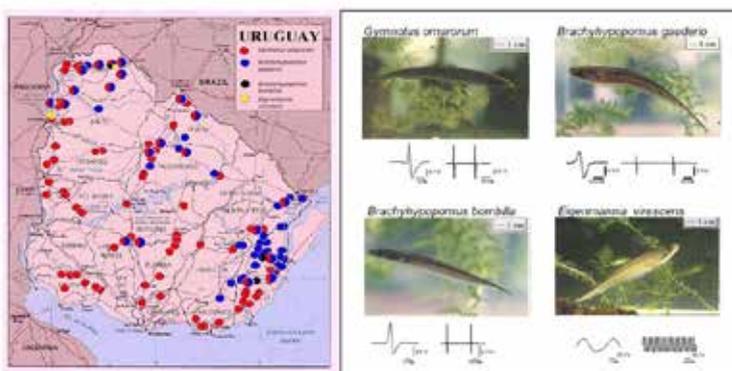


Figura 1. Relevamiento de la ocurrencia de Gymnotiformes en cursos de agua dulce de Uruguay. Izquierda: se reportan 4 especies con diferente distribución: *Gymnotus omarorum* en rojo, *Brachyhypopomus gauderio* en azul, *Brachyhypopomus bombilla* en negro y *Eigenmannia virescens* en amarillo. Derecha: se presentan fotos individuales de cada especie junto con su descarga eléctrica característica.

Todo manejo experimental de peces eléctricos autóctonos empieza con su detección y colecta en el hábitat natural. Como paso previo, y como se comenta en el Capítulo 2 de este libro, es necesario contar con un permiso de colecta, que en este caso es emitido por la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca; además de la aprobación del protocolo de experimentación por parte del Comité de Ética en el Uso de Animales de Experimentación de la institución correspondiente. El procedimiento de colecta de peces eléctricos aprovecha dos aspectos fundamentales de su biología: 1) sus hábitos nocturnos, por lo que se colectan durante el día cuando los animales están en reposo generalmente refugiados entre las raíces de plantas acuáticas; y 2) su capacidad de generar electricidad, por lo que se utiliza un detector de las descargas para localizar con precisión la ubicación de cada individuo. Como se muestra en la figura 2, este detector es un amplificador de señales eléctricas, cuya salida se conecta a un parlante, lo que permite transformar cada descarga eléctrica en un sonido. La técnica de detección y colecta consiste en vadear la zona litoral cubierta de vegetación con máximo cuidado para no distorsionar el ambiente ni generar la alerta de los peces colocando el detector entre las plantas hasta detectar el sonido característico. Una vez identificado el sonido, se rastrea el punto de máxima auscultación para precisar la ubicación del pez, y finalmente se coloca un calderín de cuadro de hierro firme por debajo del lugar indicado, a modo de bandeja, y se levanta cuidadosamente. El éxito de la maniobra se monitorea por el aumento del volumen de la señal sonora que se percibe al levantar el calderín junto con el pez refugiado entre la vegetación. Es importante destacar que el número de individuos colectados por maniobra va a depender del espaciamiento interindividual de cada especie. En el ejemplo de la figura 2, se muestra la colecta de *Brachyhyopomus gauderio* que es una especie gregaria, por lo que pueden colectarse varios individuos por vez. En el caso de *Gymnotus omarorum*, que es una especie territorial como se describe más adelante (ver figura 3), el procedimiento de colecta es individual, y se repite de igual manera hasta alcanzar el número de animales necesarios. Inmediatamente después de ser capturado, el animal se coloca en una bolsa plástica con un tercio de agua del hábitat natural y dos tercios de aire para su traslado al Bioterio de Animales Poiquiloterms del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, donde se mantienen en cautiverio hasta su utilización. Alternativamente, los animales se estudian en el campo y se procesan rápidamente después de su captura, de acuerdo a protocolos de experimentación preestablecidos.



Figura 2. Captura de peces eléctricos en la Laguna Lavalle, Tacuarembó, Uruguay. Se muestra el detector utilizado para la ubicación precisa del animal, y la secuencia de búsqueda por vadeo en la zona litoral de la laguna cubierta de vegetación, detección por transformación de la señal eléctrica en sonora y colecta.

El estudio de los peces eléctricos como modelo neuroetológico fue introducido en el país por los investigadores del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Omar Macadar y Omar Trujillo-Cenóz en la década de 1980. Hoy constituyen uno de los grupos de peces autóctonos mejor estudiados del país con diversos enfoques tanto ecológicos, sistemáticos, anatómicos, comportamentales, fisiológicos, biofísicos como cognitivos. En estos casi 40 años, se ha contribuido al conocimiento de este interesante grupo de animales y se ha ganado una importante experiencia de manejo, tanto en la naturaleza como en el laboratorio, sobre la cual se sustenta la construcción de un modelo experimental a partir de especies silvestres autóctonas. A continuación, se presentan dos ejemplos de manejo en base de las dos especies más abundantes de Uruguay, *Gymnotus omarorum* y *Brachyhyppopomus gauderio*.

Caso 1: *Gymnotus omarorum*: territorialidad fuera del período reproductivo

Gymnotus omarorum se ha convertido en un modelo ventajoso para estudiar las bases neuroendócrinas de la agresión, por desplegar un tipo de agresión territorial inusual, único ejemplo estudiado en teleósteos hasta el momento, que se produce fuera del período reproductivo, tanto en machos como en hembras, en forma independiente de las hormonas gonadales. La agresión intraespecífica mejor estudiada y entendida en vertebrados ocurre mayormente entre machos, en contexto agonístico relacionada a la competencia por hembras y/o territorios durante la reproducción, y por tanto fuertemente controlada por hormonas androgénicas gonadales. La ocurrencia de agresión intraespecífica sin motivación reproductiva, como es el caso de *Gymnotus omarorum*, abre la oportunidad para el estudio de mecanismos alternativos o complementarios de modulación de esta conducta social. Por otra parte, la territorialidad, entendida como la capacidad de mantener acceso prioritario en una región delimitada con exclusión proactiva de intrusos, se acepta que se establece por encuentros agonísticos que permiten el establecimiento y mantenimiento de la dominancia sobre el recurso territorio. Combinando abordajes de campo y de laboratorio, se ha podido de-

mostrar en *Gymnotus omarorum* cómo el comportamiento agonístico media la adquisición y defensa de territorios.

La distribución espacial de una población de *Gymnotus omarorum* se estudió en su hábitat natural fuera del período reproductivo a través del censo eléctrico (Zubizarreta *et al.*, 2017). En primer lugar, se procedió a la identificación precisa del lugar en que se encuentra cada individuo (puntos en figura 3 arriba). En base a estos puntos, se determinó la distancia al vecino más próximo (líneas en Figura 3 arriba) que se utilizó como indicador del tamaño territorial. Posteriormente, se procedió a la extracción de cada pez y a la toma de medidas morfométricas, fisiológicas y hormonales para identificar los determinantes del tamaño territorial. A través de un modelo lineal generalizado, que consideró el sexo de los individuos, su tamaño corporal, los niveles de hormonas esteroides gonadales, entre otras variables. Se pudo determinar que el mejor y único predictor del tamaño territorial para machos, hembras y para ambos sexos considerados en conjunto fue el tamaño corporal, como se muestra en la figura 3 abajo.

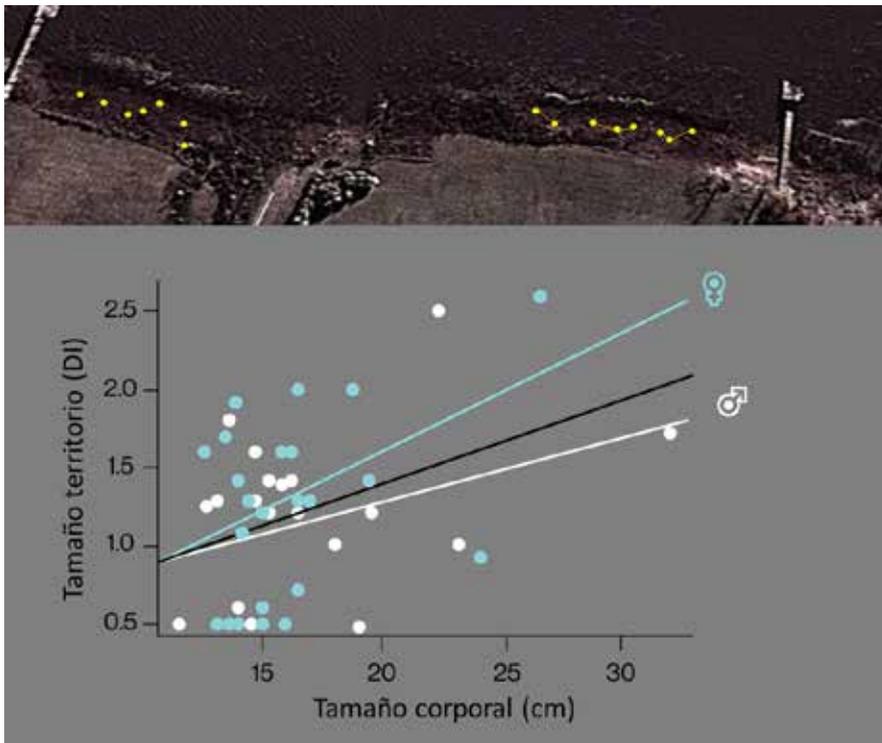


Figura 3. Distribución espacial de individuos de *Gymnotus omarorum* en la Laguna de los Cisnes, Maldonado, Uruguay. Arriba: foto aérea de la zona de estudio indicando la presencia de cada individuo (puntos) y la distancia al vecino más próximo (DI indicada con líneas). Abajo: resultado del Modelo Lineal Generalizado indicando que el mejor predictor del tamaño territorial medido por DI es el tamaño corporal en cm $p = 0,01$; $r^2 = 0,11$; $n = 48$.

Con la idea de demostrar que el espaciamiento de los individuos de *Gymnotus omarorum* era el resultado de la defensa de territorios individuales mediado por encuentros agonísticos, se diseñaron dos experimentos conductuales que se llevaron a cabo en el laboratorio. En primer lugar, se diseñaron experimentos de encuentros diádicos de corto plazo (20 minutos) macho-macho, hembra-hembra y macho-hembra para evaluar los determinantes de la resolución del conflicto (figura 4 arriba). En segundo lugar, se diseñaron experimentos de encuentros diádicos entre machos de largo plazo (36 horas) para evaluar la persistencia de la jerarquía y la defensa del territorio a lo largo del tiempo (figura 4 abajo).

Como paso preliminar de todo experimento realizado en el laboratorio, los individuos ingresan al Bioterio de Animales Poiquiloterms del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, donde se les consigna peso y longitud. El alojamiento de gymnotiformes en estas instalaciones se realiza en tanques exteriores de 500 l de agua de baja conductividad ($< 200 \mu\text{S}/\text{cm}$), cubiertos de vegetación acuática similar a la observada en la naturaleza. Los animales se alimentan *ad libitum* con *Tubifex tubifex* y se mantienen en un rango de temperatura de 10-30 °C. Respetando las condiciones de espaciamiento individual de *Gymnotus omarorum* en la naturaleza, y para asegurar una misma experiencia previa de encuentros agonísticos entre los animales, los individuos de esta especie se colocan en compartimientos individuales dentro de los tanques alojamiento. De esta forma pueden comunicarse por medio de sus descargas pero no agredirse físicamente.

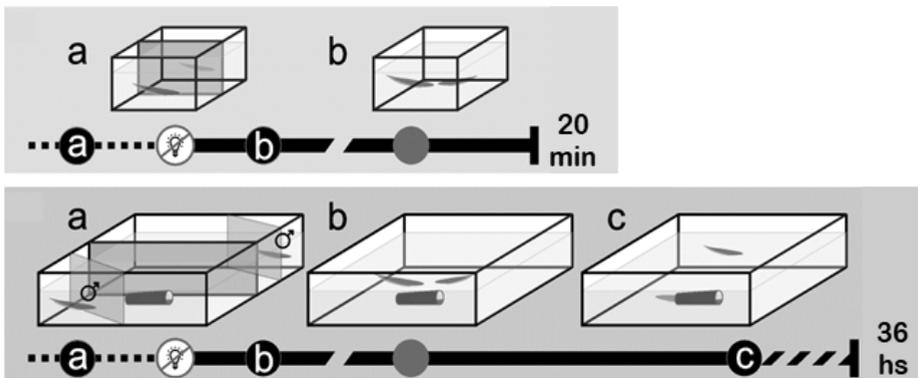


Figura 4. Encuentros agonísticos diádicos en *Gymnotus omarorum*. Arriba: experimento en díadas intra e intersexuales de corto plazo (20 min). Abajo: experimento en díadas macho-macho de largo plazo (36 hs). a: fase preconflicto: los individuos se colocan en compartimientos separados por una compuerta abatible. b: fase de contienda: los individuos interactúan agresivamente. c: fase de mantenimiento de la dominancia. Se indican el momento del apagado de la luz en la estación conductual coincidente con el atardecer y el momento de la resolución del conflicto (r) (Perrone *et al.*, 2019).

Los encuentros agonísticos de corto plazo (figura 4 arriba) permitieron demostrar que inmediatamente después de levantar la compuerta (en menos de 30 s) se produce en todos los casos una contienda agresiva de la que surge el establecimiento de un estatus de dominancia-subordinación en pocos minutos (alrededor de 3 min. en promedio). En estas contiendas, se reconoce una primera fase en la que ambos individuos intercambian despliegues agresivos y una fase final de resolución en la que sólo el dominante continúa con los ataques mientras el subordinado se retira. El subordinado agrega además una secuencia de señales eléctricas de subordinación que incluyen la disminución del ritmo de emisión de su descarga, el apagado de su descarga que simula su huida y *chirps* de sumisión que son señales transitorias de alta frecuencia y baja amplitud. Del análisis de estos experimentos realizados fuera del período reproductivo con animales adultos no sexualmente maduros surgen los siguientes resultados: a) la resolución del conflicto sólo depende de la asimetría en el peso corporal de los contrincantes siendo el individuo de mayor tamaño el que se establece como dominante (Bastista *et al.*, 2012); b) no existen diferencias en los niveles de hormonas esteroides circulantes entre dominantes e individuos control (Quintana *et al.*, 2016); y c) las características de la contienda entre individuos castrados son indistinguibles de las que involucran individuos intactos (Jalabert *et al.*, 2015). Estos resultados concuerdan con lo observado en la naturaleza y sugieren que el establecimiento de territorios individuales correlacionados con el tamaño corporal está mediado por encuentros agonísticos que se desarrollan en forma independiente de las hormonas gonadales y cuya resolución sólo depende de la asimetría de tamaños corporales entre los contrincantes.

Los encuentros agonísticos de largo plazo (figura 4 abajo) se realizaron en peceras de registro más grandes y permitieron demostrar que, después de levantar la compuerta, se produce en todos los casos una contienda agresiva de la que surge el establecimiento de un estatus de dominancia-subordinación en pocos minutos (menos de 15 min). Estas contiendas son menos agresivas que las previamente reportadas y rara vez incluyen señales eléctricas de sumisión; sin embargo, se resuelven también a favor del individuo de mayor tamaño (Valiño, 2017). El registro prolongado por 36 hs y el agregado de un único refugio central como territorio enriquecido a defender, permitió confirmar que la dominancia no se revierte a largo plazo y que el dominante excluye proactivamente al subordinado del área central de la arena, impidiéndole el acceso al refugio. Estas características, propias de la definición de territorialidad, permitieron confirmar que los encuentros agonísticos median la territorialidad en *Gymnotus omarorum*.

Caso 2: *Brachyhypopomus gauderio*: reproducción en cautiverio por claves ambientales novedosas

El género *Brachyhypopomus* engloba varias especies de peces eléctricos neotropicales. En particular, *Brachyhypopomus gauderio*, previamente clasificado como *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, es considerado un modelo experimental muy ventajoso por exhibir una excepcional plasticidad en su señalización eléctrica que incluye modulaciones estacionales, día-noche, y un pronunciado dimorfismo sexual en sus descargas eléctricas.

Estudios pioneros referidos al ciclo reproductivo de los gymnotiformes tropicales determinaron las condiciones ambientales y sociales requeridas para su reproducción. A pesar de vivir en el trópico, con escasas variaciones anuales de fotoperíodo y de temperatura, estos peces se reproducen estacionalmente en coincidencia con la estación lluviosa. Kirschbaum (1975) logró la reproducción exitosa de varias especies de gymnotiformes en cautiverio manteniendo grupos de peces en grandes peceras a temperatura constante (28 °C), con abundante alimentación y simulando lluvia por el agregado de agua desionizada diariamente a la misma hora del día. De esta manera, se logró remedar paulatinamente las condiciones de la estación lluviosa natural; es decir, el aumento gradual de los niveles de agua con disminución de la conductividad eléctrica. Con estas simples maniobras de manejo se logró promover la maduración gonadal en machos y hembras indiferenciados y la ovoposición y espermiación en menos de 30 días. La puesta en práctica de esta técnica en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se perfeccionó en el laboratorio de Philip Stoddard de la Florida International University, en Miami, EE.UU., a fines del siglo pasado. En este caso, se utilizaron tanques exteriores comunales de 500 l cubiertos con densa vegetación acuática de tipo camalote, una proporción sexual de 1:2 - 1:3 macho-hembra, lluvia simulada de agua desionizada para llevar la conductividad del agua por debajo de 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y un rango de temperatura entre 26-30 °C. Este grupo mostró que manteniendo estas condiciones, *Brachyhypopomus* podía reproducirse a lo largo de todo el año. Diariamente, se colectaban los huevos fertilizados encontrados en el dorso de las hojas de las plantas acuáticas o en sus raíces y se trasladaban a acuarios interiores de cría de donde se obtenían individuos juveniles y adultos con un índice de sobrevivencia razonable.

Para identificar el ciclo reproductivo de *Brachyhypopomus gauderio* y sus determinantes ambientales en nuestro país se hizo el seguimiento de una población natural de esta especie en la Laguna del Tigre, departamento de Treinta y Tres, Uruguay. Se determinó la estructura de la población y sus variaciones estacionales por muestreos mensuales utilizando la técnica de captura por unidad de esfuerzo; es decir, el número de individuos colectados durante un período fijo de 2 hs. por un equipo entrenado en la detección y colecta de peces eléctricos (Silva *et al.*, 2003). Inmediatamente después de su captura, se identificó el

tamaño corporal de los individuos para separarlos como adultos o juveniles y, en adultos, se buscaron los indicadores morfológicos y electrofisiológicos de madurez sexual para clasificarlos como adultos indiferenciados, machos o hembras. Como se muestra en la figura 5, la estructura poblacional de la especie presenta importantes variaciones estacionales: los individuos adultos sexualmente maduros (machos y hembras) sólo se observan durante los meses de noviembre a febrero, siendo los principales representantes de la población en diciembre. Los individuos juveniles aparecen en una ventana temporal amplia, pero es claro que la nueva cohorte aparece en enero, momento en que los juveniles son los principales representantes de la estructura poblacional. Este estudio permitió ubicar el período reproductivo de esta población austral de *Brachyhypopomus gauderio* entre noviembre y febrero, en coincidencia con el pico máximo de las variaciones estacionales de la temperatura promedio del agua y con el fotoperíodo extremo con mayores horas de luz diaria (figura 6). Estos datos contrastan con las condiciones ambientales propicias para la reproducción reportada para este mismo género en el trópico, teniendo en cuenta, además, que no se encontraron diferencias estacionales en la conductividad eléctrica en los cursos de agua dulce donde habitan peces eléctricos en Uruguay. Claramente, en ausencia de alternancia de estaciones lluviosas y secas, la reproducción de *Brachyhypopomus gauderio*, y de las otras especies de gymnotiformes adaptadas a la vida en el clima templado utiliza otros factores temporizadores ambientales para el disparo del proceso de madurez gonadal y posterior reproducción.

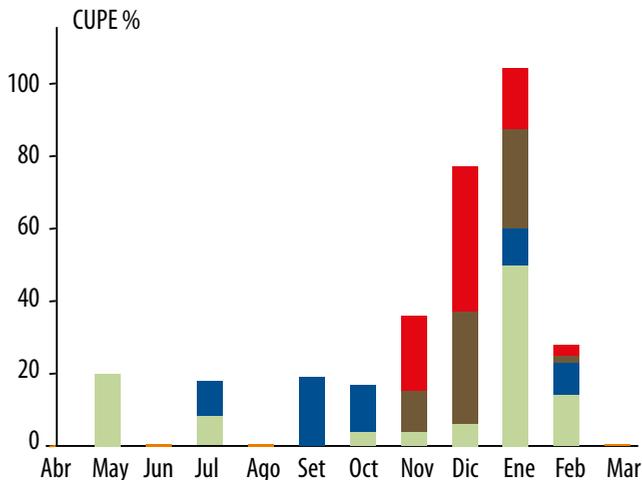


Figura 5. Seguimiento de la estructura poblacional de *Brachyhypopomus gauderio* en la Laguna del Tigre, departamento de Treinta y Tres, Uruguay. Porcentaje de captura por unidad de esfuerzo (CPUE) de individuos adultos indiferenciados (azul), machos (marrón), hembras (rojo) y juveniles (verde) a lo largo del año.

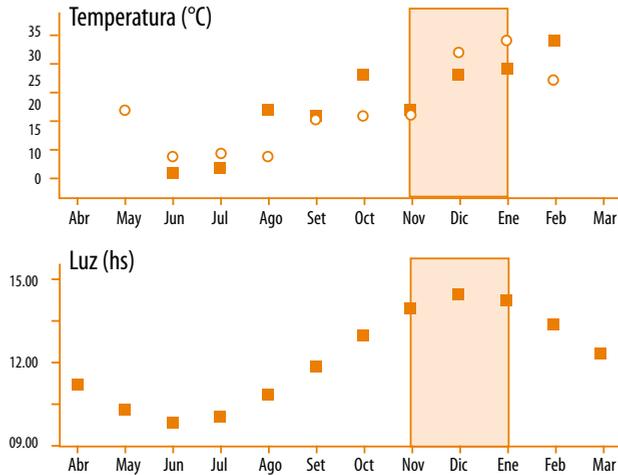


Figura 6. Variaciones estacionales de la temperatura del agua consignada en la Laguna del Tigre en los dos años del muestreo y del fotoperíodo en relación a la ocurrencia del período reproductivo en la especie (área recuadrada).

Manteniendo constantes el fotoperíodo (12:12 hs luz/oscuridad) y la conductividad eléctrica del agua (alrededor de 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$) se pudo demostrar en el laboratorio que la aclimatación a temperaturas elevadas promovía la maduración gonadal y aparición de dimorfismo sexual en individuos adultos de *Brachyhypopomus gauderio* fuera del período reproductivo (Quintana *et al.*, 2004). En base a estos resultados, se lograron condiciones de cautiverio en tanques comunales exteriores en los que se obtiene una reproducción sistemática de la especie. Básicamente, manteniendo una proporción sexual de 1:3 macho-hembra, la conductividad por debajo de 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y aportando una alimentación generosa, se observa la presencia de huevos fertilizados y alevines, en coincidencia con el aumento de la temperatura ambiente e incremento de las horas de luz de la primavera tardía-verano.

Es importante resaltar la plasticidad de la especie para detectar los cambios del ambiente y ubicar su reproducción en el momento preciso del ciclo anual en que sus crías tengan máxima chance de supervivencia. Resulta evidente que los requerimientos necesarios para la reproducción exitosa incluyen alta temperatura y baja conductividad eléctrica del medio. Pero también resulta claro que *Brachyhypopomus gauderio* es capaz de sensor variaciones ambientales de ambas variables para disparar su madurez gonadal. En el trópico, en condiciones de temperaturas elevadas del agua constantes a lo largo del año, la reproducción se enfoca con la disminución de la conductividad eléctrica del agua que se produce como consecuencia de la estación lluviosa. En la zona templada, en cambio, con condiciones de conductividad eléctrica del agua baja y constante a lo largo del año, la reproducción se dispara por el aumento de la temperatura del agua que se observa al aproximarse la estación estival.

Perspectivas

Los peces eléctricos del Orden Gymnotiformes se han instituido como modelos experimentales neuroetológicos de gran impacto y proyección. El grupo de investigadores uruguayos desarrolla estas actividades en constante colaboración con la comunidad internacional de peces eléctricos, organizada entorno a la Sociedad Internacional de Neuroetología. La generalización de los abordajes genómicos ha alcanzado a los peces eléctricos recientemente y sus aportes abren nuevas perspectivas de manejo en el futuro cercano. En colaboración con el laboratorio de Harold Zakon, Universidad de Texas, Austin, EE.UU. y con el Departamento de Genómica del Instituto de Investigaciones Clemente Estable, dirigido por José Sotelo-Silveira, se ha ensamblado el primer transcriptoma de referencia de *Gymnotus omarorum*. Por otra parte, Jason Gallant, Universidad de Michigan, Lansing, EE.UU., quien coordina el proyecto EfishGenomics, ha completado el ensamblado del primer transcriptoma de referencia de *Brachyhyopomus gauderio*. Toda la información referida se encuentra disponible en el sitio web www.efishgenomics.integrativebiology.msu.edu. Para profundizar los estudios y las potencialidades del modelo, se ha decidido enfocar los esfuerzos en la especie *Brachyhyopomus gauderio* por la facilidad del manejo de su reproducción. En ese sentido, por ejemplo, se trabaja en la instrumentación de la técnica de CRISPR con el fin de tener la posibilidad de modificar secuencias de genes específicas que den respuesta a múltiples interrogantes sobre la evolución de los peces eléctricos y sobre el rol de la comunicación eléctrica en el moldeado de la conducta social. El avance de estas técnicas impone unas condiciones de manejo que alejan, al menos a esta especie seleccionada de Gymnotiformes, de su consideración como ANTE y hacen pensar que se asiste a la consolidación de un modelo experimental de manejo tradicional a partir de una especie silvestre autóctona de Uruguay.

Referencias

- Batista G, Zubizarreta L, Perrone R, Silva A. 2012. Non-sex-biased Dominance in a Sexually Monomorphic Electric Fish: Fight Structure and Submissive Electric Signalling. *Ethology* 118: 398-410.
- Devincenzi G J, Barattini LP. 1928. Álbum ictiológico del Uruguay. Anales del Museo de Historia Natural, Montevideo, Uruguay. 24 pp.
- Eigenmann CH. 1910. Catalogue of the freshwater fishes of tropical and south temperate America. III Zoology. Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia, 1896-1899. Princeton, pp. 375-511.
- Géry J. 1969. The freshwater fishes of South America. pp. 828-848. In: E. J. Fittkau, J. Illes & H. Klinge (eds.) Biogeography and Ecology in South America. Monographiae Biologicae. No. 9. Dr W. Junk Publ., The Hague.

- Giora J, Malabarba L R, Crampton W. 2008. *Brachyhypopomus draco*, a new sexually dimorphic species of Neotropical electric fish from Southern South America (Gymnotiformes: Hypopomidae). *Neotropical Ichthyology* 6:159-168.
- Giora J, Malabarba L R. 2009. *Brachyhypopomus gauderio*, new species, a new example of underestimated species diversity of electric fishes in the southern South America (Gymnotiformes: Hypopomidae). *Zootaxa* 2093, 60-68.
- Jalabert C, Quintana L, Pessina P, Silva A. 2015. Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. *Hormones and behavior* 72: 60-67.
- Kirschbaum F. 1975. Environmental factors control the periodical reproduction of tropical electric fish. *Experientia* 31: 1159-1160.
- Loureiro M, Silva A. 2006. A New Species of *Brachyhypopomus* (Gymnotiformes, Hypopomidae) from Northeast Uruguay. *Copeia* 2006: 665-673.
- Lowe-McConnell RH. 1987. *Ecological Studies in Tropical Fish Communities*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 382 pp.
- Mago-Leccia F. 1994. *Electric Fishes of the Continental Waters of America*. Clemente Editores, Caracas. 206 pp.
- Perrone R, Pedraja F, Valiño G, Tassino B, Silva A. 2019. Non-breeding territoriality and the effect of territory size on aggression in the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. *Acta Ethologica*. <https://doi.org/10.1007/s10211-019-00309-7>
- Quintana L, Silva A C, Berois N, Macadar O. 2004. Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in *Brachyhypopomus pinnicaudatus* from a temperate climate. *Journal of Experimental Biology* 207: 1843-1853.
- Quintana L, Zubizarreta L, Jalabert C, Batista G, Perrone R, Silva A. 2016. Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. *Journal of Physiology-Paris* 110: 224-232.
- Richer-De-Forges M M, Crampton W G R, Albert J S. 2009. A new species of gymnotus (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia* 2009: 538-544.
- Serra S, Bessonart J, Teixeira de Mello F, Duarte L, Loureiro M. 2014. *Peces del Río Negro*. MGAP-DINARA. Montevideo, Uruguay. 208 pp.
- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P. 2003. Biogeography and breeding in gymnotiformes from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes* 66: 329-338.
- Valiño G. 2017. Una aproximación al estudio de las bases transcriptómicas cerebrales de las jerarquías sociales en dos especies de teleosteos. Tesina de Grado, Licenciatura de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Zubizarreta L, Quintana L, Hernández D, Guimaraes Moreira R, Honji R, Silva A. 2017. Seasonality in the spatial distribution of a teleost fish with Territorial aggression: morphometric and hormonal correlates. 21st Annual Meeting Society Behavioral Neuroendocrinology. Long Beach, California, EE.UU. Pp. 3-37.



CAPÍTULO 6

Colecta y manejo de anfibios en el ambiente

Raúl Maneyro¹

El trabajo de investigación o docencia que implica el manejo de anfibios suele requerir de la utilización de especímenes capturados en la naturaleza. Hay pocas especies de anfibios que se crían en Uruguay con fines comerciales. Una de ellas, la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) fue introducida como especie potencialmente explotable por su carne, sin embargo, el negocio dejó de tener un atractivo interesante a los ojos del inversor, y los ranarios fueron cerrando. Otras especies de anfibios que se crían en confinamiento son comercializadas como mascotas exóticas, tales como los sapos del género *Xenopus* o los axolotes del género *Ambystoma*.

Debido a que el trabajo científico a través abordajes experimentales requiere coleccionar ejemplares silvestres, es importante tener en cuenta, en primer lugar, que la colecta de anfibios está regulada por el marco normativo de la Ley 9481 y el Decreto Reglamentario 164/996. Por lo tanto, para la colecta y transporte de anfibios con fines científicos, es necesario obtener el Permiso de Caza y Colecta Científica. Dicha autorización se obtiene en la División Fauna de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (MVOTMA) y es independiente de los trámites asociados al aval de Protocolos de Experimentación que se realizan en la Comisión Honoraria de Experimentación Animal. Si un investigador necesita obtener ejemplares que usará en experimentación o docencia, además del protocolo correspondiente, es necesario tramitar el Permiso que lo habilita a coleccionar y transportar esos animales.

A nivel global se han descrito más de 8.000 especies de anfibios (Frost, 2019). La fauna de anfibios de Uruguay está compuesta por casi 50 especies pertenecientes a dos órdenes: Anura (ranas y sapos) y Gymnophiona (habita en el país una especie de cecilia) (Maneyro & Carreira, 2012). Hay diversos modos de colec-

1 Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados. Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay. rmaneyro@fcien.edu.uy

tar anfibios, pero en líneas generales podemos dividir las técnicas en dos grupos: colecta manual y uso de trampas.

La colecta manual tiene como objetivo coleccionar larvas o anfibios posmetamórficos (juveniles o adultos que ya han completado su metamorfosis). A excepción de la cecilia (que es una especie vivípara), las especies de anfibios de Uruguay poseen larvas acuáticas (renacuajos). La forma más frecuente de colecta es a través de la utilización de calderines o algún tipo de red de malla acorde al organismo que se pretende coleccionar (Fig. 1). En general, las larvas de anfibios se encuentran en mayor concentración en los lugares donde hay vegetación enraizada y, por lo tanto, si el objetivo es maximizar el esfuerzo de colecta, entonces allí es donde debe focalizarse la búsqueda (Mc Diarmid & Altig, 1999). Para el transporte de larvas al laboratorio es importante contar con recipientes rígidos, donde colocar no más de dos larvas por litro de agua (aunque esa densidad puede variar en función del tamaño de los animales). Es conveniente realizar el transporte usando agua del lugar, y adicionar algo de vegetación a los recipientes.



Figura 1. Colecta de larvas usando calderines (Foto: Mariana Beheregaray)

Cuando la colecta manual se focaliza en la captura de ejemplares posmetamórficos, puede estar dirigida tanto a la búsqueda de los animales en sus refugios, como de aquellos que se encuentren en actividad (Maneyro *et al.*, 2017). La mayoría de las especies de anfibios de Uruguay son nocturnas y, en los momentos de inactividad, se encuentran en diferentes tipos de refugios. Si bien algunas especies se entierran o permanecen en el agua, otras suelen refugiarse bajo piedras, troncos o cualquier tipo de estructura natural o artificial que se encuentre disponible en el ambiente. La colecta manual bajo estas estructuras es una forma frecuente de conseguir especímenes para su estudio (Cacciali, 2013). Por otra par-

te, los anfibios están activos principalmente de noche, y por lo tanto con el auxilio de elementos de iluminación (linternas, focos) es posible encontrar animales desplazándose, alimentándose o reproduciéndose a esas horas (Fig. 2). Además, el canal auditivo es la principal herramienta de comunicación de los anuros, y estos organismos poseen diversos tipos vocalizaciones. Estas manifestaciones comportamentales hacen que ranas y sapos sean animales muy conspicuos, especialmente los machos, quienes utilizan las vocalizaciones nupciales y territoriales con fines reproductivos; dichas vocalizaciones también ayudan al colector a localizar ejemplares de interés (Maneyro *et al.*, 2017). Es importante destacar que, si bien la colecta manual puede resultar trabajosa, minimiza la captura incidental de ejemplares que no sean de interés.



Figura 2. Colecta y fotografía nocturna de anfibios anuros en un sitio de reproducción (Foto: Raúl Maneyro).

Debido a que los anfibios poseen una dieta mayormente insectívora, no son susceptibles a ser capturados con trampas cebadas. No obstante, las trampas de caída o trampas *pit-fall* han sido históricamente utilizadas para la captura de ejemplares (Heyer *et al.*, 1994). Estas trampas consisten en recipientes de volumen variable (aunque, en general, superiores a los 20 l), que se entierran a ras del suelo, donde los anfibios caen y quedan atrapados. En épocas pasadas se colocaban sustancias fijadoras, pero en la actualidad son utilizados como trampas de vida, permitiendo que los animales puedan ser capturados y, en caso de así requerirse, ser liberados. En cada recipiente se coloca un algodón o papel absorbente embebido en agua para evitar la deshidratación de los ejemplares,

y puede colocarse también un trozo de cartón para que sirva como refugio. En ocasiones, a estas trampas se les coloca una cubierta que a modo de techo cumple una doble función: aumenta la eficiencia de la trampa (ya que simula un refugio) y protege a los ejemplares capturados de algunos tipos de depredadores (aves) al tiempo que proporciona sombra. Estas trampas deben ser revisadas con frecuencia (al menos una vez al día), para mitigar el estrés de los ejemplares, minimizar la posibilidad de que los animales sean depredados, y disminuir las alteraciones en la condición corporal de los animales capturados. Otra forma de incrementar la eficiencia de estas trampas es utilizando vallas de deriva, que consisten en cercos de poco más de 50 cm de altura, que se disponen entre las trampas, y se entierran 10 cm, a los efectos de direccionar a los animales hacia las trampas (Fig. 3). Estos mismos cercos pueden utilizarse para rodear sitios de reproducción para realizar trabajos de investigación con el fin de conocer la dinámica migratoria de los juveniles o adultos de una especie. Una de las limitantes de las trampas de caída es que algunas especies tiene mayor posibilidad de escape que otras, especialmente las especies trepadoras (como las ranas de la Familia Hylidae, que poseen discos adhesivos), no obstante constituyen un método eficiente y estandarizado para la mayoría de las especies que habitan en Uruguay.



Figura 3. Sistemas de trampas de caída tipo *pit-fall* en un charco de reproducción (Foto: Mariana Beheregaray).

Una vez colectados, puede ser necesario transportar los anfibios. Lo recomendable es que el transporte se realice en recipientes individuales descartables (en caso de distancias cortas, pueden usarse bolsas de polietileno). Cuando no se descarta el recipiente donde se transportan anfibios, es recomendable que antes de reutilizarlo sea desinfectado, a los efectos de evitar la propagación de

patógenos, como es el caso del hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*, los ranavirus y otros patógenos que se conocen en varias poblaciones de anfibios de Uruguay (Bardier *et al.*, 2010; Borteiro *et al.*, 2014; 2015; Galli *et al.*, 2006). Como en el caso de las larvas, en caso de ser necesario el transporte de ejemplares posmetamórficos, es importante que sean transportados con agua y vegetación del lugar. En todos los casos, es importante que el transporte se realice a una temperatura adecuada (si es posible en el entorno de los 12°C) y tomando las precauciones necesarias para evitar no sólo el recalentamiento de los ejemplares sino su deshidratación y aplastamiento (Poole & Grow, 2012).

Los métodos de eutanasia recomendados para anfibios implican una anestesia previa. Esta anestesia puede realizarse con una aplicación tópica en la región ventral de una pomada con lidocaína. Una vez realizada esa aplicación, para la eutanasia de anfibios posmetamórficos se pueden usar barbitúricos. Un método utilizado con frecuencia es la aplicación de una dosis de 1 ml por cada 100 g de masa, de Tiopental Sódico a una concentración de 0,025 g/ml (la presentación comercial suele ser adquirida en frascos de 1 g al que se adicionan 40 ml de agua destilada). La eutanasia de larvas puede realizarse por inmersión en una solución de benzocaína o de eugenol (aceite de clavo), previa aplicación tópica de lidocaína.

Algunos ejemplos de estudios con anfibios

Hace más de un cuarto de siglo que los anfibios son reconocidos como un grupo zoológico fuertemente afectado por la crisis global de la biodiversidad. Casi un tercio de las especies conocidas se encuentran amenazadas (Stuart *et al.*, 2004) y más de 500 especies experimentan descensos significativos a causa de patógenos de distribución global (Scheele *et al.*, 2019). Eso ha motivado a que se desarrollen técnicas menos invasivas para su estudio. A modo de ejemplo, los estudios que implicaban marcar animales se realizaban usando tatuajes (Daugherty, 1976) o amputando falanges (Heyer *et al.*, 1994) y poco a poco han sido complementados o sustituidos por el uso de elastómeros (Nauwelaerts *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2008), transpondedores (Ireland *et al.*, 2003; Pyke, 2005) y, más recientemente, por la fotoidentificación de marcas naturales (Elgue *et al.*, 2014; Bardier *et al.*, 2017).

Hasta hace unos pocos años, la forma más frecuente para realizar trabajos de dieta de anfibios era utilizar el análisis de contenidos gastrointestinales (Da Rosa *et al.*, 2002; Maneyro *et al.*, 2004; Maneyro & Da Rosa, 2004; Berazategui *et al.*, 2007). Recientemente, los isótopos estables son una alternativa interesante para conocer algunos aspectos de la ecología trófica de estos animales, aunque, al igual que los análisis gastrointestinales, pueden implicar el sacrificio de un buen número de ejemplares. Hace algunos años se propuso como alternativa la utilización del lavaje estomacal o *stomach-flushing* (Figura 4), que consiste en

inyectar a través de una cánula un volumen de agua en el tubo digestivo, y recoger los productos de la regurgitación (Patto, 1998). Esta técnica ha sido utilizada con éxito en varias especies (Solé *et al.*, 2005; 2009), incluso algunas de pequeño tamaño (Solé *et al.*, 2002; Dietl *et al.*, 2009; Bortolini *et al.*, 2013). Sin embargo, la manipulación compleja puede comprometer la sobrevivencia de los ejemplares y, por ese motivo, al trabajar con especies amenazadas o demasiado pequeñas, puede ser recomendable el uso de técnicas menos invasivas. En ese sentido, se ha utilizado con éxito el análisis de fecas, para casos como el de *Melanophryniscus montevidensis*. Para ello, los ejemplares se capturan y se colocan en recipientes individuales por algunas horas; y una vez que defecan los animales pueden devolverse al medio. Debido a que se trata de especies principalmente formicívoras, la determinación taxonómica de las presas es relativamente viable, ya que sus exoesqueletos se encuentran casi intactos en las fecas (Maneyro, obs. pers.).



Figura 4. Aplicación de la técnica de *stomach-flushing* (Foto: Ernesto Elgue).

También los estudios de biología reproductiva implicaban, hasta hace pocos años, el sacrificio de especímenes para conocer parámetros como la inversión reproductiva o la fecundidad (Camargo *et al.*, 2005; 2008; Maneyro *et al.*, 2008). El análisis gonadal actualmente se utiliza principalmente basado en ejemplares de colección, ya que, si se encuentran bien preservados, mantienen las características necesarias para este tipo de estudios (Pereira & Maneyro, 2012; Valdez & Maneyro, 2016; Elgue & Maneyro, 2017). No obstante, la generalización de la fotografía digital y la necesidad de buscar herramientas alternativas para la obtención de este tipo de datos, estimuló el desarrollo de métodos de estudio que

no comprometieran la sobrevivencia del animal. En este sentido, una forma de analizar la fecundidad en anfibios es colectar las parejas en amplexo y, una vez que desovan, acomodar los huevos en una monocapa, fotografíarlos con una escala y a partir de esas imágenes obtener la fecundidad o calcular el volumen de las puestas (Pereira & Maneyro, 2017).

En resumen, para este grupo de vertebrados se nota una preocupación creciente por desarrollar técnicas de trabajo alternativas que, sin comprometer la calidad de los resultados, mitiguen el estrés o incluso el sacrificio de especímenes. El desarrollo de este tipo métodos innovadores contribuye no sólo a favorecer la preservación de las poblaciones naturales, sino que tienen un fuerte componente educativo hacia la comunidad académica que derrama hacia toda la sociedad, y en el que se pueden encontrar las claves para que las personas se relacionen con la fauna en forma responsable y respetuosa.

Referencias

- Bardier C, Ghirardi R, Levy M, Maneyro R. 2011. First case of chytridiomycosis in an adult specimen of native anurans from Cerro Verde (Uruguay). *Herpetological Review* 42: 65-66.
- Bardier C, Pereira G, Elgue E, Maneyro R, Toledo LF. 2017. Quantitative determination of the minimum body size for photo-identification of *Melanophryniscus montevidensis* (Bufonidae). *Herpetological Conservation and Biology* 12:119-126.
- Berazategui M, Camargo A, Maneyro R. 2007. Environmental and seasonal variation in the diet of *Elachistocleis bicolor* (Guérin-Méneville 1838) (Anura: Microhylidae) from northern Uruguay. *Zoological Science* 24: 225-231.
- Borteiro C, Cruz J C, Kolenc F, Verdes J M, Moraña A, Martínez-Debat C, Kun A, Ubilla M, Okada K. 2014. Dermocystid-chytrid coinfection in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *Journal of Wildlife Diseases* 50: 150-153.
- Borteiro C, Verdes J M, Cruz J C, Sabalsagaray M J, Kolenc F, Martínez Debat C, Ubilla M. 2015. *Ichthyophonus* sp. (Ichthyophonae, Ichthyophonida) Infection in a South American Amphibian, the Hylid frog *Hypsiboas pulchellus*. *Journal of Wildlife Diseases* 51: 530-533.
- Bortolini SV, Maneyro R, Achaval-Coppes F, Zanella N. 2013. Diet of *Melanophryniscus devincenzii* (Anura: Bufonidae) from Parque Municipal de Sertão, Rio Grande do Sul, Brazil. *The Herpetological Journal* 23: 115-119.
- Cacciali P. 2013. Colecta y preparación de anfibios y reptiles. Manual para colecta científica. Editorial Académica Española, Staarbrücken.
- Camargo A, Naya D E, Canavero A, da Rosa I, Maneyro R. 2005. Seasonal activity and the body size - fecundity relationship in a population of *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura, Leptodactylidae) from Uruguay. *Annales Zoologici Fennici* 42: 513-521.

- Camargo A, Sarroca M, Maneyro R. 2008. Reproductive effort and the egg number vs. size trade-off in *Physalaemus* frogs (Anura: Leiuperidae). *Acta Oecologica* 34: 163-171.
- Da Rosa I, Canavero A, Maneyro R, Naya D E, Camargo A. 2002. Diet of four sympatric anuran species in a temperate environment. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay* 13: 12-20.
- Daugherty C H. 1976. Freeze-branding as a technique for marking anurans. *Copeia* 4:836-838.
- Dietl J, Engels W, Solé M. 2009. Diet and feeding behaviour of the leaf-litter frog *Ischnocnema henselii* (Anura: Brachycephalidae) in Araucaria rain forests on the Serra Geral of Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal of Natural History* 43: 1473-1483.
- Elgue E, Pereira G, Achaval-Coppes F, Maneyro R. 2014. Validity of Photo-Identification Technique to analyze natural marks in *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). *Phyllomedusa: Journal of Neotropical Herpetology* 13(1): 59-66.
- Elgue E, Maneyro R. 2017. Reproductive biology in a Uruguayan population of *Elachistocleis bicolor* (Guérin-Meneville, 1838) (Anura, Microhylidae). *Cuadernos de Herpetología* 31:5-10.
- Frost, D R. 2019. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 (Date of access). Electronic Database accessible at American Museum of Natural History, New York, USA.
- Galli L, Pereira A, Márquez A, Mazzoni R. 2006. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture* 257:78-82.
- Heyer W R, Donnelly M A, McDiarmid R W, Hayek L C, Foster M S. 1994. Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington DC.
- Hoffmann K, McGarrity M E, Johnson S A. 2008. Technology meets tradition: A combined VIE-C technique for individually marking anurans. *Applied Herpetology* 5:265-280.
- Ireland D, Osbourne N, Berrill M. 2003. Marking medium-to large-sized anurans with passive integrated transponder (PIT) tags. *Herpetological Review* 34:218-220.
- Maneyro R, Carreira, S. 2012. Guía de Anfibios del Uruguay. Ediciones de la Fuga, Montevideo.
- Maneyro R, Da Rosa I. 2004. Temporal and spatial changes in the diet of *Hyla pulchella* Duméril and Bibron, 1841 (Anura: Hylidae) in Southern Uruguay. *Phyllomedusa: Journal of Neotropical Herpetology* 3:101-114.
- Maneyro R, Loebmann D, Tozetti A, da Fonte L F M. 2017. Anfíbios das planícies costeiras do extremo sul do Brasil e Uruguai. Anolis Books, Curitiba.
- Maneyro R, Naya D, Da Rosa I, Canavero A, Camargo A. 2004. Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia: Anura). *Iheringia (Sér. Zool.)* 94:57-61.
- Maneyro R, Núñez D, Borteiro C, Tedros M, Kolenc F. 2008. Advertisement call and female sexual cycle in Uruguayan populations of *Physalaemus henselii* (Peters, 1872) (Anura: Leptodactylidae). *Iheringia (Sér. Zool.)* 98: 210-214.

- McDiarmid R W, Altig R. 1999. Research: Materials and Techniques. In R W McDiarmid & R. Altig (eds), Tadpoles: the biology of anuran larvae. The University of Chicago Press, Chicago and London: 7-23.
- Nauwelaerts S, Coeck J, Aerts P. 2000. Visual implant elastomer as a method for marking adult anurans. *Herpetological Review* 31:154-155.
- Patto CEG. 1998. A simple stomach flushing method for small frogs. *Herpetological Review* 29: 156-157.
- Pereira G, Maneyro R. 2012. Size-fecundity relationships and reproductive investment in females of *Physalaemus riograndensis* Milstead, 1960 (Anura, Leiuperidae) in Uruguay. *The Herpetological Journal* 22:145-150.
- Pereira G, Maneyro R. 2017. Reproductive biology of *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae) from Uruguay: reproductive effort, fecundity, sex ratio and sexual size dimorphism. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **53**: 10-21.
- Poole V A, Grow S. (eds.). 2012. Amphibian husbandry resource guide, Edition 2,0. Association of Zoos and Aquariums, Silver Spring.
- Pyke G H. 2005. The use of PIT tags in capture-recapture studies of frogs: a field evaluation. *Herpetological Review* 36: 281-285.
- Scheele, B C , F Pasmans, L Berger, L F Skerratt, A Martel, W Beukema, A A Acevedo, P A Burrows, T Carvalho, A Catenazzi, I De la Riva, M C Fisher, S V Flechas, C N Foster, P Frías-Álvarez, T W J Garner, B Gratwicke, J M Guayasamin, M Hirschfeld, J E Kolby, T A Kosch, E La Marca, D B Lindenmayer, K R Lips, A V Longo, R Maneyro, C A McDonald, J Mendelson III, P Palacios-Rodriguez, G Parra-Olea, C L Richards-Zawacki, M O Rödel, S M Rovito, C Soto-Azat, L F Toledo, J Voyles, C Weldon, S M Whitfield, M Wilkinson, K R Zamudio & S Canessa. 2019. The aftermath of an amphibian fungal panzootic reveals unprecedented loss of biodiversity. *Science* 363: 1459-1463.
- Stuart S, J Chanson, N Cox, B Young, A Rodrigues, D Fischman & R Waller. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783-1786.
- Solé M, Beckmann O, Pelz B, Kwet A, Engels W. 2005. Stomach-flushing for diet analysis in anurans: an improved protocol evaluated in a case study in *Araucaria* forests, southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 40: 23-28.
- Solé M, Dias I R, Rodrigues E A S, Marciano E, Branco S M J, Cavalcante K P, Rödder D. 2009. Diet of *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) from a cacao plantation in southern Bahia, Brazil. *Herpetology Notes*, 2: 9-15.
- Solé M., Ketterl J, Di-Bernardo M, Kwet A. 2002. Ants and termites are the diet of the microhylid frog *Elachistocleis ovalis* (Schneider, 1799) at an *Araucaria* forest in Rio Grande do Sul, Brazil. *Herpetological Bulletin* 79: 14-17.
- Valdez V, Maneyro R. 2016. Reproductive biology of *Odontophrynus americanus* females (Duméril & Briçon, 1841) (Anura, Cycloramphidae) from Uruguay. *PanAmerican Journal of Aquatic Sciences* 11: 188-197.

CAPÍTULO 7

Métodos alternativos para el estudio de anfibios en campo: bioacústica en anuros desde los organismos a las comunidades

Lucía Ziegler¹- Andrés Canavero²

De la bioacústica a la ecología de anuros

¿Cómo se estudian las poblaciones y comunidades de animales silvestres tratando de reducir al mínimo nuestra interferencia en su vida cotidiana? A los científicos se nos presenta constantemente el desafío de buscar un equilibrio entre la necesidad de obtener nueva información y el deber ético de reducir al mínimo nuestra interferencia sobre los organismos y/o sistemas que estamos tratando de conocer, comprender y muchas veces proteger (May, 2004; Dodd Jr., 2010; Gilbert *et al.*, 2012). Esta es la razón por la cual en trabajos con los más diversos enfoques se buscan métodos no invasivos para estudiar los animales en su entorno natural (Pidancier *et al.*, 2003; Sherwin *et al.*, 2003; Brinkman *et al.*, 2010; Hamel *et al.*, 2013; Krause y Farina, 2016).

En particular, el sonido es ampliamente utilizado por los animales para comunicarse en diversos contextos (Bradbury & Vehrencamp, 2011; Krause, 2012; 2015). La emisión de señales acústicas utiliza un canal de comunicación muy eficaz porque, a diferencia de la luz (canal visual), es difícil de bloquear y, a diferencia del olor (u otras señales químicas), la señal puede ser activada y desactivada fácilmente (Endler, 1993; Bradbury & Vehrencamp, 2011). El uso de las señales acústicas como aproximación para estudiar diferentes aspectos del comportamiento y la ecología de los animales tiene ya cierta historia (Krause, 2015). Sin embargo, el uso sistemático de este tipo de datos, con técnicas fiables y accesibles para obtener información sobre la vida silvestre con sólo conocer los sonidos emitidos se ha vuelto un campo muy activo de trabajo en las últimas dos décadas (Krause & Farina, 2016). Para aquellos taxones que utilizan en su repertorio señales acústi-

-
- 1 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, Udelar. Uruguay
lucia.ziegler@cure.edu.uy
 - 2 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, Udelar. Uruguay
acanavero@gmail.com

cas conspicuas, el registro de dichas señales es una manera eficiente de obtener datos individuales, poblacionales y comunitarios, a partir de los cuales obtener estimativos de ocurrencia, patrones de actividad y de abundancia (Dorcas *et al.*, 2009).

En este sentido, en los anuros, las señales acústicas juegan un rol fundamental en la comunicación (Pough *et al.*, 1992; Gerhardt & Huber, 2002). Estas señales especie-específicas son emitidas principalmente por los machos para atraer a las hembras, delimitar territorios, como señal agonística entre machos o como señales de reconocimiento entre individuos coespecíficos (Ryan, 2001; Gerhardt & Huber, 2002; Wells, 2007). Las vocalizaciones más conspicuas, aquellas que se pueden oír por las noches como grandes coros, generalmente cerca de cuerpos de agua, pertenecen al primer tipo (señales para atracción de las hembras), también llamadas cantos de anuncio o cantos nupciales. Debido a su papel central en la reproducción, se sostiene que los cantos de anuncio deben estar sujetos a una fuerte selección sexual (Gerhardt, 1994; Chek *et al.*, 2003). Por otra parte, estas señales pueden ser utilizadas por otros organismos “espía”: potenciales depredadores y parásitos, que pueden aprovecharlas como una guía hacia sus presas (Page & Ryan, 2005; Bernal *et al.*, 2007). Otra característica importante de los cantos de anuncio es el alto costo energético que en general representan para estos organismos (Pough *et al.*, 1992; Prestwich, 1994; Mc Lister, 2001; Wells, 2007). Todas estas características hacen de los cantos de los anuros un excelente modelo de estudio en diversas áreas y niveles de organización, desde organismos a ecosistemas. Estos cantos especie-específicos proveen de un sustrato eficaz para estudiar y evaluar el estado de las poblaciones de anuros (Dorcas *et al.*, 2009). En particular, el canto reproductivo de los anfibios anuros ha sido usado como indicador de actividad reproductiva y ampliamente utilizado para monitorear la actividad de las comunidades de anuros (Weir & Mossman, 2004; Dorcas *et al.*, 2009).

Existen básicamente dos grupos de técnicas para obtener datos sobre la biología de los anfibios anuros a través de sus vocalizaciones. Cada técnica tiene sus puntos fuertes y débiles, dependiendo de la pregunta a responder, la escala espacial y/o temporal de abordaje, y el presupuesto con el que contamos, entre otros factores (Dorcas *et al.*, 2009; Digby *et al.*, 2013; Merchant *et al.*, 2015). En primer lugar, las técnicas manuales o activas incluyen los muestreos auditivos, así como la utilización de grabaciones manuales. Este enfoque es el predominante cuando se abordan preguntas a nivel individual o poblacional (*e. g.* ecología del comportamiento, ecofisiología), aunque también ha sido ampliamente utilizado en estudios de abundancia y diversidad de especies (Aichinger, 1987; Bertoluci, 1998; Both *et al.*, 2008). Son posiblemente las que tienen más representación en la literatura hasta el momento, dado que solo requieren del conocimiento de la identidad específica de las señales acústicas y se pueden llevar a cabo aun sin necesidad de soporte tecnológico, o con técnicas de grabación estándar (*e. g.*

Crump, 1974; Aichinger, 1987; Santos *et al.*, 2008) (Fig. 1). En segundo lugar, se encuentran las técnicas pasivas de grabación de señales acústicas de poblaciones naturales (Dorcas *et al.*, 2009). Éstas son cada vez más sofisticadas, pero, a la vez accesibles, permitiendo el monitoreo continuo, abarcando escalas temporales que hasta hace poco tiempo eran impensadas (Dorcas *et al.*, 2009; Blumstein *et al.*, 2011). Asimismo, el uso de arreglos espaciales de grabadores asociados permite cubrir distintas escalas del paisaje (Saenz *et al.*, 2006; Schalk y Saenz, 2016).

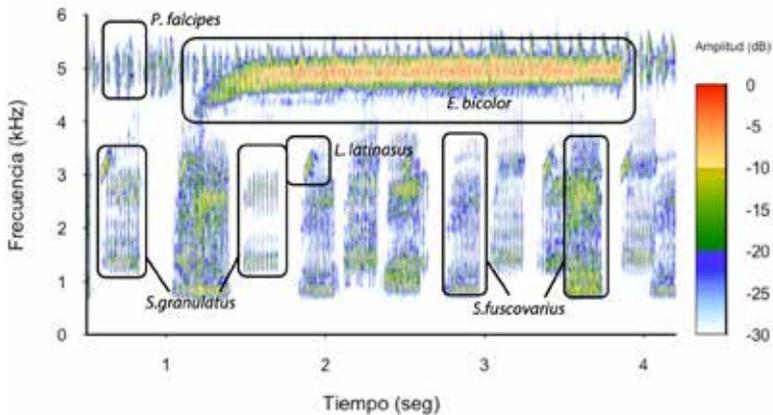


Figura 1 Espectrograma de un paisaje sonoro. Registro de sonido de un charco del Valle del Lunarejo, Rivera, Uruguay, realizado el 26/12/2012 a las 23:00. Se recuadran e identifican los distintos cantos de cinco especies de anuros autóctonos. *E. bicolor* = *Elachistocleis bicolor*, *L. latinasus* = *Leptodactylus latinasus*, *P. falcipes* = *Pseudopaludicola falsipes*, *S. granulatus* = *Scinax granulatus*, *S. fuscovarius* = *Scinax fuscovarius*.

En este capítulo nos centramos en la utilización de datos acústicos para el estudio de distintos aspectos ecológicos de los anuros. Nuestro objetivo es proporcionar una descripción general de las técnicas que hemos utilizado en nuestros trabajos, así como las preguntas que pueden abordarse al usarlas.

Las características del ambiente y el estado fisiológico moldean el canto

Comprender las bases fisiológicas y ambientales de las estrategias de asignación de energía a la reproducción es un tema central en la biología (Karasov, 1986; Karasov y Martínez del Río, 2007). En el caso de los anuros (ranas y sapos), la selección sexual y la reproducción están fuertemente ligados a la emisión de cantos. Estos cantos tienen en general un alto costo energético para el emisor, y la variación en las características de estas señales suelen estar correlacionadas con variables tanto exógenas como endógenas (Pough *et al.*, 1992; Gerhardt y Huber, 2002; Wells, 2007). En particular, la temperatura ambiente, la estructura

del microhábitat o el contexto social son los principales ejemplos de las primeras, mientras que el tamaño corporal y el estado fisiológico de los individuos son los más representativos de las segundas (Gerhardt *et al.*, 1996; Gerhardt & Huber, 2002).

Nuestro trabajo se ha enfocado en explorar algunas de estas correlaciones utilizando como especie modelo a *Boana pulchella*. En primer lugar, nos interesaba saber si los machos al vocalizar podían mostrar plasticidad frente a ciertas características del microhábitat, en particular la temperatura y la densidad de la vegetación. La estructura del entorno que rodea la emisión de señales produce diferentes patrones de degradación y atenuación. Por lo tanto, se espera que los individuos que vocalizan ajusten las características de su canto para maximizar la propagación de la señal en el ambiente. Sin embargo, hasta ese momento la evidencia empírica acerca de la asociación entre la estructura de la vegetación y las características del canto en anuros presentaba resultados heterogéneos. Para poner a prueba la existencia de plasticidad ideamos un diseño experimental que nos permitiera variar el entorno de los individuos sin necesidad de manipularlos. El tratamiento consistió en una estructura con forma de cubo, sin base ni tapa, que se colocaba alrededor de un macho vocalizador. De esta forma se lograba el registro en condiciones naturales y también con un grado de atenuación deseado (Ziegler *et al.*, 2011). A través de análisis que estudian relaciones causales entre variables encontramos un fuerte efecto de la estructura del hábitat en los parámetros temporales del canto (las duraciones de los elementos, como ser notas o intervalos entre notas) y un efecto de la temperatura del sitio que condiciona el tamaño de los organismos que pueden encontrarse vocalizando activamente en cada sitio. Debido a que encontramos la relación inversa y significativa esperada entre tamaño corporal y frecuencia del canto, la temperatura tendría un efecto sobre esta última solo de manera indirecta. La modificación experimental del hábitat arrojó resultados consistentes con las observaciones de campo, destacando el potencial rol de la flexibilidad del canto en las características que observamos.

Una vez comprobada la existencia de flexibilidad, nos interesaba conocer más en detalle la naturaleza de esa respuesta. En particular, queríamos saber la forma de la norma de reacción del canto en un gradiente de atenuación (*e. g.* lineal, cuadrática, etc.) y si el estado fisiológico de los machos podría estar afectando la expresión de dicha flexibilidad. Utilizamos el mismo diseño experimental mencionado más arriba, pero con dos tratamientos de atenuación (alta y baja). Como resultado general de nuestro trabajo, volvimos a constatar que existe flexibilidad en respuesta a las características de propagación del ambiente y una interacción mayormente significativa con la condición corporal. La respuesta general de los individuos frente al tratamiento de baja atenuación fue congruente con un ajuste para maximizar la propagación de la señal frente a la atenuación del ambiente, presentando, además, interacción significativa con la condición corporal. Sin embargo, encontramos una respuesta no lineal cuando consideramos

el tratamiento de mayor atenuación. En este caso, los machos en vez de acentuar la respuesta que presentaron frente a la baja atenuación, en muchos casos relajaban el ajuste del canto (Ziegler, 2015; Ziegler *et al.*, 2018). Este resultado pone la atención en que la capacidad de los organismos de ajustar sus señales emerge como un fenómeno complejo, no sólo como compensación a la degradación de las señales, sino integrando otras claves ambientales, e influida por la condición fisiológica del organismo.

Por otra parte, nos interesaba explorar en general las bases fisiológicas y ecológicas de la estructura del canto en los anuros. Si bien existen muchos trabajos que abordan la relación entre las características del canto y algunos de estos factores, son llamativamente pocos los que han abordado el efecto simultáneo de todos estos factores. Tomando como base una teoría cuantitativa para la comunicación acústica que fue propuesta recientemente (Gillooly & Ophir, 2010), que conecta el metabolismo con la estructura de las señales acústicas, nos propusimos analizar el escalamiento con la masa, temperatura, y la condición corporal de los atributos del canto de anuncio de *B. pulchella* (Ziegler *et al.*, 2016). De esta forma fuimos los primeros en poner a prueba en ecología del comportamiento las predicciones derivadas de una teoría macroecológica al nivel poblacional. Encontramos que la dependencia de la frecuencia dominante (cuán agudo o grave es el canto) con la masa siguió una relación negativa: animales más grandes emiten cantos más graves. Si bien este patrón es el esperado por un escalamiento metabólico, el mismo patrón podría explicarse simplemente por una relación alométrica no metabólica (las propiedades de resonancia de los órganos implicados en la generación del canto). Por otra parte, la duración de los elementos del canto escaló con la masa inversamente a las expectativas metabólicas, en consonancia con los datos empíricos intraespecíficos habitualmente reportados. En cuanto a la dependencia de la temperatura, la mayoría de los atributos del canto siguió predicciones metabólicas a pesar de una considerable variación en la energía de activación calculada. Esta energía de activación mide la “sensibilidad térmica” de estos atributos. Por último, la condición corporal apareció como un factor determinante de las características del canto, en interacción con la temperatura o la masa, lo que indica que la pendiente de muchas de las relaciones antes mencionadas es dependiente de la condición o estado fisiológico de los organismos (Ziegler *et al.*, 2016, Ziegler *et al.*, 2018).

Como resumen de esta primera parte, trabajar con los cantos nos permitió abordar empíricamente ciertos aspectos de la ecología del comportamiento y la ecofisiología de los anuros que normalmente se abordan a través de diseños experimentales en laboratorio, con equipamiento y tecnologías costosas. Abordamos la dependencia metabólica del canto a través del contraste de nuestros datos con modelos teóricos propuestos (Gillooly *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2004; Gillooly & Ophir, 2010) y exploramos la norma de reacción del canto frente a la atenuación del microambiente en campo, algo que, según nuestra información,

solo hay otro estudio que lo ha hecho en anuros y para un único individuo (Lardner & bin Lakim, 2002).

Nos parece importante resaltar que además de proporcionar resultados valiosos en sí mismos, esta aproximación también puede complementar o servir como puntapié a estudios más detallados tanto en campo como en laboratorio.

Fenologías comunitarias de anuros: ¿cuándo y por qué cantan?

Hemos intentado comprender la conexión entre los factores y condiciones abióticas y la estructura y funcionamiento de las comunidades biológicas, así como predecir posibles efectos del cambio climático. Para ello hemos utilizado las comunidades de anuros como modelo. Las ventajas que presentan estos organismos como modelo de estudio de comunidades son: a) son un grupo zoológico que presenta una fuerte dependencia de las condiciones y factores ambientales para completar su ciclo de vida y, por lo tanto, los cambios en estas condiciones y factores van a afectar distintos aspectos de sus ciclos de vida a distintos niveles de organización (*e. g.* individuos, poblaciones, comunidades); b) presentan poblaciones abundantes y comunidades diversas; y c) su actividad puede registrarse de forma indirecta a través de su conspicuo canto nupcial.

Uno de los primeros objetivos que nos planteamos fue describir los patrones fenológicos de una comunidad de anuros del sur de Uruguay. Para ello decidimos realizar muestreos auditivos manuales en el Arroyo Espinas, al sur del departamento de Maldonado, Uruguay. Allí durante dos años (1998-2000) recorrimos, dos noches consecutivas por mes, siete sitios de reproducción de anuros (*e. g.* cañada cubierta por vegetación, cañada descubierta, embalses, posas y praderas inundables) realizando muestreos auditivos manuales de 15 minutos entre las 21:00 y la 1:00 hs (Canavero *et al.*, 2008). Utilizando esta metodología identificamos el número de especies que presentaba actividad de canto a lo largo de los meses, también denominada fenología del canto de los anuros. Fenologías son los patrones anuales de algún atributo de historia de vida, fenómeno estudiado desde los primeros años del siglo XIX en el Jardín del Observatorio Real de Bruselas, donde Adolphe Quetelet comenzó con su estudio y Charles Morren acuñó el término “fenología” (Demarée & Rutishauser, 2011).

Una vez descrita la fenología del canto exploramos la posible conexión con dos variables relevantes para los anuros, como lo son la temperatura ambiental y la lluvia. Los anuros son ectotermos, de reproducción acuática y piel desnuda lo que hace que estas dos variables deban resultar relevantes para su actividad (Wells, 2007). Al comparar los efectos independientes y combinados de la temperatura y la lluvia sobre el número de especies de anuros que cantaban a lo largo del año, encontramos que un modelo sinusoidal que solo incluye el mes como variable dependiente (*i. e.* tiempo, momento del año) era el mejor descrip-

tor (Canavero *et al.*, 2008). Combinando este resultado con lo observado por investigadores del Departamento de Biología, Universidad Federal de Santa María, Rio Grande do Sul, Brasil, propusimos que las fenologías de canto están regidas por el fotoperíodo y ciclos endógenos (Both *et al.*, 2008; Canavero & Arim, 2009).

En este contexto, surgió la inquietud de reconocer qué rol cumpliría la temperatura, dado que los anuros son vertebrados ectotermos. Aquí apelamos a modelos deductivos desarrollados en el marco de la Teoría Metabólica de la Ecología (Brown *et al.*, 2004; Sibly *et al.*, 2012). Estos fueron desarrollados para predecir la distribución de la riqueza de especies en el espacio conociendo la temperatura promedio del sitio (*e. g.* Allen *et al.*, 2002), así que nosotros los utilizamos por primera vez para predecir el número de especies de anuros que cantan en un mes determinado (Canavero *et al.*, 2018). En este contexto, reportamos que existe una dependencia térmica para el canto y que ésta se hace más débil a medida que nos alejamos de las zonas tropicales.

Otra pregunta que surgió de estos análisis se vinculó con la estructura de las comunidades y el uso del tiempo como recurso (Schoener, 1974; Jaksić, 1982; Kronfeld-Schor & Dayan, 2003). En este sentido, apelamos a métricas desarrolladas para cuantificar la estructura de las comunidades en el uso del espacio, como lo son el anidamiento y la coocurrencia (Ulrich & Gotelli, 2007; Almeida-Neto *et al.*, 2008), las que aplicamos para cuantificar la estructura comunitaria en el uso del tiempo reportando estructuración significativa (Canavero *et al.*, 2009; 2018; 2019). Los patrones de anidamiento de la actividad de vocalización de los anuros sobre los meses podrían reflejar un filtrado ambiental que hiciera que su actividad se centrara sobre los meses cálidos. Mientras que el patrón significativo de segregación reflejaría la presencia de interacciones negativas entre distintos grupos de especies. Otro avance interesante fue haber podido reportar patrones latitudinales en las fenologías comunitarias de anuros neotropicales utilizando métricas de estructura filogenética, del uso del tiempo, en la dependencia térmica asociadas a condiciones ambientales (Canavero *et al.*, 2009, 2018; 2019).

Las tres erres: reemplazar, reducir y refinar

De esta manera, y en el contexto de la aplicación de principios de ética científica para la investigación con Animales No Tradicionales de Experimentación (ANTE), como lo son los anuros (Gilbert *et al.*, 2012), intentamos reemplazar la colecta de animales por el uso de técnicas indirectas y no invasivas para la estimación de la actividad de las poblaciones y comunidades de anfibios anuros. El canto de los anuros es especie-específico, permitiendo detectar y reconocer a las especies sin la necesidad de interrumpir o distorsionar su actividad en el campo (Heyer *et al.*, 1994; Dorcas *et al.*, 2009). También utilizamos modelos matemáticos que permitieron, a partir de métodos inductivos y deductivos, conocer aspectos

de la historia de vida, estructura de comunidades o funcionamiento ecosistémico (Canavero & Arim, 2009; Ziegler *et al.*, 2011; 2016; Canavero *et al.*, 2018; 2019).

Con el fin de reducir el número de animales colectados en su hábitat utilizamos técnicas no invasivas a través del canto de los anuros para su detección las cuales eliminan la necesidad de colecta de organismos. Es así que con estas técnicas se han realizado una serie de trabajos a nivel de organismos (*e. g.* plasticidad fenotípica del canto, Ziegler *et al.*, 2011; Ziegler, 2015) y a nivel comunitario (*e. g.* estructura fenológica de comunidades, Canavero *et al.*, 2008). También, compilando información, se generó una base de datos con la cual se analizaron patrones macroecológicos (Canavero & Arim, 2009; Ziegler *et al.*, 2011; 2016; Canavero *et al.*, 2018; 2019).

Hasta el momento hemos basado nuestros estudios en metodologías activas de trabajo con señales acústicas, mediante la presencia del investigador en campo, ya sea a través de la pericia para reconocer el canto de las diferentes especies *in situ*, o mediante grabaciones directas de las especies presentes. Actualmente nos encontramos recorriendo el camino de refinar estas técnicas de muestreo utilizando grabadores automáticos que permanecen en los sitios de monitoreo y hacen un registro programado según una rutina pautada por el diseño experimental deseado (Blumstein *et al.*, 2011; Schalk & Saenz, 2016). Estos permiten: a) aumentar el tiempo de colecta de datos, el cual es muy acotado si los observadores tienen que estar presentes en el sitio; b) incorporar otra información como contaminación sonora y sus efectos putativos sobre el funcionamiento ecosistémico, c) acoplados a otras herramientas de registro continuo de variables abióticas (*e. g.* temperatura, humedad, incidencia de luz solar), se pueden generar valiosas bases de datos con información transversal a diversas escalas temporales y a numerosos taxones que, al igual que los anuros, se basan principalmente en las señales acústicas para su comunicación.

Referencias

- Aichinger M. 1987. Annual activity patterns of anurans in a seasonal neotropical environment. *Oecologia* 71:583-592.
- Allen A P, Brown J H, Gillooly J F. 2002. Global biodiversity, biochemical kinetics, and the energetic-equivalence rule. *Science* 297:1545-1548.
- Almeida-Neto M, Guimaraes P, Guimaraes P R, Loyola RD, Ulrich W. 2008. A consistent metric for nestedness analysis in ecological systems: reconciling concept and measurement. *Oikos* 117:1227-1239.
- Bernal X E, Page R A, Rand A S, Ryan M J. 2007. Cues for eavesdroppers: do frog calls indicate prey density and quality? *Am. Nat.* 169:409-415.
- Bertoluci J. 1998. Annual patterns of breeding activity in Atlantic rainforest anurans. *J. Herpetol.* 32:607-611.

- Blumstein D T, Mennill D J, Clemins P, Girod L, Yao K, Patricelli G, Deppe J L, Krakauer A H, Clark C, *et al.* 2011. Acoustic monitoring in terrestrial environments using microphone arrays: applications, technological considerations and prospectus. *J. Appl. Ecol.* 48:758-767.
- Both C, Kaefer Í L, Santos T G, Cechin S T. 2008. An austral anuran assemblage in the Neotropics: seasonal occurrence correlated with photoperiod. *J. Nat. Hist.* 42:205-222.
- Bradbury J W, Vehrencamp S L. 2011. Principles of animal communication. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Brinkman T J, Person D K, Schwartz M K, Pilgrim K L, Colson K E, Hundertmark K J. 2010. Individual identification of Sitka black-tailed deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets. *Conserv. Genet. Resour.* 2:115-118.
- Brown J H, Gillooly J F, Allen A P, Savage V M, West G B. 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85:1771-1789.
- Canavero A, Arim M. 2009. Clues supporting photoperiod as the main determinant of seasonal variation in amphibian activity. *J. Nat. Hist.* 43:2975-2984.
- Canavero A, Arim M, Brazeiro A. 2009. Geographic variations of seasonality and coexistence in communities: The role of diversity and climate. *Austral Ecol.* 34:741-750.
- Canavero A, Arim M, Naya D E, Camargo A, da Rosa I, Maneyro R. 2008. Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. *North-West. J. Zool.* 4:29-41.
- Canavero Andrés, Matías Arim, Fernanda Pérez, Fabián M. Jaksic, Pablo A. Marquet. 2019. Phenological modularity in amphibian calling behavior: geographic trends and local determinants. *Austral Ecology*. doi.org/10.1111/aec.12819
- Canavero A, Arim M, Pérez F, Jaksic F M, Marquet P A. 2018. A metabolic view of amphibian local community structure: the role of activation energy. *Ecography* 41:388-400.
- Chek A A, Bogart J P, Loughheed S C. 2003. Mating signal partitioning in multi-species assemblages: a null model test using frogs. *Ecol. Lett.* 6:235-247.
- Crump M L. 1974. Reproductive Strategies in a Tropical Anuran Community.
- Demarée G R, Rutishauser T. 2011. From “periodical observations” to “Anthochronology” and “Phenology”—the scientific debate between Adolphe Quetelet and Charles Morren on the origin of the word “Phenology”. *Int. J. Biometeorol.* 55:753-761.
- Digby A, Towsey M, Bell B D, Teal P D. 2013. A practical comparison of manual and autonomous methods for acoustic monitoring. *Methods Ecol. Evol.* 4:675-683.
- Dodd Jr. C K. 2010. Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques. Oxford University Press. Available from: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=5qcVDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Amphibian+Ecology+and+Conservation&ots=O3oQ36eAFr&sig=mICszLOnkLqJMWVG8TykksqKu0>
- Dorcas M E, Price S J, Walls S C, Barichivich S J. 2009. Auditory monitoring of anuran population. En: Dodd K, editor. Conservation and ecology in amphibians. Oxford, UK: Oxford University Press. pp 281-298.

- Endler J A. 1993. Some General Comments on the Evolution and Design of Animal Communication Systems. *Philos. Trans. Biol. Sci.* 340:215-225.
- Gerhardt H C. 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25:293-324.
- Gerhardt H C, Dyson M L, Tanner S D. 1996. Dynamic properties of the advertisement calls of gray tree frogs: patterns of variability and female choice. *Behav. Ecol.* 7:7-18.
- Gerhardt H C, Huber F. 2002. *Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions.* Chicago: The University of Chicago Press.
- Gilbert S, Kaebnick G E, Murray T H. 2012. *Animal research ethics: evolving views and practices.* Hastings Center.
- Gillooly J F, Brown J H, West G B, Savage V M, Charnov E L. 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293:2248-2251.
- Gillooly J F, Ophir A G. 2010. The energetic basis of acoustic communication. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277:1325-1331.
- Hamel S, Killengreen S T, Henden J-A, Eide N E, Roed-Eriksen L, Ims R A, Yoccoz N G. 2013. Towards good practice guidance in using camera-traps in ecology: influence of sampling design on validity of ecological inferences. *Methods Ecol. Evol.* 4:105-113.
- Heyer W R, Donnelly M A, McDiarmid R W, Hayek L-A C, Foster M S, others. 1994. *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians.* Smithsonian Institution Press. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20087208625.html>
- Jaksić F M. 1982. Inadequacy of activity time as a niche difference: the case of diurnal and nocturnal raptors. *Oecologia* 52:171-175.
- Karasov W H. 1986. Energetics, physiology and vertebrate ecology. *Trends Ecol. Evol.* 1:101-104.
- Karasov W H, Martínez del Río C. 2007. *Physiological ecology: how animals process energy, nutrients, and toxins.* Princeton, NJ [etc.]: Princeton University Press.
- Krause B. 2012. *The great animal orchestra: finding the origins of music in the world's wild places.* Little, Brown.
- Krause B. 2015. *Voices of the wild: Animal songs, human din, and the call to save natural soundscapes.* Yale University Press. Available from: https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=OKxJCgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=%22the+great+animal+orchestra%22&ots=0z0YyaZGO7&sig=1_K08r5RgWKWPDitDENyJ66bo
- Krause B, Farina A. 2016. Using ecoacoustic methods to survey the impacts of climate change on biodiversity. *Biol. Conserv.* 195:245-254.
- Kronfeld-Schor N, Dayan T. 2003. Partitioning of time as an ecological resource. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*:153-181.
- Lardner B, bin Lakim M. 2002. Tree-hole frogs exploit resonance effects. *Nature* 420:475.
- May R M. 2004. Ecology: ethics and amphibians. *Nature* 431:403-403.

- McLister J D. 2001. Physical factors affecting the cost and efficiency of sound production in the treefrog *Hyla versicolor*. *J. Exp. Biol.* 204:69-80.
- Merchant N D, Fristrup K M, Johnson M P, Tyack P L, Witt M J, Blondel P, Parks S E. 2015. Measuring acoustic habitats. *Methods Ecol. Evol.* 6:257-265.
- Page R A, Ryan M J. 2005. Flexibility in assessment of prey cues: frog-eating bats and frog calls. *Proc. R. Soc. B* 272:841-847.
- Pidancier N, Miquel C, Miaud C. 2003. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *Herpetol. J.* 13:175-178.
- Pough F H, Magnusson W E, Ryan M J, Wells K D, Taigen T L. 1992. Behavioral energetics. En: Feder M E, Burggren W W, editores. *Environmental physiology of the amphibians*. Chicago: University of Chicago Press. pp 395-436.
- Prestwich K N. 1994. The energetics of acoustic signaling in anurans and insects. *Am. Zool.* 34:625-643.
- Ryan M J. 2001. *Anuran communication*. Smithsonian Institution Press.
- Saenz D, Fitzgerald L A, Baum K A, Conner R N, Adams D. 2006. Abiotic correlates of anuran calling phenology: the importance of rain, temperature, and season. *Herpetol. Monogr.* 20:64-82.
- Santos T G dos, Kopp K, Spies M R, Trevisan R, Cechin S Z. 2008. Distribuição temporal e espacial de anuros em área de Pampa, Santa Maria, RS. *Iheringia Sér. Zool.*:244-253.
- Schalk C M, Saenz D. 2016. Environmental drivers of anuran calling phenology in a seasonal Neotropical ecosystem. *Austral Ecol.* 41:16-27.
- Schoener T W. 1974. The compression hypothesis and temporal resource partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71:4169-4172.
- Sherwin C M, Christiansen S B, Duncan J, Erhard H W, Lay D C, Mench J A, O'Connor C E, Petherick J C. 2003. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81:291-305.
- Sibly R M, Brown J H, Kodric-Brown A. 2012. *Metabolic ecology: a scaling approach*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Ulrich W, Gotelli N J. 2007. Disentangling community patterns of nestedness and species co-occurrence. *Oikos* 116:2053-2061.
- Weir L A, Mossman M J. 2004. The protocol and history of the amphibian calling survey of the North American Amphibian Monitoring Program (NAAMP). En: Lannoo M J, editor. *Status and conservation of US amphibians*. Vol. 1. *Conservation Essays*. Berkeley, California, USA: University of California Press. pp 565-584.
- Wells K D. 2007. *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press.
- Ziegler L. 2015. Norma de reacción y flexibilidad fenotípica en el canto de *Hypsiboas pulchellus*: relación con la condición corporal y escalamiento de sus atributos.
- Ziegler L, Arim M, Bozinovic F. "Combined effects of physiological condition and environmental attributes in determining call plasticity". *Behavioural Processes*, 153(2018): 25-30.

- Ziegler L, Arim M, Bozinovic F. 2016. Intraspecific scaling in frog calls: the interplay of temperature, body size and metabolic condition. *Oecologia* 181:673-681.
- Ziegler L, Arim M, Narins P M. 2011. Linking amphibian call structure to the environment: the interplay between phenotypic flexibility and individual attributes. *Behav. Ecol.* 22:520-526.

CAPÍTULO 8

Métodos alternativos para el estudio de anfibios en campo: fotoidentificación

Ernesto Elgue¹

La identificación individual de animales es fundamental para responder varias preguntas biológicas, relacionadas a aspectos demográficos, etológicos, tasas de supervivencia y migraciones, entre otros temas (Williams *et al.*, 2002, Cove & Spínola 2013). Particularmente en los anfibios, los métodos para la identificación individual se han basado tradicionalmente en el marcaje, como son el corte de falanges (*toe-clipping*), la inyección de elastómeros, marcas por calor, frío, nitrato de plata o tatuajes y la aplicación de chips o *transponders* (Donnelly *et al.*, 2001; Ferner 2007). Alternativamente, existen métodos para la identificación que no requieren el marcaje de individuos, como la utilización de marcadores moleculares (microsatélites) o marcas naturales que existen en los animales (Jehle & Amtzen, 2002). La técnica elegida depende de los objetivos y posibilidades en cada estudio, pero idealmente debería apuntar a no afectar la salud o comportamiento del animal durante el período del estudio y tener fácil aplicación con un costo mínimo (Ferner, 2007).

Históricamente, en anfibios anuros la técnica de marcaje más utilizada ha sido el corte de falanges, que consiste en la captura de individuos y el marcaje por una combinación única de falanges amputadas (Donnelly *et al.*, 2001). Al igual que otras técnicas invasivas, su uso ha sido debatido últimamente debido a las implicancias éticas del procedimiento y los posibles impactos negativos en la salud de los animales y, por ende, en los resultados del estudio (Davies & Ovaska, 2001; Bloch & Irschick, 2004; Perry *et al.*, 2011). Cobran importancia entonces los métodos no invasivos para la identificación, como la fotoidentificación mediante marcas naturales. Esta técnica ha sido utilizada en anfibios bajo la condición de la existencia de diferencias fenotípicas entre los individuos (Fig. 1). En principio también planteaba dificultades debido a los altos costos que podía acarrear (por

1 Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados. Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay. ernestoelgue@gmail.com

la producción manual de dibujos o la impresión de fotografías), pero actualmente este problema se resolvió con el advenimiento de la fotografía digital (Donnelly *et al.*, 2001). En este punto, la eficacia de la técnica depende de la velocidad y práctica del investigador para identificar individuos. Esto puede resultar problemático cuando se trabaja un gran número de individuos, ya que comparar cada imagen con todas las fotografías disponibles puede llevar mucho tiempo. Una solución posible es el uso de un software que asista al investigador, facilitando la tarea de comparación de fotografías y haciendo viable el trabajo con grandes bases de datos. Por ejemplo, la comparación visual sin la asistencia de software de una base de datos de 410 fotografías que implica 83.845 comparaciones en pares, fue llevado a cabo en más de diez horas de trabajo. En contraste, con la asistencia de un software, este mismo trabajo llevó 3:40 hs. (Elgue *et al.*, 2014).

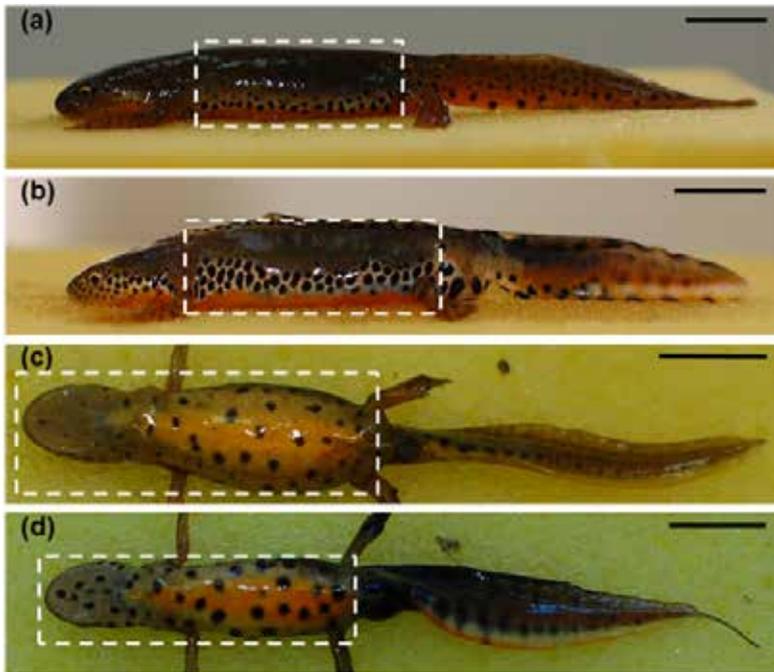


Figura 1. Ejemplo de selección del diseño a utilizar como marcas naturales para la fotoidentificación en dos especies de salamandras, a) *Ichthyosaura alpestris* hembra; b) *I. alpestris* macho; c) *Lissotriton vulgaris* hembra; d) *L. vulgaris* macho. Fotos cedidas por el doctor O. Mettouris, utilizadas para Mettouris *et al.*, 2016.

Wild-ID (Bolger *et al.*, 2011) es un software de comparación de imágenes que ha sido utilizado con buenos resultados en varias especies de anfibios (ej.: Abadie, 2012; Bendik *et al.*, 2013; Ringler *et al.*, 2015; Mettouris *et al.*, 2016; Pereira & Maneyro, 2016). Se basa en un algoritmo que utiliza “puntos clave invariantes de la escala”, que resulta en un método de identificación poco sensible a cambios

de escala, rotación, ruido o iluminación en las imágenes (Lowe, 2004). Además, posee la ventaja de no establecer las identificaciones automáticamente, sino que presenta ante cada fotografía los 20 candidatos más similares ordenados según una escala de similitud, dejando la verificación o rechazo de las coincidencias al usuario. Más allá de la eficacia para asistir al investigador que pueda tener el software elegido, para maximizar el potencial de la fotoidentificación es importante contar con una metodología estándar en la toma y edición de fotografías, registrando las regiones con las marcas naturales variables de forma estandarizada y editando las fotos para que contengan únicamente la región de interés. De esta forma se reducen las fuentes de error al mínimo (Bolger *et al.*, 2011; Halloran *et al.*, 2014).

La fotoidentificación tiene muchas ventajas y ha resultado efectiva en varios casos, pero en algunas ocasiones puede no ser el método indicado, por lo que es deseable una verificación del método en la especie objetivo antes de ser utilizado. Esta verificación se debe realizar para cuantificar la eficacia del método, comparándolo con otro método de identificación como referencia y, de esta forma, analizar si es indicado para el estudio y cuál es el margen de error a contemplar (Kenyon *et al.*, 2009; Caorsi *et al.*, 2012; Bendik *et al.*, 2013; Elgue *et al.*, 2014). Existen casos donde el patrón de diseño de manchas del animal demostró ser variable en el tiempo y, por lo tanto, no adecuado para estudios a largo plazo (Kenyon *et al.*, 2009). También hay que tener en cuenta que, aunque las marcas naturales resulten estables, los renacuajos suelen tener un patrón de diseño distinto a los adultos, por lo que puede ser necesario establecer el momento del desarrollo en el cual se fija un diseño que permita la identificación (Fig. 2) (Bardier *et al.*, 2017).

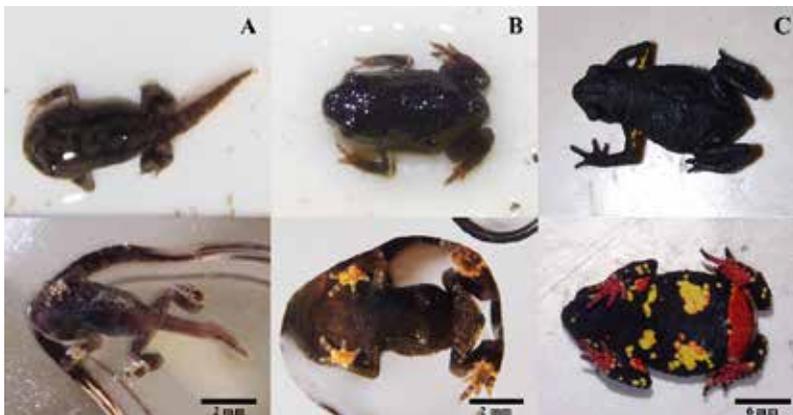


Figura 2. Vista dorsal (arriba) y ventral (abajo) de la evolución ontogenética del patrón de diseño de *Melanophryniscus montevidensis*. A) Individuo recientemente metamorfoseado; B) Juvenil; C) Adulto. Imagen tomada de Bardier *et al.*, 2017.

En conclusión, el procedimiento de fotoidentificación implica (Fig. 3):

- Toma de fotografías que, si bien en grandes animales puede llegar a darse a la distancia (Halloran *et al.*, 2014; Morrison & Bolger, 2014), en anfibios generalmente requiere la captura, por lo que deben tomarse todos los recaudos para la manipulación de los animales y tratar de hacer el procedimiento lo más efectivo posible para acotar el tiempo de captura y reducir su invasibilidad.
- Edición de las fotografías para reducir las fuentes de error al mínimo, intentando dejar solamente las regiones con las marcas que sirven para la identificación, tratando de que el brillo y la calidad de las imágenes sean lo más uniformes posible.
- La comparación de fotografías, ya sea manual o asistido por software, es deseable que sea realizada por el o los mismos investigadores, para que las distintas percepciones no generen sesgos en los resultados. Es común que los softwares tengan una instancia de verificación ante cada comparación, por lo que la percepción y experiencia del investigador juega un papel a la hora de determinar las recapturas.
- Procesamiento de los datos, para poder interpretar los resultados y sacar conclusiones en cada investigación. Cuanto mejores y más completos sean los datos que se tomaron durante el trabajo con los animales, mayor provecho se le podrá sacar cuando se tengan datos de capturas y recapturas.

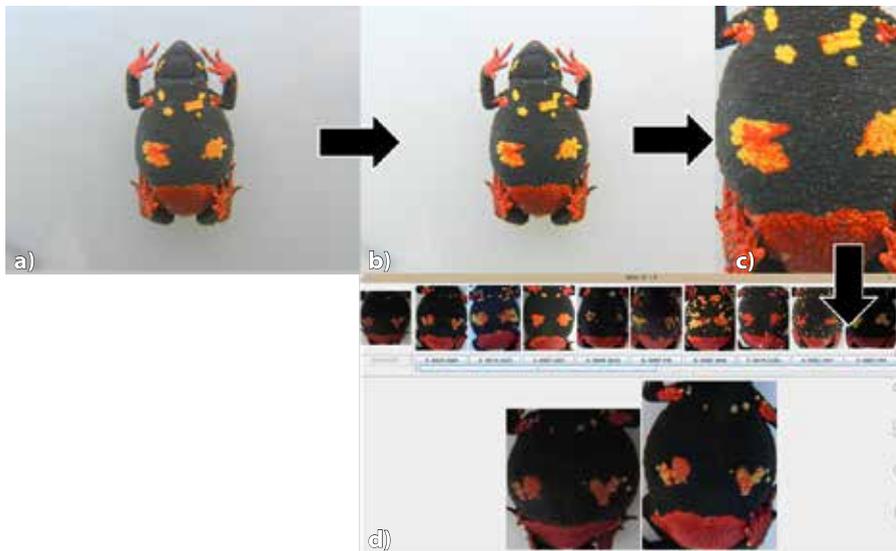


Figura 3. Representación del proceso de fotoidentificación en *Melanophryniscus montevidensis*. a) Imagen sin modificar; b) Imagen con brillo y contraste ajustados; c) Imagen recortada en la región variable de interés en *M. montevidensis*; d) interfaz del software Wild-ID en el momento del análisis de coincidencias. Fotos: Ernesto Elgue.

Más allá de las ventajas éticas de un método no invasivo, la fotoidentificación puede hacer viable el trabajo con especies con problemas de conservación, ya que suele ser de fácil implementación y reduce al mínimo los impactos negativos sobre las poblaciones. Esto ha permitido tener importantes datos sobre patrones de movimientos, tasa de supervivencia, tamaño poblacional y otros datos demográficos en especies amenazadas (Ribeiro & Rebelo, 2011; Bendik *et al.*, 2013; Cove & Spínola, 2013; Pereira & Maneyro, 2016).

Referencias

- Abadie M. 2012. Fotoidentificação como alternativa de marcação não invasiva para o sapinho microendêmico *Melanophryniscus admirabilis* (Anura: Bufonidae). Unpublished Monograph. Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
- Bardier C, Pereira G, Elgue E, Maneyro R, Toledo L F. 2017. Quantitative Determination of the Minimum Body Size for Photo-identification of *Melanophryniscus montevidensis* (Bufonidae). *Herpetological Conservation and Biology*, 12, 119-126.
- Bendik N F, Morrison T A., Gluesenkamp A G, Sanders M S, O'Donnell L J. 2013. Computer-assisted photo identification outperforms visible implant elastomers in an endangered salamander, *Eurycea tonkawae*. *PLoS one* 8(3): e59424.
- Bloch N, Irschick D J. 2004. Toe-clipping dramatically reduces clinging performance in a pad-bearing lizard (*Anolis carolinensis*). *Journal of Herpetology* 37: 293-298.
- Bolger D T, Vance B, Morrison T A, Farid H. 2011. Wild-id user guide: pattern extraction and matching software for computer-assisted photographic mark-recapture analysis. Version 1.0 (January 2011). Electronic accessible at http://software.dartmouth.edu/macintosh/academic/Wild-id_1.0.0.zip.
- Caorsi V Z, Santos R R, Grant T. 2012. Clip or snap? An evaluation of toe-clipping and photo-identification methods for identifying individual Southern Red-Bellied Toads, *Melanophryniscus cambaraensis*. *South American Journal of Herpetology* 7:79-84.
- Cove M V, Spínola M. 2013. Pairing noninvasive surveys with capture-recapture analysis to estimate demographic parameters for *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae) from an altered habitat in Costa Rica. *Phyllomedusa* 12:107-115.
- Davis T M, Ovaska K. 2001. Individual recognition of amphibians: effects of toe clipping and fluorescent tagging on the salamander *Plethodon vehiculum*. *Journal of Herpetology* 35: 217-225.
- Donnelly M A, Guyer C, Juterbock J E, Alford R A. 2001. Techniques for marking amphibians. Pp. 277-284 in Heyer W R, Donnelly M A, McDiarmid R W, Hayek L C, Foster M S (eds.), *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Washington, Smithsonian Institution Press.

- Elgue E, Pereira G, Achaval-Coppes F, Maneyro R. 2014. Validity of photo-identification technique to analyze natural marks in *Melanophryniscus montevidensis* (Anura: Bufonidae). *Phyllomedusa* 13, 59-66.
- Ferner J W. 2007. A Review of Marking and Individual Recognition Techniques for Amphibians and Reptiles. Salt Lake City. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. 72 pp.
- Halloran K M, Murdoch J D, Becker M S. 2015. Applying computer-aided photo-identification to messy datasets: a case study of Thornicroft's giraffe (*Giraffa camelopardalis thornicrofti*). *African Journal of Ecology* 53(2): 147-155.
- Jehle R, Arntzen J W. 2002. Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. *Herpetological Journal* 12: 1-9.
- Kenyon N, Phillott A D, Alford R A. 2010. Temporal variation in dorsal patterns of juvenile green-eyed tree frogs, *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetological Conservation and Biology* 5: 126-131.
- Lowe D. 2004. Distinctive image features from scaleinvariant keypoints. *International Journal of Computer Vision* 60: 91-110.
- Mettouris O, Megremis G, Giokas S. 2016. A newt does not change its spots: using pattern mapping for the identification of individuals in large populations of newt species. *Ecological research* 31(3): 483-489.
- Morrison T A, Bolger D T. 2014. Connectivity and bottlenecks in a migratory wildebeest *Connochaetes taurinus* population. *Oryx* 48(4): 613-621.
- Pereira G, Maneyro R. 2016. Movement Patterns in a Uruguayan Population of *Melanophryniscus montevidensis* (Philippi, 1902) (Anura: Bufonidae) Using Photo-Identification for Individual Recognition. *South American Journal of Herpetology* 11(2): 119-126.
- Perry G, Wallace M C, Perry D, Curzer M, Muhlberger P. 2011. Toe-Clipping of Amphibians and Reptiles: Science, Ethics, and the Law. *Journal of Herpetology* 45:547-555.
- Ribeiro J, Rebelo R. 2011. Survival of *Alytes cisternasii* tadpoles in stream pools: a capture-recapture study using photo-identification. *Amphibia-Reptilia* 32(3):365-374.
- Ringler E, Mangione R, Ringler M. 2015. Where have all the tadpoles gone? Individual genetic tracking of amphibian larvae until adulthood. *Molecular ecology resources* 15(4):737-746.
- Williams B K, Nichols J D, Conroy M J. 2002. Analysis and management of animal populations: modeling, estimation and decision-making. San Diego. Academic Press. 817 pp.



CAPÍTULO 9

Colecta y manejo de reptiles en el ambiente

Santiago Carreira^{1,2,3}

La colecta de reptiles, como ocurre con otros grupos de vertebrados, es necesaria para actividades como la investigación, la docencia e incluso la producción (en caso de suero antiofídico u otros). En Uruguay, también existe un incremento y por tanto presión adicional sobre las poblaciones silvestres debido a la colecta con fines de abastecer el mercado de mascotas no tradicionales, que ha crecido notablemente en estos últimos años, y el cual requiere en muchos aspectos una mayor regulación y control. Por otro lado, la cría de reptiles, más allá del mercado de mascotas mencionado, no es una práctica habitual en nuestro país. Sin embargo, algunos ejemplos pueden encontrarse en las estaciones de cría de yacaré (*Caiman latirostris*), aunque no han conseguido prosperar. Por otra parte, especies como el lagarto (*Salvator merianae*) no han tenido iniciativas de criaderos nacionales, y los ejemplos más cercanos los encontramos en Argentina. En cuanto al manejo de especies peligrosas, además de los zoológicos que pudieran tenerlas para exhibición, existe una experiencia a nivel nacional y dentro de la órbita de la UdelAR que es el Bioterio de Animales Ponzosñosos (Serpentario), instalado en el Instituto de Higiene (Convenio Fac. Ciencias - Fac. Medicina).

Como ocurre con los otros grupos de vertebrados, tanto la colecta como el transporte de reptiles están regulados por la Ley N° 9.481 y su decreto reglamentario 164/996. Este marco legal hace necesaria la obtención de autorizaciones específicas para la colecta y transporte de reptiles. En este sentido se observan especialmente las especies declaradas como prioritarias por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas, y las autorizaciones correspondientes deben ser gestionadas ante la División Fauna de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (MVOTMA).

1 Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados. Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias, UdelAR. Uruguay.

2 Sección Herpetología, Museo Nacional de Historia Natural. 25 de Mayo 582. CP 11000, Montevideo. Uruguay.

3 Bioterio de Animales Ponzosñosos (Serpentario) Convenio Fac. Ciencias - Fac. Medicina, Instituto de Higiene, Montevideo, Uruguay - carreira@fcien.edu.uy

Además de estas autorizaciones será necesario en los casos de investigación o docencia el aval ante la CHEA de los Protocolos de Experimentación relacionados con la actividad específica. Cabe indicar que algunas especies de reptiles como los ofidios ponzoñosos también están comprendidas dentro de la Ley N° 16.088 (“animales feroces”), una ley que necesita ser revisada para su actualización.

La fauna de reptiles de Uruguay se compone principalmente de especies de tamaño reducido, siendo la mayor parte ofidios y pequeños saurios, con algunos ejemplos de especies de mediano y gran porte como el yacaré (*Caiman latirostris*), la anaconda amarilla (*Eunectes notaeus*) y las tortugas marinas. Existen actualmente en el país 72 especies (Carreira *et al.*, 2005; Carreira & Maneyro, 2013; Carreira, 2017) dentro de las que se destacan ocho por encontrarse en categorías de amenaza a nivel regional (criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, UICN; Carreira & Maneyro, 2015) y 35 según el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) por ser especies importantes del punto de vista de la conservación o por su potencial valor cultural, productivo o medicinal (Clavijo *et al.*, 2013).

Colecta de reptiles

La colecta de reptiles se realiza por medio de captura manual o mediante la utilización de trampas. Los métodos son muy diversos y dependen del objetivo de estudio y también del tipo y tamaño del reptil. Cabe señalar que, por medio de una selección adecuada de la metodología de trampeo, se pueden evitar daños colaterales tanto dentro del mismo grupo zoológico como en relación a otros. Por ejemplo, al utilizar un sistema de trampas de caída, se puede adecuar el tamaño del recipiente de acuerdo a la especie objetivo, si se pretende capturar un saurio pequeño, se utilizará un recipiente de poca profundidad y de ese modo los animales de mayores dimensiones podrán salir. Tanto para las técnicas de colecta manual como para la utilización de trampas se deben conocer los procedimientos adecuados para la manipulación de especies peligrosas, en particular los ofidios ponzoñosos.

La colecta manual de reptiles puede realizarse directamente con la mano, o utilizando algún dispositivo para la captura como pueden ser los ganchos y ganchos pinza (Fig. 1) en el caso de los ofidios, y los lazos y horquetas para los saurios. Dependiendo de si es un colúbrido o un vipérido se utilizará un tipo u otro de gancho. En general las culebras se pueden manipular con las manos considerando algunos aspectos como la sujeción del cuello en el caso de las especies agresivas. Esta manipulación requiere cierta práctica y conocimiento para evitar ser mordido, así como producir daños al animal.



Figura 1. Detalle de la punta de un gancho de manejo tipo "pinza".

En el caso de ofidios que pueden superar los dos metros de longitud por lo general se pueden sujetar por la cola, manteniendo la cabeza alejada por medio de un gancho. En cuanto a los ofidios ponzoñosos como la crucera (*Bothrops alternatus*), la yara o yarará (*Bothrops pubescens*) y la cascabel (*Crotalus durissus terrificus*), la manipulación puede realizarse con relativa seguridad por medio del uso de ganchos en "Z" (Fig. 2), de longitud adecuada, según el ejemplar. En caso de individuos de grandes dimensiones, y en especial con la víbora de cascabel, el uso de dos ganchos será de gran utilidad, ya que esta especie suele ser bastante pesada. La coral (*Micrurus altirostris*) puede ser manipulada con ganchos de este tipo también, pero debido a los movimientos rápidos que realiza es recomendable utilizar un gancho de tipo pinza si no se tiene experiencia.



Figura 2. Gancho de manejo de tipo en "Z" y su punto de colocación para manipular un ejemplar de *Bothrops alternatus* (Crucera).

Los accidentes con estas especies pueden ser graves y, por tal motivo, nunca es deseable el contacto directo en campo, en especial en sitios alejados o con dificultades en el transporte y comunicaciones (Carreira, 2006). El procedimiento de colecta de ofidios ponzoñosos contempla el seguimiento de una serie de pasos fundamentales para garantizar la seguridad: 1. evaluación del entorno inmediato al ofidio (evitar quedar acorralado), 2. disposición de la caja o bolsa para el transporte, 3. manipulación del animal (Carreira, 2006; ver manipulación, Fig. 3). La manipulación directa en situación de campo, si fuera necesaria, y dependiendo de las operaciones a realizar, puede requerir de sedación del animal. El uso de CO₂ es particularmente efectivo para especies peligrosas ya que no implica el contacto directo con el animal. De cualquier forma, todos estos manejos necesitan de entrenamiento y la aplicación de todas las medidas de seguridad oportunas a fin de evitar accidentes.



Figura 3. Pasos en la manipulación de un ofidio peligroso (*Bothrops alternatus* - Víbora de la cruz) para su colocación dentro de una caja de transporte.

La colecta de saurios se puede hacer de forma manual, por medio del uso de lazos, horquetas y redes de mano. Estos métodos, si se usan de forma adecuada, no producen daño a los animales, aunque hay que considerar que toda manipulación produce estrés. En algunas especies es necesario un manejo especialmente gentil. Por ejemplo los gekos, presentan una piel delicada que puede ser dañada con facilidad si se presionan con firmeza. Otras especies pueden ser muy sensibles y producir autotomía caudal con facilidad. Para evitar esto, se requiere

un manejo gentil y una manipulación que realice la sujeción sobre una de las patas traseras a la vez que se contiene el resto del cuerpo (Fig. 4).



Figura 4. Modo de sujetar un ejemplar de *Teius oculatus* (Lagartija verde de cinco dedos). Obsérvese la contención del cuerpo y sujeción de una de las patas posteriores.

En todos los casos, y más allá de la manipulación y observación necesarias para los objetivos del trabajo, los animales deben ser depositados en sacos de tela de color claro. Esto permite un rápido aislamiento visual que reduce el nivel de estrés. Se coloca por lo general un individuo por bolsa (Fig. 5). Las bolsas se lavan adecuadamente luego de cada salida de campo, a fin de eliminar olores de otras especies que provocan en muchos casos gran estrés a los animales. Las especies de ofidios peligrosos también pueden ser alojadas en sacos y esto suele ser necesario cuando no es posible llevar al lugar de colecta las cajas que se utilizan en estos casos. Deben ser introducidos en las bolsas con los ganchos de manejo y el transporte se debe realizar con el gancho para evitar mordeduras a través de la bolsa. Una vez en la zona en donde se encuentra el campamento o lugar de trabajo, los animales son colocados en cajas de madera correctamente identificadas. Si el transporte se realizara en el corto plazo, se pueden colocar las mismas bolsas dentro de la caja, aunque sin dudas lo mejor es retirarlas. Un aspecto muy importante, es mantener tanto las bolsas como las cajas en luga-

res frescos y ventilados. En particular se debe evitar dejarlas dentro de vehículos porque alcanzan elevadas temperaturas en su interior y esto puede provocar la muerte de los animales.



Figura 5. Bolsa de tela para uso en campo.

El uso de trampas es frecuente y existen diversos tipos que se emplean según la especie objetivo y el tipo de trabajo. Las trampas de caída (*pit-fall*; Fig. 6) son ampliamente utilizadas en reptiles, así como las de tipo “nasa”, tanto de tierra como de agua, siendo estas últimas utilizadas principalmente para la captura de tortugas. Todas estas trampas permiten la colecta de ejemplares vivos sin producirles daños. No obstante, es necesaria la revisión cada cortos períodos de tiempo. En las trampas de caída pueden encontrarse varias especies compartiendo un reducido espacio, lo cual genera una situación de elevado estrés y posibles daños físicos e incluso la muerte de los individuos. Para reducir estos conflictos se pueden dejar dentro de la trampa algunos refugios o elementos que permitan cierta separación entre los animales que ingresan. Por otra parte, las trampas de tipo “nasa” que se colocan en el agua deben ser atendidas, pues ocasionalmente pueden soltarse o cambiar de posición por algún motivo, quedando completamente sumergidas, y por tanto impidiendo la respiración de la tortuga cautiva.



Figura 6. Sistema de trampas de caída (*pit-fall*).

Transporte de reptiles

El transporte de los ejemplares colectados debe realizarse evitando el contacto directo entre las bolsas cuando se trata de especies que por sus características pueden alimentarse unas de otras, evitando así el estrés producido por el olor. Lo ideal es transportar a los animales separados por grupos y en cajas o baldes para evitar daños producidos por objetos cercanos (ej. aplastamiento). Hay que cuidar siempre una correcta ventilación y temperatura durante el transporte, siendo particularmente críticas las altas temperaturas dentro de los vehículos. La humedad puede ser crítica también para algunas especies, y en algunos casos será necesario incorporar un recipiente con agua o elementos húmedos durante el traslado. Si el transporte no es inmediato o cercano a los momentos de colecta, los animales requerirán otro tipo de atención y se les deberá proveer al menos de agua fresca. En estos casos es conveniente contar con recipientes adecuados para el mantenimiento provisorio en campo. Para la mayoría de las especies, cajas plásticas de diferentes tamaños y una tapa de cierre seguro con rejilla de ventilación son suficientes. También se pueden incorporar refugios en su interior como tubos de cartón o plástico de tamaño adecuado al ejemplar o bien utilizar elementos naturales obtenidos en el lugar de colecta.

En todo trabajo de campo que implique una manipulación de ejemplares y su posterior regreso al medio natural es imprescindible cuidar las normas de higiene. El técnico involucrado en estas actividades también debe tomar precauciones en relación a otras actividades, como por ejemplo el trabajo con especies exóticas, ya que se puede producir la contaminación de poblaciones silvestres, con daños muchas veces irreparables (Carreira, 2006). En condiciones de laboratorio, para estos casos se requiere la ducha obligatoria y el cambio de vestimenta (Carreira, 2006). Así también se debe cuidar la higiene y desinfección de todo lo vinculado a las actividades de campo, desde la vestimenta hasta los elementos de transporte.

Eutanasia

Los procedimientos de eutanasia en reptiles en algunos casos siguen siendo discutidos. En campo se emplean técnicas como la punción retrocular que, si bien es inmediata y minimiza el posible sufrimiento impartido al animal, requiere de una práctica que en general no se tiene, por lo que los animales sufren. También se utiliza la inyección de pentobarbital sódico y tiopental sódico, ya que produce una rápida depresión del sistema nervioso central, y es relativamente sencillo (intracelómico; más efectivo es intravenoso, pero su administración es más compleja) y seguro de administrar en especies inofensivas. Sin embargo, como puede ser difícil determinar cuándo ocurre la muerte, se recomienda la destrucción física del cerebro para confirmarla (Baines & Davies, 2004a; 2004b). También cabe señalar que otros pentobarbitúricos que no sean sódicos no se recomiendan, ya que pueden causar dolor (Baines & Davies, 2004a; 2004b). Debido a que los reptiles con los cuidados antes indicados soportan bien el transporte, los procesos de eutanasia se realizan mejor en el laboratorio, en particular si se requiere extraer algún tipo de muestra o es necesaria la manipulación de especies peligrosas. En el laboratorio se han empleado comúnmente la hipotermia y el posterior congelamiento para dar muerte a los animales. Esta metodología ha sido discutida para la anestesia y eutanasia de vertebrados ectotermos, siendo uno de los argumentos contrarios a su uso la formación de cristales de hielo en la piel y tejidos que producen dolor y angustia (Cooper *et al.*, 1989 citado por Lillywhite *et al.*, 2017; Baines & Davies, 2004a; 2004b; AVMA, 2013). Sin embargo, recientemente estos argumentos han sido discutidos por Lillywhite *et al.* (2017), indicando que no resultan lógicos bajo la evidencia de que los nervios periféricos son incapaces de transmitir las señales cuando los tejidos se encuentran a cero grado, así como el cerebro está también inactivo, llegando a la conclusión de que la transmisión del dolor asociado al congelamiento no es posible. Estos autores indican que el enfriamiento a bajas temperaturas es un método útil que, utilizado con gases como el isofluorano, resultan efectivos también en la anestesia de reptiles y, por otro lado, la eutanasia por enfriamiento rápido y posterior congelamiento es un

método adecuado para los reptiles pequeños. Esta metodología presenta ventajas en condiciones de laboratorio principalmente por el bajo costo, la reducción del riesgo en la manipulación (en particular con especies ponzoñosas) y evitar el uso de químicos que contaminan el espécimen. La decapitación ha sido utilizada también en ciertos estudios, pero como método de eutanasia no se recomienda para anfibios y reptiles a menos que se realice bajo un protocolo de tres pasos, la inyección de un anestésico, la decapitación y la destrucción del tejido cerebral (AVMA, 2013).

Referencias

- AVMA. 2013. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2013 Edition. American Veterinary Medical Association. Schaumburg, I L. 102 pp.
- Baines F M, Davies R R. 2004a. The euthanasia of reptiles. *Veterinary Times* 34(8): 8-9.
- Baines F M, Davies R R. 2004b. The euthanasia of reptiles. *Veterinary Times* 34(9): 12-14.
- Carreira S. 2006. Bioterio de Ofidios. pp. 89-99. En: Manejo del Animal de Experimentación. Tradicionales y no tradicionales. Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), Universidad de la República, Oficina del Libro FEFMUR, 101 pp.
- Carreira S. 2017. Lista Sistemática de los Reptiles del Uruguay. Accesible en: <http://szu.org.uy/2018/reptiles.html>. Visitado: marzo de 2018.
- Carreira S. Meneghel M, Achaval F. 2005. Reptiles de Uruguay. D.I.R.A.C. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 639 pp.
- Carreira S. Maneyro R. 2013. Guía de reptiles del Uruguay. Ediciones de la fuga, Mastergraf, Montevideo. 285 pp.
- Clavijo C, Martínez-Lanfranco J A, Soutullo A (eds). 2013. Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. Montevideo. DINAMA. 222 pp.
- Cooper J E, Ewbank R, Platt C, Warwick C. 1989. Euthanasia of Amphibians and Reptiles. Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), World Society for the Protection of Animals (WSPA).
- Lillywhite H B, Shine R, Jacobson E, Denardo D F, Gordon M S, Navas C A, Wang T, Seymour R S, Storey K B, Heatwole H, Heard D, Brattstrom B, Burghardt G M. 2017. Anesthesia and Euthanasia of Amphibians and Reptiles Used in Scientific Research: Should Hypothermia and Freezing Be Prohibited? *BioScience* 67 (1): 53-61.

CAPÍTULO 10

Métodos alternativos para el estudio de reptiles en campo: modelos artificiales

Inés da Rosa¹ - Arley Camargo²

Los modelos elaborados de diferentes materiales son una de las formas que permiten reemplazar el uso de los animales. Esta estrategia se ha desarrollado hace algunos años en el área que estudia la biología térmica de lagartijas. En los siguientes párrafos serán descritos aspectos básicos de la biología térmica de los reptiles, con énfasis en lagartijas, que contextualizan el uso de estos modelos y posteriormente cómo es posible obtener información sobre la termorregulación y la calidad del hábitat para predecir el potencial de extinción de poblaciones. Además, en el transcurso del texto se hará mención de forma general a la colecta, transporte y mantenimiento en cautiverio de las lagartijas con el fin específico de obtener medidas de la temperatura corporal preferencial de estos animales.

Biología térmica en lagartijas

Los reptiles, y en este caso las lagartijas, son un grupo de vertebrados ectotermos cuya temperatura corporal es fuertemente dependiente de la temperatura del medio (Huey, 1982). Como los procesos fisiológicos son afectados por la temperatura corporal (Hochachka & Somero, 2002), la temperatura ambiente acaba incidiendo directamente en la actividad de estos animales (Adolph & Porter, 1993). En este sentido, la actividad puede variar estacionalmente y en el momento del día, dependiendo de las características ambientales de las regiones y localidades que los animales ocupan (Huey *et al.*, 1977). Los extremos de temperatura ambiente pueden afectar a estos animales, por ejemplo, a través de la pérdida de coordinación motora. Estos extremos se denominan temperaturas críticas máximas y mínimas, y se determinan experimentalmente (Cruz *et*

1 Facultad de Ciencias, Montevideo, UdelaR. Uruguay - inepossible@gmail.com

2 PDU Sistemas Territoriales Complejos, Centro Universitario Regional Noreste, Sede Rivera, UdelaR. Uruguay. arley.camargo@gmail.com

al., 2005). Temperaturas superiores a las críticas máximas o inferiores a las críticas mínimas pueden llevar a la muerte de los individuos.

A pesar de la dependencia que tiene la temperatura corporal de los reptiles de la temperatura ambiental, estos animales tienen la capacidad de termorregular comportamentalmente, por ejemplo, eligiendo microambientes con características térmicas apropiadas (Huey, 1982). De forma general, los reptiles pueden ser heliotermos o tigmotermos. Los heliotermos absorben calor a través del comportamiento de asoleamiento, elevando así su temperatura corporal, mientras que en tigmotermos el calor es obtenido a través del contacto directo con el sustrato (Withers, 1992). Estas características inciden en el tipo de microambientes que los animales seleccionarán.

La capacidad de regular la temperatura puede variar entre especies y poblaciones, y esta variación se puede reflejar en un índice denominado eficiencia en la termorregulación (Ibarguengoytía *et al.*, 2010; Stellatelli *et al.*, 2013). A los animales con eficiencia cero en la termorregulación se los denomina termoconformadores, porque no regulan su temperatura y presentan la que el ambiente les ofrece (Hertz *et al.*, 1993). La variación en la eficiencia en la termorregulación puede ser en parte resultado de las características ambientales que los animales experimentan, destacando la heterogeneidad térmica que puede favorecer en mayor o menor medida la regulación de la temperatura (Stellatelli *et al.*, 2013). Por lo tanto, la regulación de la temperatura es un proceso que involucra ajustes comportamentales y fisiológicos que refieren a un rango de temperaturas corporal establecido, denominado *set-point*, y que resultan en el control de la temperatura corporal. La termoconformidad puede ser vista como un extremo del continuo de las opciones de termorregulación (Huey, 1982).

En general, se plantea que las funciones fisiológicas serán o estarán próximas al óptimo cuando el animal presente una temperatura corporal que se encuentre dentro del *set-point* (Tset) (Huey, 1982; Van Damme *et al.*, 1989; Kubisch *et al.*, 2011). Por lo tanto, como regla general del comportamiento, se espera que los animales activos mantengan la temperatura corporal (Tb) dentro del rango térmico objetivo (Tset) (Hertz *et al.*, 1993). Sin embargo, dependiendo de las actividades y presiones ecológicas que los animales experimenten en determinado momento, junto con las características ambientales desde el punto de vista térmico, la temperatura corporal puede desviarse del rango térmico objetivo (Van Damme *et al.*, 1989). El rango de temperatura objetivo puede ser estimado como la temperatura corporal preferida o seleccionada en el laboratorio. Las condiciones de laboratorio generan un ambiente independiente de los costos y libre de las restricciones ecológicas que pueden influir en la regulación de la temperatura corporal de los animales en el campo (Hertz *et al.*, 1993). Una de las formas de obtener esta medida es colocar a los animales en un gradiente térmico y registrar la temperatura corporal durante un período determinado (Vicenzi *et al.*, 2017).

El 50% de las observaciones de temperatura corporal son consideradas como la temperatura corporal preferencial o temperatura preferida (T_p), y el 25-75% de las observaciones de los valores de temperatura corporal son considerados el rango térmico objetivo (T_{set}) (Hertz *et al.*, 1993).

Colecta, transporte y mantenimiento de lagartijas en cautiverio

Además de la captura manual, entre las formas de colecta más comunes de lagartijas están el uso de lazos y horquetas (Simmons, 2002; Fitzgerald, 2012). Esta forma de captura permite al colector estar relativamente alejado del animal y acceder al ejemplar que no puede ser atrapado a mano (Fig. 1). Luego de la captura, el animal debe ser colocado en un recipiente con entrada de aire y con el tipo de sustrato que es utilizado por los animales tal como hojarasca, arena, piedras, etc. Es importante que los animales no se encuentren hacinados en los recipientes para evitar interacciones agresivas entre ellos. En el momento del transporte debe ser considerada la temperatura, por ejemplo, en días extremadamente calurosos es recomendable utilizar el aire acondicionado del vehículo. También es recomendable en casos de temperaturas ambientales extremas que puedan darse dentro de los vehículos, colocar los recipientes dentro de una caja mayor, con aislamiento térmico. En caso de trayectos prolongados es de buena práctica revisar el estado de los animales con cierta periodicidad. Dependiendo de las especies, la humedad puede ser más o menos importante. En el caso de que el ambiente donde sean colectados los animales sea húmedo, se puede incorporar una muestra del sustrato con algo de humedad en los recipientes donde serán transportados los animales.

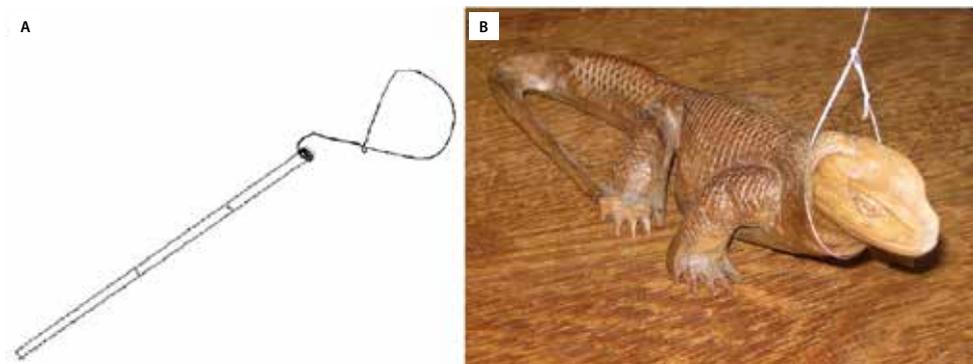


Figura 1. Método de captura de lagartijas. A) Vara con lazo. Dibujo: Inés da Rosa. B) Lazo entorno de la región gular de la lagartija. Foto: Carla Piantoni.

En el laboratorio, o en la sala destinada a mantener los animales en cautiverio, son necesarias condiciones con la menor cantidad de estímulos (*e. g.*, ausen-

cia de ruidos fuertes) para los animales, así como de higiene adecuada durante el tiempo que requiera la medición de la temperatura preferencial. Es importante evitar que productos potencialmente tóxicos compartan el ambiente con los animales. La habitación debe tener un fotoperíodo similar al natural y la temperatura debe ser controlada en niveles que no sean extremos y que sean parecidos al que experimentan en actividad. Las cajas donde los animales se encuentren deben de presentar un sustrato por lo menos similar al que los animales experimentan en la naturaleza. Además, deben presentar sitios para que los animales se refugien, en general es importante considerar los hábitos de la especie para enriquecer el ambiente dentro de las cajas. Estas medidas de “enriquecimiento ambiental” para intentar simular las condiciones de un hábitat más parecido al natural del organismo estudiado, han sido recomendadas y justificadas por sus beneficios en reptiles (Burghardt, 2012). Sumado a lo anterior, si los animales son heliótermos se considera relevante que una parte de la caja presente alguna fuente de luz y calor para que puedan termorregular, pero evitando que el nivel de temperatura no sea extremadamente alto (Fig. 2); consideraciones similares deberían ser tomadas en cuenta en el caso de que los animales sean tigmotermos, pero ajustadas a esta característica. Asimismo, es importante incluir en la caja un recipiente con agua que proporcione humedad. El uso de túnicas, guantes sin látex y tapabocas, es recomendado. Cabe mencionar que estas sugerencias hacen referencia a estadias cortas en cautiverio (*i. e.*, días a semanas), porque para estadias más prolongadas los requerimientos de mantenimiento pueden llegar a ser mayores (*e. g.* iluminación que incluya radiaciones UV).



Figura 2. Recipientes plásticos utilizados para el mantenimiento en cautiverio de lagartijas de la especie *Liolaemus weigmannii*. Puede verse el sustrato arenoso, caños utilizados como refugios, recipiente con agua, y fuente de luz y calor para la termorregulación. La tapa de la caja presenta agujeros para la entrada de aire. Foto: Inés da Rosa.

Las medidas de la temperatura corporal preferencial se realizan dentro del laboratorio o en salas destinadas para ello. Estas medidas pueden realizarse exponiendo a los animales a un gradiente térmico de temperatura (Ibarguengoytía *et al.*, 2010; Lara-Reséndiz *et al.*, 2011; Kubisch *et al.*, 2016), el cual se genera colocando una fuente de calor en el extremo de una pista, disminuyendo la temperatura con el aumento de la distancia de la fuente de calor (Fig. 3A). Los valores de temperatura del gradiente deben ser ecológicamente relevantes, no siendo necesario que estén representadas las temperaturas críticas máximas y mínimas. A los animales se les incorpora un sensor de temperatura en la cloaca, o en la región ventral si los animales son pequeños, que irá registrando la temperatura corporal que el animal voluntariamente escogerá cuando se encuentren dentro del gradiente térmico (Fig. 3B-C).



Figura 3. Uso de gradiente térmico para medida de temperatura corporal preferencial en lagartijas. A) Gradiente de temperatura. B) Lagartija conectada a un sensor de temperatura dentro del gradiente de temperatura. C) Registrador de temperatura de cuatro canales. D) Temperatura corporal preferencial de una hembra de *L. wiedmannii* proveniente de la localidad de Pajas Blancas (Montevideo, Uruguay) dentro de un gradiente térmico. Los registros de temperatura fueron realizados 1 por minuto durante 2,5 horas. A-C) Fotos: Inés da Rosa. D) Figura no publicada.

Las medidas de temperatura preferencial deben realizarse en un ambiente donde el animal no experimente estrés, por ejemplo, en ausencia de ruidos y movimiento de personas dentro de la sala, ya que el objetivo es que refleje la temperatura corporal que tendría sin costos ecológicos como los que sí estarían presentes en la naturaleza (Hertz *et al.*, 1993). La toma de medidas de la temperatura corporal preferencial es realizada fuera del entorno natural de los animales, lo que generará algún grado de estrés, sin embargo, este será moderado, ya que es una técnica no invasiva y que no intenta exponer a los animales a sus extremos fisiológicos.

Evaluación del comportamiento termorregulador y calidad del ambiente térmico

Para establecer el comportamiento termorregulador es necesario conocer las características térmicas del ambiente usado por las lagartijas. Pero además, es necesario conocer cómo sería la temperatura de los animales en el ambiente si no termorregulasen, o sea, si presentan el comportamiento termoconformador (Hertz *et al.*, 1993). Esta temperatura se la denomina temperatura operativa (T_e). De esta forma, tendremos con que contrastar y así evaluar el nivel de termorre-

gulación de la población estudiada. La T_e se obtiene a través de la inclusión de modelos en el campo como se explica más adelante.

Por lo tanto, para evaluar el nivel de termorregulación de una población o especie se deben conocer los siguientes aspectos: temperatura corporal de los animales en actividad (T_b), temperatura corporal preferencial (T_p), rango térmico objetivo (T_{set}) y temperatura operativa (T_e). La desviación de T_b con respecto a T_p (dT_b) es un indicador de qué tan alejada está la temperatura de los animales en actividad de la que representaría su óptimo. De la misma forma, la desviación de T_e de T_p (dT_e) sería un indicador desde el punto de vista térmico de la calidad del hábitat (Hertz *et al.*, 1993). Si dT_e es igual a cero, el ambiente sería térmicamente ideal, porque el animal tendría siempre la T_b dentro del rango térmico objetivo. Hábitats con valores elevados de dT_e indicarán una calidad baja del hábitat, ya que los animales tendrían que termorregular para alcanzar un T_b cercano o dentro del rango térmico objetivo. La termorregulación implica costos de locomoción, exposición a depredadores e interacciones competitivas, entre otros (Huey & Slatkin, 1976).

En el caso específico del comportamiento termorregulador, la eficiencia de la termorregulación fue definida por Hertz *et al.* (1993) como:

$$E = 1 - (dT_b/dT_e)$$

El valor de E en general estará dentro del rango de 0 a 1. Cuando un animal no termorregula (*i. e.*, los animales seleccionan el microhábitat de forma aleatoria), dT_b y dT_e serán similares y E estará próximo a cero. Al contrario, los que fuertemente termorregulan presentarán valores de dT_b bastante inferiores a dT_e y, por lo tanto, E se aproximará a 1. Valores negativos de E pueden ocurrir si los animales evitan activamente microhábitats que proveen T_e dentro del rango térmico objetivo, quizás porque los depredadores son abundantes o el alimento es escaso (Hertz *et al.*, 1993).

Construcción y calibración de modelos para calcular T_e

Para evaluar la calidad del hábitat y el comportamiento termorregulador se debe conocer térmicamente el ambiente, así como la temperatura que presentarían los animales si se comportasen como termoconformadores. Para ello, una de las estrategias propuesta es la elaboración de modelos que serán "calibrados" con animales vivos, los cuales posteriormente serán colocados en los distintos microambientes que los organismos usan. Este tipo de estrategia se basa en que los modelos no presentan control fisiológico de la temperatura y por lo tanto expresarían el comportamiento termoconformador (Hertz *et al.*, 1993). Por lo tanto, el uso de modelos térmicos representa una solución viable y práctica para la aplicación del principio de reemplazo de los organismos vivos, incluido en las

tres erres de Russell & Burch (1959). Sin embargo, este tipo de enfoques ha recibido menos atención que el refinamiento y la reducción en la investigación con reptiles ectotérmicos (Burghardt, 2012).

Con el fin de calibrar a los potenciales modelos que serán utilizados para estimar la T_e , se les coloca un sensor de temperatura. Concomitantemente, los animales deben ser inmovilizados de forma tal que no puedan comportamentalmente modificar su temperatura, por ejemplo, alejando el cuerpo del sustrato donde se encuentren ubicados. Esto se puede conseguir sujetando los miembros del animal junto a su cuerpo. Luego de que el animal está inmovilizado, se le coloca un sensor de temperatura en la cloaca o en la región ventral si éste es demasiado pequeño (Fig. 4). Es importante que el sustrato donde sean evaluados el modelo y el animal sea el mismo al que utilizan los animales en la naturaleza. Posteriormente, tanto el modelo como el animal deben ser colocados al sol y luego a la sombra de forma reiterada y así registrar la temperatura de ambos y también sus variaciones. Si los animales tuvieran actividad nocturna, podrían ser sustratos de distinta temperatura al que fueran expuestos los animales y los modelos. Estos modelos pueden ser de diferentes materiales, colores y formas (Fig. 5). Luego de evaluar varios modelos diferentes, se escogerán aquellos que presenten un comportamiento térmico similar al de la lagartija (Fig. 6). Por ejemplo, en el caso de *Liolaemus weigmannii*, la selección de modelos requirió evaluar el comportamiento térmico de caños de PVC de diferentes longitudes y diámetros, pintados de gris o de blanco, y en algunos casos, con franjas blancas (Fig. A5). El modelo definitivo fue de 28,5 cm de largo y de 2,5 cm de diámetro con dos franjas grises y relleno de algodón (datos no publicados).



Figura 4. Calibración de modelo para medir T_e . El modelo (caño gris) y la lagartija están conectados a sensores de temperatura que registran al mismo tiempo la temperatura que ambos están presentando como resultado de la exposición, en este caso, al sol. Foto: Barry Sinervo.



Figura 5. Modelos utilizados para medir T_e . Se indican la especie, en el caso de (A), y de los géneros de lagartijas, en el caso de (B), al que estarían representando los modelos. Los modelos son de PVC y se encuentran conectados a un sensor de temperatura. Fotos: A) Ernesto Elgue. B) Barry Sinervo y Donald Miles.

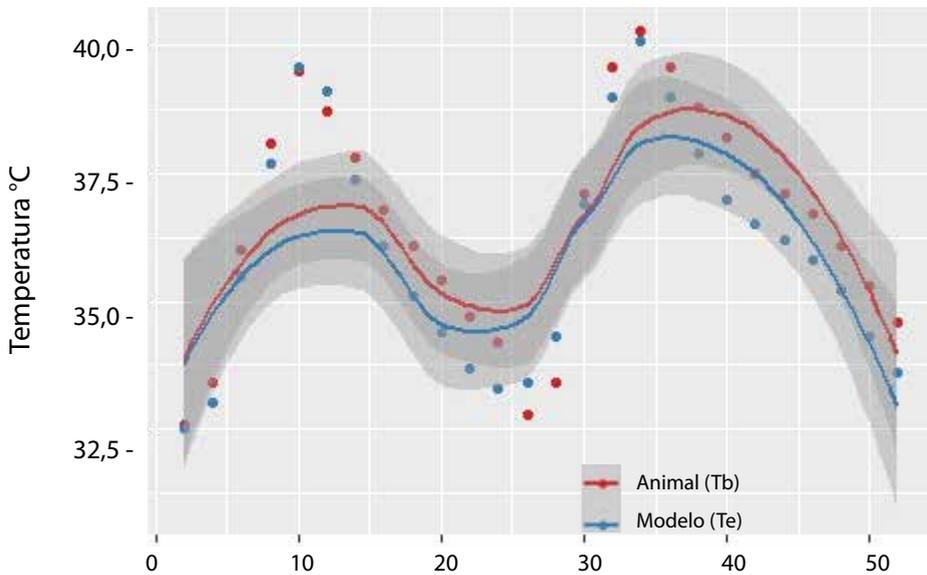


Figura 6. Registro de la temperatura del modelo (T_e) y de la temperatura corporal de una lagartija (T_b) en función del tiempo en minutos. Las franjas grises corresponden al intervalo de confianza del 95%, el gris oscuro indica el solapamiento de ambos intervalos. Figura de Inés da Rosa.

Posteriormente, los modelos seleccionados son colocados en los distintos microambientes que los animales usan, permaneciendo durante la mayor cantidad de tiempo posible para poder captar una alta cantidad de información sobre la temperatura que un animal termoconformador exhibiría. La media de los valores registrados de temperatura de los modelos, en el período de interés, será considerada como la T_e (Ibarguengoytía *et al.*, 2010).

La toma de medidas de temperatura de los modelos y los animales puede llevar algunas horas, lo cual puede resultar estresante para los animales. Sin embargo, podrán ser liberados en su hábitat natural si el procedimiento es desarrollado en el lugar de colecta. Entonces, a través del uso de modelos como sustitutos de organismos vivos, podemos establecer la temperatura que tendría una especie si tuviera comportamiento termoconformador, evitando mantener animales inmóviles en el campo por largos períodos, como sí lo podemos hacer con los modelos. Como resultado, se puede ampliar y profundizar el conocimiento de la biología térmica de las lagartijas reemplazando a las lagartijas con los modelos. Además, a partir de los valores de T_e también es posible establecer cuáles poblaciones podrían encontrarse, actualmente o en el futuro, en condiciones térmicas adversas.

Extinción de poblaciones frente al incremento de temperatura ambiental

Si la temperatura ambiente supera los niveles adecuados para que los animales desarrollen sus actividades, éstos se refugiarán provocando la disminución de horas destinadas a la alimentación y reproducción, incidiendo en las poblaciones e incluso llevándolas a su desaparición (Sinervo *et al.*, 2010). Estas horas no disponibles para la actividad se las denomina “horas de restricción”, que se estiman como el acumulado de horas del día en que la temperatura operativa (T_e) supera la temperatura preferencial (T_p) (Sinervo *et al.*, 2010). Además de ser afectadas por la temperatura preferencial de los animales, se ha observado que las horas de restricción (H_r) presentan una relación lineal con la diferencia entre la temperatura máxima ambiental (T_{max}) y la temperatura preferencial (Lara-Rensendiz *et al.*, 2015):

$$H_r [T_e > T_p] = a + b^* (T_{max} - T_p) \quad (1)$$

El número de horas que estén por encima del límite superior del nivel de confianza del 95% de las observaciones referidas al cálculo de H_r es considerado el número de horas que podría llevar a la población a la extinción, H_r límite (Ceia-Hasse *et al.*, 2014; ver Kubisch *et al.*, 2016 para considerar cálculo alternativo de H_r).

De esta forma, conociendo la temperatura preferencial de una población, la temperatura máxima de los días en los que se midió T_e del periodo de actividad (si es conocido el período reproductivo mejor), junto con la temperatura operativa de la población analizada, es posible establecer las horas de restricción de esa población. A partir de ahí, teniendo los coeficientes a y b de la función (1), es posible calcular las horas de restricción para otra población conociendo la temperatura máxima del ambiente de esa población. Si las horas de restricción superasen el H_r límite, es esperable que esa población pueda estar frente a una condición ambiental adversa.

En este contexto, dada las estimaciones de incremento de temperatura que se proponen para fines del presente siglo (e.g. Mitchell et al., 2006) es posible plantear cuáles poblaciones podrían estar en riesgo de extinción. En este sentido, desde hace algunos años se han venido desarrollando modelos de distribución potencial de especies que incluyen variables fisiológicas (Kearney & Porter, 2009). Estos modelos son llamados modelos biofísicos de distribución y particularmente, el modelo propuesto por Sinervo et al. (2010), incorpora variables como la temperatura preferencial y las horas de restricción. Por lo tanto, la calidad de las estimaciones de distribución potencial y de riesgo de extinción a partir de modelos biofísicos, se basan en datos de alta calidad sobre el ambiente térmico, la temperatura corporal, y la temperatura corporal preferencial. Como se intentó enfatizar durante este capítulo, es necesario construir y validar modelos adecuados para el reemplazo de los organismos, y es fundamental una buena práctica en la colecta, transporte y mantenimiento de reptiles para los experimentos de biología térmica.

Referencias

- Adolph S, Porter W. 1993. Temperature, activity and lizard life histories. *American Naturalist* 142(2): 273-295.
- Burch R L, Hume C W. 1959. *The principles of humane experimental technique*.
- Burghardt G M. 2012. Ethical considerations in working with reptiles. En: *Reptile Biodiversity: Standard Methods for Inventory and Monitoring*; McDiarmid, RW, MS Foster, C Guyer, J Whitfield Gibbons, and N Chernoff (eds.), pp 127-130. University of California Press.
- Ceia-Hasse A, Sinervo B, Vicente L, Pereira H-M. 2014. Integrating ecophysiological models into species distribution projections of European reptile range shifts in response to climate change. *37(7): 679-688*.
- Cruz F B, Fitzgerald L A, Espinoza R E, Schulte J A. 2005. The importance of phylogenetic scale in tests of Bergmann's and Rapoport's rules: Lessons from a clade of South American lizards. *Journal of Evolutionary Biology* 6(18): 1559-1574.
- Fitzgerald L A. 2012. Finding and capturing reptiles. En: *Reptile Biodiversity: Standard Methods for Inventory and Monitoring*; McDiarmid, R W, M S Foster, C Guyer, J Whitfield Gibbons, and N Chernoff (eds.), pp 77-80. University of California Press.
- Hertz P E, Huey R B, Stevenson R D. 1993. Evaluating Temperature Regulation By Field-Active Ectotherms: the Fallacy of the Inappropriate Question. *The American naturalist* 142(5): 796-818.
- Hochachka P H, Somero G N. 2002. Temperature. En: *Biochemical Adaptation: Mechanisms and Process in Physiological Evolution*; pp 290-438. Oxford University Press, New York.
- Huey BH. 1982. Temperature, Physiology, and the Ecology of Reptiles. En: *Biology of the Reptilia*, Vol. 12, Physiology (C); Gans C, Pough F H. (eds.), pp. 25-91. Academic Press, London.

- Huey R, Pianka E. 1977. Seasonal variation in thermoregulatory behavior and body temperature of diurnal Kalahari lizards. *Ecology* 58: 1066-1075.
- Huey R, Slatkin M. 1976. Cost and Benefits of Lizard Thermoregulation. *The Quarterly Review of Biology* 51(3): 363-384.
- Ibargüengoytía N R, Medina M S, Fernández J B, Gutiérrez J A, Tappari F, Scolaro A. 2010. Thermal biology of the southernmost lizards in the world: *Liolaemus armiento* and *Liolaemus magellanicus* from Patagonia, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 35(1): 21-27.
- Kearney M R, Porter W P. 2009. Mechanistic niche modelling: combining physiological and spatial data to predict species' ranges. *Ecology Letters* 12:334-350
- Kubisch E L, Fernández J B, Ibargüengoytía N R. 2011. Is locomotor performance optimised at preferred body temperature? A study of *Liolaemus pictus argentinus* from northern Patagonia, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 36(6): 328-333.
- Kubisch E L, Corbalán V, Ibargüengoytía NR, Sinervo B. 2016. Local extinction risk by global warming of three species of lizards from Patagonia. *Canadian Journal of Zoology* 94(1): 49-59.
- Lara-Reséndiz R A, Gadsden H, Rosen P C, Sinervo B, Méndez De la Cruz F R. 2015. Thermoregulation of two sympatric species of horned lizards in the Chihuahuan Desert and their local extinction risk. *Journal of Thermal Biology* 40: 1-10.
- Mitchell J F B, Lowe J, Wood R A, Vellinga M. 2006. Extreme events due to human-induced climate change. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences.* 364(1845): 2117-2133.
- Simmons JE. 2002. Herpetological collecting and collections management. Revised Edition. *Herpetological Circular* 31, pp vi + 1-153. Society for the Study of Amphibians and Reptiles
- Sinervo B, Mendez de la Cruz F, Miles D B *et al.*, 2010. Erosion of Lizard Diversity by Climate Change and Altered Thermal Niches. *Science* 328(5980): 894-899.
- Stellatelli O A, Vega L E, Block C, Cruz F B. 2013. Effects on the thermoregulatory efficiency of two native lizards as a consequence of the habitat modification by the introduction of the exotic tree *Acacia longifolia*. *Journal of Thermal Biology* 38(3): 135-142.
- Van Damme R, Bauwens D, Castilla A M, Verheyen R F. 1989. International Association for Ecology Altitudinal Variation of the Thermal Biology and Running Performance in the Lizard *Podarcis tiliguerta*. *Oecologia* 80(4): 516-524.
- Vicenzi N, Corbalán V, Miles D, Sinervo B & Ibargüengoytía N. 2017. Range increment or range detriment? Predicting potential changes in distribution caused by climate change for the endemic high-Andean lizard *Phymaturus palluma*. *Biological Conservation* 206: 151-160.
- Withers P C. 1992. Temperature. En: *Comparative Animal Physiology*; pp 122-191. Saunders College Publishing.



CAPÍTULO 11

Colecta y manejo de aves en el ambiente y métodos alternativos para el estudio en campo

Matilde Alfaro¹ - Joaquín Aldabe²

Capturas en campo

Numerosas preguntas de investigación requieren la captura de aves vivas. La captura y toma de datos del ave capturada proporciona información útil para la estimación de tasas demográficas, como la sobrevivencia y éxito reproductivo, determinación de sexo, clases de edad, estudios de muda, evaluación de condición corporal, entre otros. Para la captura de aves vivas generalmente se utilizan redes. Existen diversos tipos de redes, que se utilizan según el grupo taxonómico, hábitat y comportamiento de las aves de interés para capturar. El método más extendido es el de redes de neblina (o redes de niebla), principalmente utilizado para capturar aves pequeñas (Orden Passeriformes) en ambientes cerrados como bosques y pastizales de alto porte y densos. Para aves no passeriformes, como aves acuáticas, se pueden utilizar otros métodos como Wilsternet, Redes Circulares, redes de cañón, red de caída, captura por encandilamiento y jaulas trampa. Aquí explicaremos y haremos recomendaciones de manejo para los tres métodos que han sido más utilizados en Uruguay.

Redes de neblina

La red de neblina consiste en una red sujeta por parantes a través de tensores verticales, y colocada perpendicular al suelo (Fig. 1). Las dimensiones más utilizadas de redes de neblina son 2,5 m de alto por 6 o 12 m de largo. El tamaño de la malla varía según el tamaño de las aves que se quiera capturar. Lo recomendable es que el tamaño de la malla sea de 30 a 36 mm; mallas mayores pueden ocasionar serios enredos en aves pequeñas.

1 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, Udelar. Uruguay - matilde.alfaro@gmail.com

2 Departamento de Sistemas Agrarios y Paisajes Culturales, CURE, Rocha, Udelar. Uruguay - joaquin.aldabe@gmail.com



Figura 1. Red de neblina destacando los tensores horizontales y verticales, así como la bolsa horizontal que debe formarse para su correcto funcionamiento. Foto Joaquín Aldabe.

Un aspecto relevante del manejo de las redes de neblina es la frecuencia con la que se visita cada red, dado que, si es muy baja, se incrementa el riesgo de mortalidad de los individuos capturados. La frecuencia de visita de cada red no debería superar los 15 minutos. Como referencia, dos personas pueden operar entre 8 y 12 redes con relativa facilidad. La mejor ubicación para una red (o serie de redes) es el límite entre dos tipos de hábitat, como por ejemplo el límite entre un bosque y un pastizal, o la ribera de un río. Dentro de un bosque se puede aprovechar el espacio que genera el pasaje del ganado para colocar la red. Un lugar que puede ser particularmente productivo para capturar es donde un ambiente se hace más angosto, a modo de embudo, debido a un accidente del terreno o a un curso de agua; se espera que allí haya un importante flujo de individuos que utilizan ese tipo de hábitat. Las tasas más altas de captura suelen darse en las zonas más húmedas de un determinado hábitat (Ralph *et al.*, 1996). Generalmente es necesario cortar un poco la vegetación (2 m de ancho) para que la red no quede enganchada y pierda efectividad (Fig. 2). Es recomendable que las redes estén abiertas únicamente durante el período en que las estamos visitando; cuando no se las puede visitar con la frecuencia indicada arriba (ejemplo, durante la noche) es necesario cerrar la red. Para cerrar temporalmente la red basta bajar los tensores a media altura del parante (ver Fig. 1) y moverla de forma

que se enrolle en sí misma. Cuando llueve la red debe cerrarse, dado que las aves capturadas se mojan y enfrían mucho más rápido, lo que puede ocasionar su muerte. También se recomienda cerrar las redes cuando hace frío o calor intenso. La red debe ser instalada de forma que los tensores horizontales (cordones que proporcionan soporte a la malla) estén bien tensos; esto se logra atando cuerdas a estacas en el suelo o ramas de árboles, de forma que los parantes queden erigidos. La distancia entre los tensores verticales a lo largo del poste debe ser tal que formen pequeñas bolsas horizontales (Fig. 2). Si la red queda muy tensa las aves rebotarán y no quedarán atrapadas. Si bien existen numerosas recomendaciones sobre cómo operar las redes (ver Ralph *et al.*, 1996), lo que entendemos clave es la práctica. Es altamente recomendable comenzar a operar las redes con alguien experimentado y, a medida que se va aprendiendo, se puede adquirir independencia de manera gradual.



Figura 2. Fotografía de red de nivel destacando el espacio libre de vegetación que debe quedar en las inmediaciones de la red. Idealmente se propone un espacio de 2 m libres de vegetación a ambos lados de la red. Foto Joaquín Aldabe.

Las aves acuáticas son más difíciles de capturar dado que generalmente habitan ambientes abiertos, y logran detectar las redes de neblina. Para aves playeras la técnica más común es la red de cañón. Esta técnica consiste en una red que se despliega encima de un bando de aves (Fig. 3). Inicialmente la red está enrollada y camuflada con el sedimento y mediante la detonación con pólvora de proyectiles ligados a los extremos de la red, se despliega sobre el bando (Fig. 3). Esta técnica implica una importante habilidad en el “arreo” del bando hacia donde está localizada la red. Tiene el potencial de capturar bandos grandes cuando las especies son gregarias y puede utilizarse en playas arenosas y pastizales. Cuando se capturan grandes números de aves es necesario mantenerlas en cajas ventiladas y cubiertas con malla media sombra. Si el procesamiento de las aves es muy lento, es necesario liberar individuos para evitar mortalidades.



Figura 3. Red de cañón en el momento en que es activada para capturar grupo de aves playeras. Foto: Patricia González.

Otra técnica bastante eficaz, aunque poco conocida para la captura de aves playeras de pastizal es la “wilsternet”. Es una técnica muy antigua, pero poco conocida. En Uruguay la utilizamos para la captura de chorlito canela *Calidris subruficollis* y chorlo pampa *Pluvialis dominica*, en los pastizales de las lagunas costeras de Rocha. Aunque originalmente la técnica fue utilizada para obtener alimento,

actualmente es usada sólo con fines científicos. La red mide unos 25 m de largo y 3,5 m de alto y se sostiene por parantes que trabajan con un sistema de poleas a favor del viento (Fig. 4). En este método es necesario atraer a las aves utilizando señuelos (maquetas de aves simulando un bando posado), mientras, se emite la vocalización de la especie de interés a través de un parlante ubicado en el bando. Cuando las aves se aproximan al bando, volando a baja altura para detenerse, se activa la red. Para evitar mortalidad es muy importante activar la red cuando las aves están aterrizando y no cuando las aves continúan su vuelo. Además, si el viento es muy intenso se recomienda no operar la red, o colocar elásticos en los parantes para disminuir su velocidad con el fin de reducir el riesgo de daño a las aves. Este método es bastante complejo y requiere de bastante experiencia para lograr que funcione correctamente.



Figura 4. Fotografía de wilsternet en el momento en que la red se levanta para capturar un chorlo pampa. Foto Joaquín Aldabe.

La captura por encandilamiento es un método que ha sido aplicado en Uruguay para la captura de chorlos de pastizal y de ñandúes (J. Vitancurt com. pers.) (Alfaro *et al.*, 2018). Consiste en encandilar con un foco potente a las aves que se encuentran descansando en el suelo. El método requiere que se trabaje en noches oscuras (en el período de luna nueva es ideal) para que las aves no detecten a las personas y para asegurar que el ave sea encandilada. Cuando esto sucede, es posible aproximarse hasta uno o dos metros del individuo y a esa distancia se

utiliza un aro de 1,5 m de diámetro con una red, y un palo que permite la manipulación del aro (similar a un calderín de grandes dimensiones). En estos casos es necesario que la operación la realicen dos personas, una llevando el foco y la otra el aro.

Experimentos en campo

El estudio de las aves en su ambiente natural es necesario para entender su comportamiento frente a otras especies y frente al ambiente en que conviven. El trabajo con aves silvestres en laboratorio impone limitaciones tanto vinculadas al mantenimiento de los animales como a cambios de comportamiento asociados al cautiverio (Fair *et al.*, 2010). Por este motivo se han diseñado estudios de comportamiento y de ecofisiología en condiciones naturales que requieren un intenso trabajo de campo y que también poseen sus sesgos y limitaciones (Fair *et al.*, 2010).

Antes de realizar cualquier experimento con animales hay que tener bien claro cuál es el propósito del estudio, ya que esto determina el diseño de muestreo y la cantidad de individuos a monitorear (Garton *et al.*, 2001). Como enunciado general, a mayor número de muestras, mejores son las estimaciones de los modelos matemáticos utilizados (Gotelli & Graves, 1996). Sin embargo, cuando las muestras son animales, el número debe restringirse al mínimo aceptable de forma de minimizar el sufrimiento y la muerte de individuos, especialmente cuando se trata de especies amenazadas (Fair *et al.*, 2010). La mínima cantidad de individuos necesarios será diferente dependiendo del estudio. Por ejemplo, para estudios de uso de hábitat y tamaño del área de acción, se requiere mayor cantidad de muestras que para estudios de movimientos migratorios o dispersión (Garton *et al.*, 2001).

Por último, la presencia de investigadores en el campo va a generar un cambio en el comportamiento normal de los animales (Fair *et al.*, 2010). Cada investigador debe tener en cuenta estos efectos sobre la especie objeto del estudio, sobre las otras especies y sobre el ambiente para intentar minimizarlos (Nisbet & Paul, 2004; Fair *et al.*, 2010). El disturbio generado por la presencia de los investigadores puede ser insignificante o, por el contrario, negativo para los animales, está en el investigador establecer si el efecto es negativo e intentar minimizarlo (Nisbet, 2000; Fair *et al.*, 2010).

En esta sección nos enfocamos en las medidas que se deben tener en cuenta para evitar el sufrimiento y disminuir los sesgos en el comportamiento natural de las aves cuando se realizan experimentos en condiciones naturales. Específicamente nos focalizamos en estudios que requieren anillado, toma de muestras, uso de telemetría y estudios reproductivos.

Marcaje y toma de muestras

Muchos estudios de experimentación en campo con aves requieren la captura de individuos para tomar medidas morfológicas, extracción de sangre para estudios genéticos o de contaminantes, extracción de muestras para estudios parasitológicos o extracción de plumas para isótopos estables. Estas muestras pueden ser utilizadas para estudios genéticos, anatómicos, fisiológicos, de estructura y dinámica de las poblaciones, comportamiento, enfermedades, distribución, etc. (Day *et al.*, 1980; Fair *et al.*, 2010). En esta sección veremos los métodos de colecta de muestras y las precauciones que hay que tener para evitar sufrimiento y contaminación de patógenos tanto de los investigadores como de las aves.

Aunque el entrenamiento y la práctica son la clave para evitar daños a las aves, hay que tener en cuenta que es probable que ocurran accidentes (Fair *et al.*, 2010). Por esta razón es que, tanto para la captura, como para la manipulación, se requieren permisos especiales en los que se exige que el investigador posea experiencia documentada. El investigador, además, debe estar informado sobre la biología de la especie que va a capturar para elegir la época del año e incluso la hora del día adecuadas para la captura, de forma de minimizar el disturbio sobre el comportamiento natural de la especie (Fair *et al.*, 2010). Por ejemplo, las aves que estén nidificando deben ser liberadas lo antes posible de forma de evitar la ausencia prolongada en el nido; las aves diurnas no deben ser liberadas durante la noche, etc. Antes de la captura y la manipulación se debe tener un plan sobre qué hacer si el ave se lastima y determinar los métodos adecuados de eutanasia en los casos que sea necesario (Fair *et al.*, 2010). Los métodos aceptables para sacrificar aves cautivas son los barbitúricos, las anestésicas por inhalación y el CO₂ y el CO (Rose *et al.*, 2007). Si no es posible llevar a cabo el sacrificio durante el trabajo de campo siguiendo estos métodos, existe la posibilidad de utilizar métodos físicos como la dislocación cervical y la decapitación (Rose *et al.*, 2007).

En todos los casos, la manipulación debe hacerse lo más rápida posible para evitar el sufrimiento prolongado que puede ocasionar la muerte. En algunos casos ha sido reportada una condición llamada miopatía que ocurre en algunos individuos luego de ser liberados (Fair *et al.*, 2010). La miopatía es una degeneración del tejido muscular que puede producir que el ave no pueda mantenerse en pie ni volar (Purchase y Minton, 1982; Rogers *et al.*, 2004). La susceptibilidad a padecer miopatía varía según la especie e incluso entre individuos, ya que depende del estado fisiológico, del estado reproductivo y de la época del año (Dabbert & Powell, 1993; Fair *et al.*, 2010). Cuando se está manipulando un ave hay que prestar atención a ciertos síntomas que pueden indicar estrés, como boca entreabierta y jadeo (Fair *et al.*, 2010). Frente a la presencia de estos síntomas debe liberarse al animal o dejarlo por un rato en el lugar de transporte (bolsa o caja) hasta que se recupere.

El marcado de los individuos capturados puede realizarse mediante anillos metálicos y/o anillos plásticos de colores, collares, clips en las patas o en las alas (Fair *et al.*, 2010). Combinaciones individuales de anillos de colores o anillos de colores numerados son muy útiles para reconocer a los individuos en el campo, pero, si no son bien colocados pueden ocasionar problemas. Algunos de los efectos negativos de los anillos metálicos o de la combinación de anillos de colores son: heridas en los tarsos por raspado contra el anillo, acumulación de escamas entre el anillo y el tarso provocando constricción, enganche del anillo con objetos del ambiente, enganche del hallux en el anillo, entre otros. (MacDonald, 1961; Amat, 1999; Bart *et al.*, 2001, Berggren & Low, 2004). A veces puede ocurrir la pérdida del miembro que llevaba el anillo o la formación de callos alrededor de él que luego dificulten el movimiento (Reed & Oring, 1993; Gratto-Trevor, 1994). Este tipo de daños han sido asociados también a la utilización de más de un anillo por tarso y a la utilización de dos anillos metálicos por tarso (Sedgwick & Klus, 1997; Berggren & Low, 2004). Para disminuir los efectos adversos es importante utilizar la medida correcta de marca, colocar los anillos plásticos sobre los de metal, evitar muchos anillos en un mismo tarso y dos anillos metálicos uno encima del otro (Fair *et al.*, 2010). Por otro lado, los anillos pueden generar interferencia con el comportamiento sexual debido a la coloración llamativa de la marca, o aumentar la depredación por ser más vistosos (Hannon & Eason, 1995; Fair *et al.*, 2010). Cuando se marcan aves migratorias también se utilizan banderas de colores (Fig. 5) que indican el país donde fue marcado (Alfaro, 2017). Aunque no existen estudios que documenten el efecto negativo de estas bandas es probable que puedan ocasionar daños debido al rozamiento con las banderas.



Figura 5. Combinación de anillos de colores que pueden ser colocados en aves sancudas como el Batitú (*Bartramia longicauda*, foto). En la foto también se pueden ver las banderas (naranja y azul) que son colocadas en aves migratorias para indicar el país donde fueron marcadas. En este caso, bandera naranja sobre bandera azul indica que fue anillado en Uruguay. Foto: Luciando Liguori.

Telemetría

La telemetría es una técnica utilizada para el rastreo de individuos a lo largo de su distribución mediante el uso de transmisores radiales o satelitales. Un radiotransmisor, previamente colocado en un individuo, emite una frecuencia de radio que puede ser detectada por el investigador mediante el uso de un radiorreceptor. Los transmisores satelitales emiten señales a los satélites que orbitan alrededor de la tierra y estos guardan la información que luego puede ser descargada desde internet por el investigador. El uso de transmisores (de radio o satelitales) ha permitido la realización de numerosos estudios ecológicos de

experimentación en el campo. Sin embargo, los transmisores pueden tener efectos negativos en la supervivencia, la reproducción, el comportamiento y la condición corporal de los individuos (White & Garrot, 1990; Pennycuick *et al.*, 2012). Estos efectos varían dependiendo de la especie y de la técnica que se utilice para colocarlos (Withey *et al.*, 2001). Existen diferentes formas de colocar los transmisores. Pueden ser implantados o colocados externamente utilizando una gran variedad de métodos (Mong & Sandercock, 2007). Entre estos se incluyen arneses agarrados a la espalda, collares, pegado a la piel o a las plumas, montado en la cola o implantado subcutáneamente o en el abdomen (Fair *et al.*, 2010).

White y Garrot (1990) y Withey *et al.* (2001) realizaron una serie de recomendaciones para el uso de transmisores en animales salvajes que aquí adaptamos para aves:

- Utilizar el transmisor más liviano posible; su peso no debería exceder el 3% del peso del ave.
- La forma de colocar el transmisor debe ser lo más disimulada posible. Tanto el transmisor como el enganche deberían tener una coloración similar a la del plumaje del ave.
- Probar el funcionamiento del transmisor en animales en cautiverio o en un estudio previo para determinar si la forma, el tamaño y el enganche son los correctos y los que menor efecto negativo tienen sobre la especie a estudiar.
- Si se utilizan enganches tipo arnés, tener en cuenta su diseño y ajuste para minimizar efectos nocivos en las aves. Un arnés muy ajustado puede limitar el movimiento, pero uno muy flojo puede producir que el animal se enrede.
- Tener en cuenta el crecimiento (ej., cuando se marca juveniles o pichones) y la época del año que puede hacer cambiar el comportamiento (ej., período reproductivo, no reproductivo, migratorio) cuando se colocan los transmisores, ya que el arnés o tipo de transmisor puede no ser el adecuado para cada momento.
- Evitar colocar transmisores en épocas de mucho estrés (ej., durante períodos de escases de alimento, durante la temporada reproductiva) a menos que sea necesario por los objetivos del proyecto. También evitar colocar transmisores en animales que se encuentren en mala condición corporal.
- Luego de colocado el transmisor, esperar unos días a que el animal se acostumbre al dispositivo para comenzar la colecta de datos.
- Nunca asumir que los individuos marcados van a presentar un comportamiento normal, incluso cuando otros estudios reportaron que no existen efectos secundarios. Siempre considerar que puede existir un sesgo asociado.
- Reportar los resultados del trabajo, sean positivos o negativos, sobre el efecto del transmisor.

- Cuando se evalúa el efecto del transmisor, considerar variables-respuesta como el comportamiento y factores físicos y fisiológicos.

Estudios reproductivos

En general, los estudios en ecología reproductiva requieren de visitas a los nidos por parte de los investigadores, que pueden producir efectos negativos reduciendo el éxito reproductivo de la pareja que se está monitoreando (Westmoreland & Best, 1985; Fetterolf & Blokpoel, 1983; Rodway *et al.*, 1996). Estas visitas también pueden aumentar la depredación de los huevos, ya que, luego de la inspección, el nido queda expuesto hasta que los padres vuelven (Yorio & Quintana, 1996; Yorio *et al.*, 1996). En Uruguay, estudios de experimentación en nidos de hornero (*Furnarius rufus*) utilizaron la técnica de perforar el nido para poder realizar observaciones de tamaño de nidada y de parasitismo de cría por el tordo común (*Molothrus bonariensis*) (Tosi, 2015). Luego de realizadas las observaciones el orificio del nido fue tapado cuidadosamente con un tapón de madera y barro por arriba (Tosi, 2015). Esta técnica fue testeada previo a la realización del estudio y se demostró que no afecta el comportamiento natural de nidificación. (Fraga, 1980; Mason & Rothestein, 1986; Aldaz, 2006). Otros estudios sobre la biología reproductiva fueron realizados en la colonia de nidificación del gaviotín real (*Thalasseus maximus*) y el gaviotín pico amarillo (*Thalasseus aculavidus*) de Isla Verde, Rocha (Lenzi *et al.*, 2010). Para acercarse a los nidos sin generar disturbios en el comportamiento natural de los adultos reproductores se utilizó, en algunas ocasiones, la técnica de esconderse en una casilla móvil (Fig. 6). Esta técnica es muy útil para observar el comportamiento de las parejas mientras están posadas en el nido y hasta se pueden tomar medidas de sus huevos. En los casos en que haya que realizar captura de adultos o pichones los disturbios aumentarán, generando estrés en pichones y adultos que deberán ser considerados (Götmark, 1992).



Figura 6. Casilla móvil utilizada para la observación de aves marinas nidificando. La foto es en la colonia de nidificación del Gaviotín Real en Isla Verde, Rocha. Foto: Javier Lenzi, Proyecto Sterna-Averaves.

El uso de cajas nidos es otra técnica utilizada para el estudio de reproducción en aves, especialmente en especies que son propensas a utilizarlas (Møller, 1989; Møller, 1992). La utilización de cajas nido ha posibilitado la generación de conocimiento en distintas áreas de la biología como la evolución, selección sexual, genética de poblaciones, parasitismo, etc. (Møller, 1989; Møller, 1992). Sin embargo, esta técnica tiene sesgos que deben ser tomados en cuenta en los resultados de la investigación. En general, estos sesgos se deben al incremento en el éxito reproductivo de las especies que utilizan las cajas nidos principalmente debido a dos aspectos: 1) las cajas nido generalmente ofrecen mayor protección contra los depredadores que los agujeros utilizados en la naturaleza por las especies; y 2) en muchos estudios se remueven los nidos viejos una vez terminada la temporada con la consecuente remoción de parásitos y por tanto los individuos que vuelven a nidificar al año siguiente tienen menos cantidad de parásitos que lo normal (Møller 1989, Griffith *et al.*, 2008).

Técnicas para la toma de muestras en animales vivos

Extracción de sangre

La sangre generalmente es utilizada para estudios genéticos, parasitológicos, ecotoxicológicos, metabólicos, etc. Las muestras de sangre pueden ser colectadas de animales vivos de distintas maneras (Vuillaume, 1983; Hoysak & Weatherhead, 1991) y no debería extraerse más del 1% del peso de cada individuo por semana (McGuill & Rowan, 1989). Una técnica muy utilizada, debido a su simpleza y rapidez, es la extracción de sangre de la vena ulnar que se encuentra en la articulación entre el húmero y el cúbito y radio del ala (Fig. 7) (Fair *et al.*, 2010). La extracción puede realizarse utilizando directamente una jeringa en especies de gran tamaño (mayores a 100 g). Pero si se trata de especies pequeñas se debe realizar una punción con agujas de calibre 26 o menores directamente en la vena y coleccionar la gota de sangre con tubos capilares de microhepatocrito (Fair *et al.*, 2010). Otras técnicas implican la utilización de jeringas para obtener sangre de la vena yugular, punción cardíaca o punción de los vasos en el tibio-tarso (Hoysak & Weatherhead, 1991; Fair *et al.*, 2010). Sin embargo, las dos primeras técnicas requieren de mucha experiencia para no dañar al animal y, aun así, muchas veces ocurren daños que provocan su muerte (Fair *et al.*, 2010). La extracción de sangre de la vena yugular o de los vasos del tibio-tarso suele utilizarse cuando se trata de pichones que no tienen bien desarrolladas las alas y la vena ulnar es muy pequeña. Una vez extraída la sangre, se debe cubrir el punto de la punción con una gasa o algodón y aplicar presión durante 30 a 60 segundos (Rose *et al.*, 2007).



Figura 7. Extracción de sangre de la vena ulnar de un Batitú. Aquí se observa cómo, una vez realizado el pinchazo con la aguja en la vena, la sangre es colectada por capilaridad. Foto: Luciano Liguori.

Otro tipo de muestras

Las plumas son otro tipo de muestras que pueden ser colectadas para estudios de isótopos estables o para análisis genéticos. Si se van a colectar plumas del ala, siempre debe sacarse la misma pluma de ambas alas, ya que las regeneran de a pares. Si al arrancar la pluma se produjera sangrado, deberá liberarse al animal una vez que este haya cesado (Fair *et al.*, 2010).

Para estudio de dieta, muchas veces se colectan muestras del buche o contenido estomacal (Duffy & Jackson, 1986; Rosenberg & Cooper, 1990). En estos casos se debe hacer vomitar al individuo utilizando una cánula que se inserta desde el esófago hasta el proventrículo e introduciendo un emético para inducir el vómito (Gionfriddo *et al.*, 1995; Fair *et al.*, 2010). Esta técnica es bastante invasiva y puede provocar daños a los animales, pero permite detectar ítems de la dieta que no es posible con otros métodos (Prys-Jones *et al.*, 1974; Duffy & Jackson, 1986; Rosenberg & Cooper, 1990). Una técnica no invasiva para el estudio de dieta es el análisis del contenido de las fecas o egagrópilas (Duffy & Jackson, 1986; Rosenberg & Cooper, 1990) en las que es posible encontrar estructuras duras que no son digeridas, como exoesqueletos de artrópodos o restos óseos de vertebrados (Duffy & Jackson, 1986; Rosenberg & Cooper, 1990). Esta técnica tiene la debilidad de no detectar especies de cuerpo blando (ej.: lombrices, lavas) que son completamente digeridas (Duffy & Jackson, 1986; Rosenberg & Cooper, 1990).

Los estudios virológicos en aves requieren muestras de fluidos presentes en la cloaca o la traquea (Rose *et al.*, 2007). El isopado cloacal o traqueal consiste en la introducción de un isopo estéril en la cloaca o la tráquea del individuo para que absorba los fluidos. Luego el isopo debe ser colocado en un tubo y refrigerado para su posterior análisis en el laboratorio (Rose *et al.*, 2007). Esta técnica no genera daños a las aves si es realizada con cuidado y utilizando isopos de medidas adecuadas.

Zoonosis

Los investigadores que trabajan con aves silvestres deben de estar informados de la gran variedad de enfermedades pueden ser transmitidas de aves a humanos. Las enfermedades más comunes son producidas por bacterias y hongos como: campylobacteriosis, histoplasmosis, ornitosis, tuberculosis, salmonelosis, aspergilosis y *Yersinia* spp. (enterocolitis y pseudotuberculosis) (Thomas *et al.*, 2007; Fair *et al.*, 2010). La más conocida de estas enfermedades es una clamidiosis también denominada como ornitosis (o psitacosis) producida por la bacteria *Chamydophila psittaci*, encontrada en más de 120 especies de aves y en algunos mamíferos domésticos (Gerlach, 1986; Andersen & Franson, 2007). Sus síntomas son parecidos a los de la influenza (gripe), y por esto a veces se diagnostica de manera equivocada (Fair *et al.*, 2010). Los investigadores que trabajen con aves y

presenten síntomas como neumonía atípica con disnea, fiebre, dolor en el pecho inexplicable, dolor de garganta o anorexia, etc. deben informar a sus médicos sobre la posibilidad de padecer ornitosis (Fair *et al.*, 2010).

Otra enfermedad que ha generado preocupación debido a su rápida propagación es la influenza aviar. Esta enfermedad es provocada por un grupo de virus divididos en altamente patógenos (HP) y de baja patogenicidad (LP), y los síntomas de contagio son como los de una gripe (Stallkencht *et al.*, 2007). Sin embargo, existen muy pocos casos reportados en la literatura en los cuales haya ocurrido transmisión del virus de un ave silvestre a una persona; la mayoría de los casos de contagio ocurrieron por la manipulación de aves de corral (Stallkencht *et al.*, 2007).

Las medidas de prevención de contagio de cualesquiera de las enfermedades mencionadas incluyen la protección con guantes de látex siempre que se tenga que manipular aves. En los casos que exista sospecha de que el ave está infectada con alguna enfermedad, deberá tomarse mayor precaución con el uso de tapaboca y túnica, realizando la manipulación en un ambiente abierto, o bien ventilado, y una vez finalizada la manipulación, realizar una desinfección de todo el instrumental utilizado.

Métodos alternativos para el estudio de aves en campo

Existen una serie de técnicas no invasivas que son utilizadas por los investigadores que estudian diversos aspectos de la ecología de las aves en su ambiente natural. Algunas de estas técnicas son: observación, conteo, fotografía, filmación, reproducción, registro de cantos y colecta de desechos (fecas y egagrópilas). En cada nuevo proyecto de investigación es recomendable, siempre que sea posible, el reemplazo de metodologías invasivas por técnicas no invasivas, con el fin de minimizar los efectos adversos sobre las aves. Sin embargo, las técnicas no invasivas también pueden generar disturbios en el comportamiento natural de las aves que hay que tener en cuenta (Sekercioglu, 2002).

Para poder observar a las aves en su medio natural es esencial la utilización de binoculares y/o telescopio y guías de identificación. La experiencia es clave para una rápida identificación, y también para reducir los disturbios, ya que el investigador conoce la sensibilidad de las aves a su presencia y los momentos adecuados para su observación (Fair *et al.*, 2010). Para disminuir los disturbios y para una mejor detección de las especies durante el muestreo, una estrategia es reducir el número de investigadores que realizan los registros (idealmente 2) y procurar no hacer ruidos. Cuando se está estudiando el comportamiento o se están tomando registros en áreas de reproducción, dormideros y/o áreas importantes para la alimentación, el investigador debe acercarse lo menos posible, utilizar escondites (como en la figura 2) u observatorios (Fair *et al.*, 2010). Al realizar

conteos o expediciones se deben utilizar los caminos o senderos que ya existan, y en los casos en que no existan, o no sea posible utilizarlos, se debe minimizar la perturbación en el hábitat (Fair *et al.*, 2010).

La grabación y reproducción de sonidos (o playback) de aves silvestres es utilizada como técnica no invasiva para la detección de especies crípticas (especies que se esconden y no son fácilmente detectadas por el observador) (Gibbs & Melvin, 1993; Bibby *et al.*, 1998; Conway & Gibbs, 2005). Esta técnica consiste en grabar el sonido de un ave que se escucha en el campo, pero no se ve, y luego reproducir el sonido. La reproducción del sonido puede atraer al ave que posiblemente confunde su propio canto con el de otro individuo y se acerca a buscarlo (Bibby *et al.*, 1998). Al acercarse el ave el investigador puede identificarla o fotografiarla para su posterior identificación. El uso de esta técnica debe ser limitado a la detección de especies crípticas, ya que su abuso puede generar confusión en las poblaciones de aves que habitan en ese lugar, especialmente cuando se están reproduciendo (Marion *et al.*, 1981).

Como ya fue mencionado anteriormente, algunos estudios de dieta de aves pueden realizarse de forma no invasiva mediante el análisis de fecas o egagrópilas (bolos) que estas desechan naturalmente, o mediante la observación mientras se alimentan (Duke *et al.*, 1976; Martin & Batenson, 1993; Bugoni & Vooren, 2004). Las egagrópilas están compuestas por restos no digeridos (huesos, pelos, escamas, vértebras, otolitos, etc.) de las presas y son expulsadas por la boca en forma de bolos (Duke *et al.*, 1976). Muchas especies de aves marinas, algunos Passeriiformes y algunas aves rapaces (búhos, halcones, águilas) excretan estos bolos (Bugoni & Vooren, 2004). Los bolos, al igual que las fecas, pueden colectarse en los lugares de descanso, dormideros, o en las colonias de nidificación. La colecta no implica contacto alguno con las aves, sin embargo, se debe tener cuidado de generar el mínimo disturbio posible durante la colecta. Por ejemplo, muchas especies de aves marinas como el Gaviotín Sudamericano (*Sterna hirundinacea*) descansan en bandos sobre la arena y estos sitios de descanso van cambiando a lo largo del día (Alfaro *et al.*, 2011). La colecta puede realizarse en los sitios donde las aves ya no están, pero estuvieron recientemente, teniendo en cuenta que haya estado una única especie en el sitio para evitar la colecta de muestras de otras especies (Alfaro *et al.*, 2011). Las observaciones de comportamiento alimenticio deben realizarse desde escondites para no afectar el comportamiento natural de las especies.

Referencias

- Aldaz M F. 2006. Biología reproductiva y cuidado parental en el Hornero Común (*Furnarius rufus*). Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Alfaro M, Mauco L, Norbis W, Lima M. 2011. Temporal variation on the diet of the South American Tern (*Sterna hirundinacea*, Charadriiformes: Laridae) on its wintering grounds. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 451-460.
- Alfaro M. 2017. Aspectos ecológicos de un ave migratoria neártica-neotropical durante la temporada no reproductiva en los pastizales del norte de Uruguay. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas, PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo.
- Alfaro M, Sandercock B K, Liguori L, Arim M. 2018. Body condition and feather molt of a migratory bird during the non-breeding season. *Journal of Avian Biology* 49:jab01480.
- Amat J A. 1999. Foot losses of metal banded snowy plovers. *Journal of Field Ornithology* 70: 555-557.
- Andersen A A, Fransen J C. 2007. Avian Chlamydiosis. En: *Infectious diseases of wild birds* (N J Thomas D, Hunter B, Atkinson C T, eds.). Blackwell Publishing, Iwoa, USA.
- Bart J, Battaglia D, Senner N. 2001. Effects of color bands on Semipalmated Sandpipers banded at hatch. *Journal of Field Ornithology* 72: 521-526.
- Berggren A, Low M. 2004. Leg problems and banding-associated leg injuries in a closely monitored population of North Island robin (*Petroica longipes*). *Wildlife Research* 31: 535-541.
- Bibby C, Martin J, Marsden S. 1998. *Expedition Field Techniques. Bird Surveys*. Expedition Advisory. Center, London.
- Bugoni L, Vooren C M. 2004. Feeding ecology of the Comon Tern *Sterna hirundo* in a wintering area in southern Brazil. *Ibis* 146: 438-453.
- Conway C J, Gibbs J P. 2005. Effectiveness of call-broadcast surveys for monitoring marsh birds. *The Auk* 122: 26-35.
- Dabbert C B, Powell K C. 1993. Serum enzymes as indicators of capture myopathy in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Wildlife Diseases* 29:304-309.
- Day G I, Schemnitz S D, Taber R D. 1980. Capturing and marking wild animals. In: *Wildlife management techniques manual* (Schemnitz S D, ed.). The Wildlife Society, Washington, DC Pp. 61-88.
- De la Peña M R, Rumboll M. 1998. *Birds of southern South América and Antártica*. Harper Collins Publishers, Buenos Aires, Argentina. 320 pp.
- Duffy D C, Jackson S. 1986. Diet studies of seabirds: a review of methods. *Colonial Waterbirds* 9: 1-17.
- Duke G E, Evanson O A, Jegers A. 1976. Meal - to pellet intervals in 14 species of captive raptors. *Comparative Biochemistry and Physiology* 53: 1-6.

- Fetterolf P M, Blokpoel H. 1983. Reproductive performance of Caspian terns at a new colony on Lake Ontario, 1979-1981. *Journal of Field Ornithology* 54: 170-186.
- Fair J, Paul E, Jones J. (Eds.) 2010. *Guidelines to the Use of Wild Birds in Research*. Washington, DC: Ornithological Council.
- Fraga R M. 1980. The breeding of Rufous Horneros (*Furnarius rufus*). *Condor* 82: 58-68.
- Garton E O, Wisdom M J, Leban F A, Johnson B K. 2001. Experimental design for radiotelemetry studies. En: *Radio tracking and animal populations* (Millsbaugh J J, Marzluff J M. eds.), Academic Press, New York, USA.
- Gerlach H. 1986. Chlamydia. En: *Clinical avian medicine and surgery* (Harrison, G J, and L R Harrison, eds). W B Saunders Co., Philadelphia. Pp. 457-463.
- Gibbs J P, Melvin S M. 1993. Call-response surveys for monitoring breeding waterbirds. *The Journal of Wildlife Management* 57: 27-34.
- Gratto-Trevor C. 1994. Banding and foot loss: An addendum. *Journal of Field Ornithology* 65:133-134.
- Griffith S C, Pryke S R, Mariette M. 2008. Use of nest boxes by the Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*) implications for reproduction success and research. *Emu* 108: 311-319.
- Gotelli N J, Graves G R. 1996. *Null models in ecology*. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Götmark F. 1992. The effects of investigator disturbance on nesting birds. Pp. 63-104. En: *Current Ornithology* (Power, D., ed.) Vol. 9. Plenum Press, New York.
- Hannon S J, Eason P. 1995. Colour bands, combs, and coverable badges in willow ptarmigans. *Animal Behaviour* 49: 53-62.
- Harrison P. 1983. *Seabirds, an identification guide*. Houghton Mifflin Company, Boston. 448 pp.
- Hayman P, Marchant J, Prater T. 1986. *Shorebirds: an identification guide to the waders of the world*. Christopher Helm (Publishers), Londres. 412 pp.
- Hoysak D, Weatherhead P J. 1991. Sampling blood from birds: a technique and an assessment of its effect. *The Condor* 93: 746-752.
- Lenzi J, Jiménez S, Caballero D, Alfaro M, Laporta P. 2010. Some aspects of the breeding biology of Royal (*Thalasseus maximus*) and Cayenne terns (*T. sandvicensis eurygnathus*) on Isla Verde, Uruguay. *Ornitología Neotropical* 21: 361-370.
- MacDonald R N. 1961. Injury to birds by ice-coated bands. *Bird Banding* 32: 309-323.
- McGuill M W, Rowan A N. 1989. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. *ILAR News* 31: 5-18.
- Marion W R, O'Meara T E, Maehr D S. 1981. Use of playback in sampling elusive or secretive birds. *Studies in Avian Biology* 6: 81-85.
- Martin P, Bateson P. 1993. *Measuring Behaviour, an Introductory Guide*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Mason P, Rothstein S I. 1986. Coevolution and avian brood parasitism: cowbird eggs show evolutionary response to host discrimination. *Evolution* 40: 1207-1214.
- Møller A P. 1989. Predators and nest boxes: facts and artefacts in nest box studies of birds? *Oikos* 56: 421-423.
- Møller A P. 1992. Nest boxes and the scientific rigour of experimental studies. *Oikos* 63: 309-311.
- Mong T W, Sandercock BK. 2007. Optimizing Radio Retention and Minimizing Radio Impacts in a Field Study of Upland Sandpipers. *Journal of Wildlife Management* 71: 971-980.
- Narosky T, Yzurieta D. 1993. Guía para la identificación de las aves de Argentina y Uruguay. Vázquez Mazzini eds., Argentina. 345 pp.
- Nisbet ICT. 2000. Disturbance, habituation, and management of waterbird colonies - commentary. *Waterbirds* 23:312-332.
- Nisbet ICT, Paul E. 2004. Ethical issues concerning animal research outside the laboratory. *ILAR Journal* 45: 375-377.
- Pennycuik C J, Fast PLF, Ballerstädt N, Rattenborg N. 2012. The effect of an external transmitter on the drag coefficient of a bird's body, and hence on migration range and energy reserves after migration. *Journal of Ornithology* 153: 633-644.
- Prys-Jones R P, Schifferly L, MacDonald D W. 1974. The use of an emetic in obtaining food samples from passerines. *Ibis* 116: 90-94.
- Purchase D, Minton CDT. 1982. Possible capture myopathy in Bar-tailed Godwits *Limosa lapponica* in Australia. *Wader Study Group Bulletin* 34: 24-26.
- Ralph C J, Geupel G R, Pyle P, Martín T E, De Sante D F. 1993. Handbook of field methods for monitoring landbirds. Forest Service, United State Department of Agriculture. General Technical Report PSW-GTR-144.
- Reed J, Oring L. 1993. Banding is infrequently associated with foot loss in spotted sandpipers. *Journal of Field Ornithology* 64: 145-148.
- Rodway M S, Montevicchi W A, Chardine J W. 1996. Effects of investigator disturbance on breeding success of Atlantic puffins *Fratercula arctica*. *Biological Conservation* 76: 311-319.
- Rogers D I, Battley P F, Sparrow J, Koolhaas A, Hassell C J. 2004. Treatment of capture myopathy in shorebirds: a successful trial in northwestern Australia. *Journal of Field Ornithology* 75: 157-164.
- Rose K, Newman S, Uhart M, Lubroth J. 2007. Vigilancia de la influenza aviar altamente patógena en las aves silvestres. Toma de muestras de aves sanas, enfermas y muertas. FAO Producción y sanidad animal, Manual. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, Roma.
- Rosenberg K V, Cooper R J. 1990. Approaches to avian diet analysis. *Studies in Avian Biology* 13: 80-90.

- Sedgwick J A, Klus R J. 1997. Injury due to leg bands in Willow Flycatchers. *Journal of Field Ornithology* 68: 622-629.
- Sekercioglu C H. 2002. Impacts of birdwatching on human and avian communities. *Environmental Conservation* 29: 282-289.
- Stallkencht D E, Nagy E, Hunter D B, Slemmons R D. 2007. Avian influenza. En: *Infectious diseases of wild birds* (N J Thomas, D B Hunter y C T Atkinson, eds.). Blackwell Publishing, Iwoa, USA.
- Thomas N J, Hunter D B, Atkinson C T. 2007. *Infections diseases of wild birds*. Blakwell Publishing, Iowa, USA.
- Tosi R. 2015. Coevolución entre un parásito de cría, el Tordo Común (*Molothrus bonariensis*), y uno de sus hospedadores, el Hornero (*Furnarius rufus*): defensas antiparasitarias y contradefensas del parásito. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA, Universidad de la República, Montevideo.
- Vuillaume A. 1983. A new technique for taking blood samples from ducks and geese. *Avian Pathology* 12: 389-391.
- Westmoreland D, Best L B. 1985. The effect of disturbance on mourning dove nesting success. *Auk* 102: 774-780.
- White G C, Garrott R A. 1990. *Analysis of wildlife radio-tracking data*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Withey J C, Bloxton T D, Marzluff J M. 2001. Effects of tagging and location error in wildlife radiotelemetry studies. En: *Radio tracking and animal populations* (J J Millsaugh y J M Marzluff, eds.), Academic Press, New York, USA.
- Yorio P, Quintana F. 1996. Efectos del disturbio humano sobre una colonia mixta de aves marinas en Patagonia. *Hornero* 14:60-66.
- Yorio P, Gandini P, Frere E. Disturbios humanos sobre las aves marinas: efectos sobre la reproducción y su relación con el manejo de visitantes a las colonias. *Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica N° 23*, Puerto Madryn, Argentina.

CAPÍTULO 12

Avances de estudios en Uruguay: experimentación en mitigación de la captura incidental de aves marinas en pesquerías industriales

Sebastián Jiménez¹ - Andrés Domingo²

La captura incidental en las pesquerías industriales constituye una de las principales amenazas para las aves marinas a nivel global. En particular, los albatros (*Diomedidae*) y los petreles (*Procellariidae*) son las especies más afectadas (Phillips *et al.*, 2016), con un gran número de especies listadas en alguna categoría de amenaza de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Croxall *et al.*, 2012). Las principales pesquerías que afectan a estas especies son las de palangre y arrastre (Croxall, 2008; Anderson *et al.*, 2011). La captura incidental en las pesquerías de palangre se debe a que las aves marinas intentan alimentarse de las carnadas, principalmente durante el calado, lo que a menudo lleva a que algunas aves queden enganchadas en los anzuelos o enredadas en las líneas (Fig. 1).

-
- 1 Laboratorio de Recursos Pelágicos, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Uruguay. jimenezpsebastian@gmail.com
 - 2 Laboratorio de Recursos Pelágicos, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Uruguay. adomingo@dinara.gub.uy



Figura 1. Albatros ceja negra (*Thalassarche melanophris*) intentando alimentarse de un anzuelo encarnado con calamar en la pesca con palangre pelágico. Las aves pueden quedar capturadas en los anzuelos o enredadas en las brazoladas, principalmente durante el calado del palangre. Esto constituye la principal fuente de mortalidad de albatros y petreles en estas pesquerías a nivel global. Foto: Philip Miller.

En la pesca con arrastre, las aves marinas pueden engancharse y quedar atrapadas en la red al intentar alimentarse de la captura. A su vez, mientras se alimentan de los descartes o restos del procesado a bordo de la captura, las aves colisionan contra los cables que arrastran la red (Fig. 2), resultando en lesiones graves o la muerte.



Figura 2. Albatros ceja negra (*Thalassarche melanophris*) en la pesca de arrastre de altura próximos a la popa de un barco pesquero de arrastre de altura. Se observa uno de los cables de la red de arrastre. La colisión y enredos con estos cables son una de las principales fuentes de mortalidad de albatros en las pesquerías de arrastre a nivel global. Foto: S. Jiménez.

Esta problemática global ha generado iniciativas internacionales para reducir la mortalidad de aves marinas en pesquerías. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) elaboró el Plan de Acción Internacional para Reducir la Captura Incidental de Aves Marinas en las Pesquerías de Palangre (PAI- Aves Marinas). Este documento propicia la elaboración de un Plan de Acción Nacional en cada país miembro que haya detectado la problemática. Otra iniciativa de gran relevancia es el Acuerdo sobre la Conservación de Albatros y Petreles (ACAP), que actualmente cuenta con 13 países, entre ellos Uruguay, el cual tiene como objetivo alcanzar y mantener un estado de conservación favorable para los albatros y petreles. Alrededor del mundo se han desarrollado varias medidas de mitigación, tanto para las pesquerías de palangre como para las de arrastre, y para varias de ellas se han realizado investigaciones para determinar su efectividad en reducir la mortalidad de aves marinas (Bull, 2009; Løkkeborg, 2011). En el contexto de ACAP, la información científica disponible es evaluada periódicamente por el Grupo de Trabajo sobre Capturas Incidentales de Aves Marinas del ACAP (SBWG, por su sigla en inglés), donde luego se recomiendan las mejores prácticas para cada pesquería (<https://acap.aq/en/resour->

ces/bycatch-mitigation/mitigation-advice). Estas medidas pueden ser a menudo adoptadas por los países y consideradas en las organizaciones regionales de pesca que manejan recursos pesqueros compartidos (e. g. Comisión Internacional para la Conservación del Atún Atlántico, CICA, entre otras).

Uruguay, siguiendo las recomendaciones de FAO, publicó en el año 2007 su Plan de Acción Nacional para Reducir la Captura incidental de Aves Marinas en las Pesquerías Uruguayas, PAN-Aves Marinas Uruguay (Domingo *et al.*, 2007). Este documento fue revisado y actualizado en 2015 (Jiménez *et al.*, 2015). Dicho plan, además de establecer las medidas de mitigación requeridas en cada pesquería que interactúan con las aves marinas (Fig. 3), enumera las necesidades de investigación en medidas de mitigación. Para implementarlas, es necesario definir cómo proceder en las investigaciones que involucren la experimentación con animales. En Uruguay, los procedimientos para la utilización de animales en actividades de investigación, docencia e investigación científica deben llevarse a cabo bajo la Ley N° 18.611. Con el fin de dar cumplimiento a la ella, la DINARA creó, el 5 de setiembre de 2011 por Resolución N° 950/11, la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA). Dicha Comisión tiene, entre otros cometidos, evaluar los procedimientos que se aplican en aquellos estudios y proyectos de investigación ejecutados por DINARA. La experimentación con aves marinas es considerada dentro de la experimentación con animales no-tradicionales, donde varios de los métodos establecidos para animales convencionales de experimentación no aplican y donde la regulación de sus procedimientos, de naturaleza novedosa, muchas veces no está prevista en las normativas, exigiendo una responsabilidad adicional. El objetivo de este capítulo es discutir los aspectos relacionados a la experimentación con aves marinas para evaluar la efectividad de las medidas de mitigación en pesquerías y realizar recomendaciones de cómo debería procederse en Uruguay con respecto a este tipo de experimentación en animales no tradicionales.



Figura 3. Algunas medidas de mitigación usadas en Uruguay en palangre pelágico. Arriba: línea espantapájaros (Domingo *et al.*, 2017). Esta medida de mitigación ahuyenta a las aves de la zona donde se están hundiendo los anzuelos encarnados. Abajo: pesos en las brazoladas (Jiménez *et al.*, 2019). Los pesos colocados próximos a los anzuelos incrementan significativamente la tasa de hundimiento de los anzuelos encarnados, reduciendo su exposición a las aves. Fotos: S. Jiménez.

Experimentación en mitigación

Mediante revisiones periódicas, ACAP ha desarrollado criterios y definiciones (<https://acap.aq/en/resources/bycatch-mitigation/mitigation-advice>) que deben reunir las medidas de mitigación para ser consideradas dentro de las mejores prácticas. El primer criterio, y de relevancia para el presente capítulo, reconoce como mejores prácticas en la mitigación de la captura incidental a la o las tecnologías o técnicas que cumplen con: “haber sido seleccionada/s a partir de aquellas que han mostrado a través de investigación experimental una reducción significativa de las tasas de captura incidental de aves marinas a los mínimos niveles alcanzables”. También se enuncia en este criterio que “la experiencia ha mostrado que las investigaciones experimentales que comparan el desempeño de potenciales tecnologías de mitigación contra un control sin ninguna medida, cuando es posible, o con el *statu quo* de la pesquería, son las que han brindado resultados concluyentes”. Cabe mencionar, que varias de estas investigaciones requieren de la captura de aves marinas como variable respuesta, lo cual plantea un posible cuestionamiento ético. A su vez, si se considera que lo que se pretende es mejorar el estado de las poblaciones de aves marinas, y que varias de estas especies están amenazadas, este tema requiere ser abordado con una responsabilidad adicional. Muchos de estos experimentos, son de suma relevancia para la conservación, ya que aquellas medidas de mitigación con demostrada eficiencia, una vez implementadas pueden, en determinados períodos, resultar en la prevención de la muerte de decenas o incluso centenas de miles de aves (ACAP, 2013).

En pesquerías donde existen medidas de mitigación implementadas, la comparación de una nueva medida de mitigación contra un “control” (tratamiento sin medidas de mitigación) plantea una situación en la cual se puede generar niveles de mortalidad mayores al *statu quo* de la pesquería. Cuando no hay medidas de mitigación implementadas en una pesquería, el control representa al *statu quo* de la pesquería. En este caso, cualquier medida de mitigación propuesta que se compare contra el *statu quo* presupone una menor exposición de los animales al riesgo de resultar muertos, lesionados o sufrir dolor. Este tipo de investigación se considera no letal. Sin embargo, el primer caso se define como “experimento letal”: “aquel que utiliza una métrica letal, que puede elevar las muertes de aves marinas por encima del nivel de captura incidental que se habría producido en operaciones de pesca normales” (Pierre & Debski, 2013). Una métrica letal refiere a una variable respuesta experimental que comprenda la muerte, o potencialmente una lesión letal, en aves marinas (Pierre & Debski, 2013). Es importante mencionar que los “niveles de mortalidad” generalmente son analizados como tasas de mortalidad, por ejemplo, número de aves muertas cada 1.000 anzuelos, o por horas de arrastre, dependiendo el arte de pesca. Estas métricas son relativas al esfuerzo de pesca y no necesariamente informativas para un protocolo de experimentación animal (e. g. una tasa de mortalidad de 0,5 aves/1.000 anzuelos

puede resultar de 5 o 500 aves capturadas en diez mil o un millón de anzuelos, respectivamente). Para estos fines sería más apropiado el número de aves marinas potencialmente expuestas a resultar muertas, lesionadas y/o sufrir dolor.

La normativa uruguaya (Ley N° 18.611, Decreto N° 78/014), considera la aproximación de las tres erres, reemplazo, reducción y refinamiento, de acuerdo con la filosofía aceptada internacionalmente de Russell y Burch (1959). El reemplazo refiere al empleo de métodos que no requieren el uso de animales para alcanzar los objetivos científicos; la reducción hace referencia a métodos que permiten a los investigadores obtener niveles comparables de información a partir de un menor número de animales u obtener más información a partir del mismo número de animales; y el refinamiento refiere a métodos para prevenir, aliviar o reducir al mínimo el dolor, angustia, malestar daños duraderos, conocidos y eventuales, y mejorar el bienestar de los animales usados o para sustituir animales superiores por aquellos de sensibilidad neurofisiológica inferior. En este contexto, a continuación, se abordan varios aspectos que tienen incidencia en la elección de la experimentación en la mitigación de la mortalidad de aves marinas en pesquerías.

El reemplazo puede en algunas ocasiones ser parte de la investigación en medidas de mitigación. Por ejemplo, en las pesquerías de palangre, el aumento en las tasas de hundimiento de los anzuelos encarnados puede ser útil para disminuir la captura incidental de aves. La búsqueda de regímenes de pesos, materiales, etc., puede ser investigada sin la necesidad de aves marinas; por ejemplo, midiendo la tasa de hundimiento de los anzuelos en brazoladas con distintas configuraciones de pesos (Robertson et al., 2013). Sin embargo, la eficiencia de la medida que tenga la mejor chance de disminuir la mortalidad de aves marinas tiene que ser testada en instancias posteriores con aves marinas. Además, es generalmente necesario reunir evidencia sustancial para que estas medidas sean evaluadas y adoptadas en las organizaciones regionales de pesca. Aquí es cuando deben considerarse los métodos que llevan a la reducción.

Un aspecto importante a tener en cuenta es que las especies consideradas en el presente documento se encuentran muchas de ellas globalmente amenazadas. Por ejemplo, en la Tabla 1 se muestran las principales especies que interactúan con las pesquerías industriales uruguayas y el tamaño de las poblaciones de las cuales proviene cada especie. Los albatros y petreles presentan características de historias de vida extremas, con una muy baja fecundidad, altas tasas de sobrevivencia y una gran longevidad. El impacto de las capturas incidentales no es similar en todas las especies, y la muerte de muy pocos individuos puede causar una disminución poblacional importante en algunas de ellas (Tabla 1). Por lo tanto, cualquier experimentación en mitigación de la mortalidad de aves en pesquerías debe prevenir al mínimo la mortalidad de las especies más sensibles. El estatus de conservación global y/o nacional y el riesgo que puede

significar la mortalidad de individuos para su población deben ser aspectos decisivos a la hora de diseñar el experimento. En algunas poblaciones claramente no se justifica la captura de ningún individuo (e. g. Albatros Errante *Diomedea exulans*, véase Tabla 1) debido a sus pequeños tamaños poblacionales.

Tabla 1. Principales poblaciones de aves marinas asociadas a pesquerías industriales en Uruguay, tamaños poblacionales y Nivel Potencial de Remoción Biológica (PBR; umbral del número de muertes adicionales que una población puede sostener anualmente; datos extraídos de Jiménez *et al.*, 2012b). El estatus de conservación global y nacional según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN; Azpiroz *et al.*, 2012; BirdLife International 2018).

Especies	UICN Global	UICN Nacional	Poblaciones (Islas o Archipiélagos)	Número de parejas anuales	PBR
<i>Diomedea exulans</i>	VU	EN	South Georgia	1420	20
<i>Diomedea dabbenena</i>	CR	-	Gough	1514	22
<i>Diomedea epomophora</i>	VU	NT	Campbell	7800	112
<i>Diomedea sanfordi</i>	EN	EN	Chatham	5800	83
<i>Thalassarche steadi</i>	NT	NT	Auckland Group	97089	2803
<i>Thalassarche melanophris</i>	LC	LC	Islas Malvinas	399416	3844
			South Georgia	74296	715
<i>Thalassarche chlororhynchos</i>	EN	EN	Tristan da Cunha	21700-35800	277
			Gough	5300	51
<i>Phoebastria fusca</i>	EN	-	Tristan da Cunha, Gough	7625-8750	-
<i>Macronectes halli</i>	LC	LC	South Georgia, otras islas subantárticas	4310	-
<i>Macronectes giganteus</i>	LC	LC	Argentina (islas Gran Robredo, Observatorio, Arce, de los Estados)	2831	-
			South Georgia	5500	
<i>Procellaria aequinoctialis</i>	VU	VU	South Georgia	889122	9385
<i>Procellaria conspicillata</i>	VU	LC	Tristan da Cunha	14400	152
<i>Daption capensis</i>	LC	LC	Antártida, varias islas subantárticas	2000000	-
<i>Fulmarus glacialis</i>	LC	LC	Antártida, varias islas subantárticas	4000000	-
<i>Puffinus gravis</i>	LC	LC	Tristan da Cunha, Gough	6000000	-

Otro aspecto relevante, vinculado a la reducción, es el tamaño de la muestra. Es deseable reducir al mínimo en la experimentación letal el número de animales expuestos. Por lo tanto, es importante considerar el poder estadístico para predecir los niveles adecuados de muestreos necesarios para obtener conclusiones. Previo a los experimentos, y basado en información previa o publicada, debería estimarse el número mínimo de lances de pesca e individuos necesarios para obtener conclusiones. De esta manera se pueden establecer límites de capturas incidentales. Se trata de no generar la muerte, la exposición al dolor o lesiones duraderas, de forma innecesaria, sin que se llegue al resultado científico esperado, útil para la conservación. Es importante destacar que, desde el punto de vista estadístico, la captura incidental es un evento raro (la mayoría de los lances de pesca no presentan captura de aves) y muchas veces los niveles de variación son altos o desconocidos, lo que puede dificultar la estimación de los límites de captura (Pierre & Debski, 2013). En estos casos podrían estimarse límites en base a los niveles mínimos de mortalidad que pueden causar una disminución en la población (véase Tabla 1), por ejemplo, considerándose un porcentaje de estos valores para las especies en cuestión.

El tiempo de exposición durante un lance de pesca o tratamiento del experimento, es un aspecto relevante a considerar, ya que puede poner en riesgo más animales de los deseados. También es importante considerar la actividad de forrajeo de estas especies, y sus variaciones en abundancia de acuerdo con las áreas y épocas de año. Estas especies son predadores visuales, por lo que durante el día pueden detectar con mayor facilidad el hundimiento de los anzuelos encarnados en la pesca con palangre (Jiménez *et al.*, 2009; 2014); aspecto altamente importante a considerar en el testeo de medidas de mitigación.

El primer criterio arriba citado para definir las mejores prácticas de ACAP, también indica: "Cuando se demuestre una relación significativa entre el comportamiento de las aves marinas y la mortalidad de aves marinas en un sistema particular o en conjunto de aves marinas, las reducciones significativas en el comportamiento de las aves marinas, como la tasa de ataques de aves marinas a los anzuelos encarnados, pueden servir como un *proxy* de la reducción de la mortalidad de aves marinas". Por lo tanto, algunas métricas pueden ser usadas como aproximaciones a las capturas, y de esta manera aplicar el criterio de refinamiento. Los ataques a las carnadas en palangre o las colisiones con los cables de red en arrastre no necesariamente resultan en la mortalidad, por lo que pueden ser usados como aproximaciones de la captura incidental o mortalidad, respectivamente (Jiménez *et al.*, 2012a; Sullivan *et al.*, 2006), ya que son más frecuentes y están correlacionados con estas últimas. La utilización de estas aproximaciones puede disminuir el número de aves capturadas necesarias para determinar la eficiencia de una medida de mitigación. Estas aproximaciones también pueden reducir el tiempo necesario y el costo del experimento. Sin embargo, la relación entre la captura y sus aproximaciones no siempre es muy clara y esto

puede variar entre especies. Es importante tener en cuenta que algunos de los individuos que atacan las carnadas en palangre o colisionan con los cables en la pesca de arrastre, pueden resultar muertos. Una excepción a esto encontrada en la literatura refiere a la pesca con palangre pelágico, donde los anzuelos encarnados fueron modificados para que las aves no resultaran capturadas durante los ataques (Boggs, 2001). También debe considerarse que, en ciertas regiones con gran densidad de individuos y riqueza de especies que interactúan con los artes de pesca, estas medidas indirectas de interacción pueden resultar difíciles de cuantificar. Además, las observaciones requieren ser realizadas durante el día y en condiciones de moderada a buena visibilidad, lo que aumenta el riesgo de mortalidad para las aves.

Recomendaciones sobre la experimentación en medidas de mitigación

Se recomienda que las medidas de mitigación a experimentar tengan grandes posibilidades, ya sea por antecedentes en otros lugares, recomendaciones de comisiones o grupos de expertos o porque abordan rigurosamente detalles del comportamiento de las especies, modificaciones en el arte de pesca y/o nuevas tecnologías, de disminuir significativamente la captura incidental de aves marinas.

Una vez definidas estas medidas, se recomienda que, siempre que sea posible, tanto bajo regímenes de experimentación letal o no letal, se evite la muerte de animales, por ejemplo, utilizando aproximaciones como los ataques a las carnadas en palangre. Cuando fuese posible, se recomienda que se utilicen aproximaciones, que disminuyan al mínimo la probabilidad de muertes, lesiones duraderas o dolor en los animales.

Cuando el punto anterior no sea posible, se deberían establecer previamente límites de captura en número de individuos, considerando las tendencias y tamaños poblacionales. En estos casos se debería establecerse cuáles serían las especies potencialmente afectadas, y los números de aves que podrían capturarse por especie, considerando rigurosamente la información existente. Para aquellas especies con poblaciones seriamente comprometidas, los experimentos no justificarían su captura incidental, y deberían tomarse todas las precauciones para disminuir al mínimo la probabilidad de que ocurra su captura incidental.

Referencias

- Agreement on the Conservation of Albatrosses and Petrels 2013. Report of the Seventh Meeting of the Advisory Committee. May 2013. La Rochelle, France.
- Anderson O, Small C, Croxall J, Dunn E, Sullivan B, Yates O, Black A. 2011. Global seabird by-catch in longline fisheries. *Endangered Species Research* 14, 91-106

- Azpiroz A B, Alfaro M, Jiménez S. 2012. Lista Roja de las Aves del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la avifauna nacional con base en los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.
- BirdLife International (2018) IUCN Red List for birds. <http://www.birdlife.org>
- Boggs C H. 2001. Deterring albatrosses from contacting baits during swordfish longline sets, In *Seabird Bycatch: Trends, Roadblocks, and Solutions*. Eds. E F Melvin, J K Parrish. University of Alaska Sea Grant, Fairbanks.
- Bull L S. 2009. New mitigation measures reducing seabird by-catch in trawl fisheries. *Fish and Fisheries* 10, 408-427.
- Croxall J P. 2008. Seabird mortality and trawl fisheries. *Animal Conservation* 11, 255-256.
- Croxall J P, Butchart S HM, Lascelles B, Stattersfield A J, Sullivan B, Symes A, Taylor P. 2012. Seabird conservation status, threats and priority actions: a global assessment. *Bird Conservation International* 22: 1-34.
- Domingo A, Jiménez S, Abreu M, Forselledo R, Yates O. 2017. Effectiveness of tori line use to reduce seabird bycatch in pelagic longline fishing. *PLoS ONE* 12(9): e0184465
- Domingo A, Jiménez S, Passadore C. 2007. Plan de Acción Nacional para Reducir la Captura Incidental de Aves Marinas en las Pesquerías Uruguayas. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos.
- Jiménez S, Domingo A, Forselledo R, Sullivan BJ, Yates O. 2019. Mitigating bycatch of threatened seabirds: the effectiveness of branch line weighting in pelagic longline fisheries. *Animal Conservation* 22: 376–385.
- Jiménez S, Pin O, Domingo A. 2015. Plan de Acción Nacional para Reducir la Captura Incidental de Aves Marinas en las Pesquerías Uruguayas. En: Domingo A, Forselledo R, Jiménez S, eds. *Revisión de Planes de Acción Nacional para la Conservación de Aves Marinas y Condriictios en las Pesquerías Uruguayas*. Montevideo: Dirección Nacional de Recursos Acuáticos pp. 11-79.
- Jiménez S, Phillips R A, Brazeiro A, Defeo O, Domingo A. 2014. Bycatch of great albatrosses in pelagic longline fisheries in the southwest Atlantic: Contributing factors and implications for management. *Biological Conservation* 171: 9-20.
- Jiménez S, Domingo A, Abreu M, Brazeiro A. 2012a. Bycatch susceptibility in pelagic longline fisheries: are albatrosses affected by the diving behaviour of medium-sized petrels? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 22: 436-445.
- Jiménez S, Domingo A, Abreu M, Brazeiro A. 2012b. Risk assessment and relative impact of Uruguayan pelagic longliners on seabirds. *Aquatic Living Resources* 25: 281-295.
- Jiménez S, Domingo A, Brazeiro A. 2009. Seabird bycatch in the Southwest Atlantic: interaction with the Uruguayan pelagic longline fishery. *Polar Biology* 32, 187-196.
- Løkkeborg S. 2011. Best practices to mitigate seabird bycatch in longline, trawl and gillnet fisheries—efficiency and practical applicability. *Marine Ecology Progress Series* 435, 285-303.

- Phillips R, Gales R, Baker G, Double M, Favero M, Quintana F, Tasker M, Weimerskirch H, Uhart M, Wolfaardt A. 2016. The conservation status and priorities for albatrosses and large petrels. *Biological Conservation* 201: 169-183
- Pierre J, Debski I. 2013. Use of lethal and non-lethal approaches for testing seabird bycatch reduction methods, In Fifth Meeting of the Seabird Bycatch Working Group. Agreement on the Conservation of Albatrosses and Petrels La Rochelle, France.
- Robertson G, Candy S G, Hall S. 2013. New branch line weighting regimes to reduce the risk of seabird mortality in pelagic longline fisheries without affecting fish catch. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 23:885-900.
- Sullivan B J, Reid T A, Bugoni L. 2006. Seabird mortality on factory trawlers in the Falkland Islands and beyond. *Biological Conservation* 131: 495-504.



CAPÍTULO 13

Captura y manejo de mamíferos medianos y grandes en el campo

Ariel Farías^{1,2}

En este capítulo se abordan métodos para la captura y manipulación de mamíferos medianos y grandes (*i. e.* macromamíferos: > 1 kg) en el campo, con especial énfasis en carnívoros (*i. e.* Orden Carnivora). Si bien muestran hábitos diversos, muchas especies son raras (*i. e.* muestran baja abundancia, incidencia y/o detectabilidad), requiriéndose frecuentemente la captura de individuos para obtener registros confiables. Pero es justamente sobre los mamíferos de mayor porte donde se imponen los estándares éticos y de bienestar animal más estrictos, planteando un desafío para la investigación en fauna silvestre. Por lo general, ésta requiere obtener información directamente de la especie de interés, por lo que su *reemplazo* (*i. e.* primera de las tres erres de Russell & Burch, 1959, Lane & McDonald, 2010) por otra especie, modelos físicos o cultivos en laboratorio no suele representar una opción viable. El uso de modelamiento matemático puede representar una alternativa si existe información suficiente sobre parámetros relevantes de la especie focal. A su vez, el criterio de *reducción* (*i. e.* segunda R, *cf.* Russell & Burch, 1959; Lane & McDonald, 2010) es de difícil aplicación, ya que el número de individuos afectados no es totalmente controlable debido a la baja selectividad y eficiencia de la mayoría de los dispositivos de captura para macromamíferos, y resulta difícil prever los efectos que la manipulación de un individuo puede tener sobre otros individuos y poblaciones en el ambiente natural. La ejecución de estudios piloto y la experiencia previa pueden mitigar en algún grado estas deficiencias. En este contexto, el *refinamiento* (*i. e.* tercera erre, Russell & Burch, 1959; Lane & McDonald, 2010) de los métodos de estudio se vuelve altamente relevante para el diseño de protocolos con este tipo de especies.

La captura y manipulación de individuos puede representar la única forma de cumplir con los objetivos de un estudio; por ejemplo: obtener medidas morfológicas o de condición corporal, extraer muestras de tejido (*e. g.* análisis

1 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, Udelar. Uruguay.

2 Centro de Ecología Aplicada y Sustentabilidad (CAPES), Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile - ariel.farias@cure.edu.uy

genético, isotópico o parasitológico), establecer barreras sanitarias (e. g. vacunación, desparasitado), marcar individuos para estudios poblacionales o de comportamiento, controlar poblaciones (e. g. esterilización, eutanasia, translocación), o colocar radio-collares e implantes (e. g. transmisores intraperitoneales, chips de identificación). En otros casos, la captura representa la forma más directa de colecta de datos, entregando información más certera sobre parámetros biológicos de interés. Sin embargo, los animales capturados son sometidos a niveles importantes de estrés que pueden afectar su salud y desempeño, e influir sobre la calidad de los datos. Por consiguiente, su captura y manipulación debe estar plenamente justificada, tanto en términos logísticos (*i. e.* recursos económicos, humanos, materiales y de tiempo) como bioéticos y de bioseguridad, lo que involucra un análisis de costo/beneficio ponderando la ganancia de información y su relevancia, contra el bienestar animal (Powell & Proulx, 2003; Lane & McDonald, 2010; Prolux *et al.*, 2012). Esto podría desembocar en el reemplazo de la captura por técnicas alternativas menos precisas, pero también menos invasivas (ver más abajo), o incluso en el abandono completo del estudio o de alguno de sus objetivos si no existen alternativas satisfactorias. A continuación se describen guías básicas para la captura y manipulación de macromamíferos. Luego, se describen técnicas alternativas menos invasivas, el tipo de información que puede extraerse de ellas, y sus principales limitaciones logísticas.

Diseño de muestreo

La captura de macromamíferos es costosa y riesgosa, tanto para éstos como para el personal involucrado, y requiere planificación y ejecución cuidadosas considerando aspectos de bienestar animal y bioseguridad (Lane & McDonald, 2010; Prolux *et al.*, 2012). Las restricciones logísticas son también importantes en el estudio de estas especies. Las trampas suelen tener un alto costo económico. Además, cuanto mayor sea el porte de la especie focal, mayor es también el tamaño de trampa adecuado, mayor su rango de hogar, y menor su densidad poblacional, y por lo tanto mayor el área de muestreo, su costo económico, y los riesgos asociados a su manipulación.

Existe una gran variedad de técnicas de captura, cuya efectividad varía tanto con la especie objetivo como con las características del área y el período de estudio (Krebs, 2006; Wheeler *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012). Abarcan desde el rastreo, persecución e inmovilización activa de los animales (*i. e.* generalmente de gran tamaño, difíciles de confinar en recintos cerrados), hasta la disposición de trampas en puntos fijos, siguiendo un diseño de muestreo aleatorio, sistemático u oportunista (*i. e.* dirigido a lugares con mayor actividad). Si se desean estimaciones confiables y precisas de abundancia poblacional sobre un área, lo ideal es disponer los dispositivos de captura en forma aleatoria o, en su defecto, siguiendo algún diseño sistemático (e. g. grilla) y/o estratificado (Krebs, 2006; La-

gos & Villalobos, 2012). Como regla general, si el número de muestras asequible es lo suficientemente elevado para asegurar una buena distribución de ellas en el espacio y el tiempo, se recomienda usar un diseño completamente aleatorio. Dado los costos logísticos, esto es muy difícil de lograr con las especies tratadas en este capítulo. En cambio, debe frecuentemente acudirse a la estratificación o el uso de bloques para garantizar una buena representación y control de la variabilidad ambiental natural, y/o al uso de diseños sistemáticos para garantizar una buena cobertura espacial y temporal de las unidades de muestreo (Krebs, 2006). Es común también usar diseños mixtos, incorporando un componente aleatorio y uno sistemático a distintos grados de resolución espacial o temporal; por ejemplo, distribuir sistemáticamente puntos de muestreo sobre transectos establecidos en forma aleatoria (*i. e.* aleatorio/sistemático), o localizar aleatoriamente una o más unidades de muestreo en celdas de una grilla regular (*i. e.* sistemático/aleatorio).

Aun así, la complejidad inherente al estudio de macromamíferos puede limitar la utilización correcta de cualesquiera de los diseños mencionados arriba. El costo y tamaño de las trampas, y la disponibilidad de personal para su operación y seguimiento, pueden determinar que sólo un número limitado de aquellas puedan ser operadas simultáneamente. En esos casos se recurre a diseños de muestreo que maximizan la probabilidad de captura y reducen el tiempo de viaje entre dispositivos; por ejemplo, diseños adaptativos donde el número y disposición de las trampas se evalúa y ajusta constantemente en función de los registros (Krebs, 2006; Lagos & Villalobos, 2012). Otra posibilidad es realizar muestreos dirigidos sobre porciones del hábitat que presenten mayor probabilidad de ser frecuentadas por la especie de interés (Lagos & Villalobos, 2012). Bajo ciertos supuestos, el uso de técnicas de marcaje-recaptura siguiendo este diseño brinda estimaciones de abundancia costo-eficientes, pero con menor precisión y mayor sesgo que los métodos mencionados más arriba. Aun así, cuando el objetivo principal del trampeo es obtener muestras de tejido u otro tipo de información de los individuos, o realizar algún procedimiento (*e. g.* marcaje, implantes), los muestreos dirigidos suelen ser los más eficientes (Lane & McDonald, 2010).

El número de trampas y la extensión del área de estudio debe permitir la captura y procesamiento de un número adecuado de individuos (Lane & McDonald, 2010). Un bajo esfuerzo de muestreo (*i. e.* pocas trampas y/o áreas de estudio pequeñas) conllevará bajas tasas de captura y bajo poder estadístico, derrochando recursos y tiempo para obtener información poco valiosa de individuos sometidos al estrés del proceso. Por otro lado, muestreos sobre áreas muy extensas, con largos traslados entre trampas y/o un número elevado de éstas, conllevarán un número de capturas mayor al que puede ser procesado, largos tiempos de espera, y mayores niveles de estrés y riesgo para la salud de los individuos, cuyo procesamiento adecuado puede involucrar hasta dos horas, dependiendo de su condición y del objetivo del estudio. Esto limita no sólo el

número de capturas que puede procesarse debidamente en una jornada, sino también el tiempo máximo de espera que debe soportar un animal. Por ejemplo, si se capturan tres individuos, el último individuo deberá esperar en la trampa el tiempo que lleve llegar hasta el lugar, más el tiempo de procesamiento de los otros individuos. Si fue capturado poco después de activar la trampa, la espera total podría prolongarse por una jornada completa. Aun así, si resultara necesario realizar muestreos sobre áreas extensas, se requerirá un personal numeroso, que involucre dos o más personas capacitadas (*e. g.* veterinarios) para procesar simultáneamente más de un individuo, y otros integrantes que revisen las trampas restantes, notifiquen eventuales capturas, y custodien y apliquen medidas de reducción de estrés sobre los individuos en espera. En todos los casos, es siempre recomendable realizar estudios piloto para estimar tanto las tasas de captura esperables como la capacidad de reacción y coordinación del personal involucrado.

Dispositivos y métodos de captura

La selección del dispositivo de captura más adecuado dependerá de la biología de la especie focal, y condicionará el diseño de muestreo. A continuación se describen algunos de los más utilizados para macromamíferos, principalmente carnívoros.

Las trampas de caja o jaula son uno de los dispositivos más ampliamente utilizados para captura viva (Fig. 1). Se componen de un cubículo cerrado con una o dos puertas móviles conectadas a un gatillo, normalmente en forma de piso falso (Powell & Proulx, 2003; Krebs, 2006; Wheeler *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012). Cuando un animal se introduce en la trampa, pisa el gatillo y la presión se transmite por un cable o barra de metal liberando un cerrojo o gancho que mantiene la puerta abierta, cerrando el dispositivo. Según el tipo de trampa, la puerta puede caer en forma de guillotina (*i. e.* verticalmente guiada por rieles), o en forma diagonal impulsada por un resorte en "V" (*e. g.* Tomahawk®, Fig. 1a-c). El último caso resulta más efectivo al dificultar su apertura desde el interior, pero puede generar lesiones en individuos no focales muy pequeños. Las trampas-jaula son más efectivas para mamíferos medianos (*i. e.* 0,5 a 10 kg), que pueden ser especies de dieta carnívora u omnívora, terrestres, y con poca aversión a espacios cerrados (*e. g.* Luengos Vidal *et al.*, 2003; Krebs, 2006; Wheeler *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012; Fig 1d). Pero poseen baja selectividad (*i. e.* probabilidad de capturar especies no focales), dependiendo del tamaño de la jaula, su ubicación y el cebo utilizado.

La mayoría de los macromamíferos muestran cierta aversión a espacios cerrados, por lo que su ingreso en trampas-jaula debe ser estimulado mediante cebado. Pueden utilizarse atrayentes olfativos (*i. e.* esencias), señuelos o alimento (*e. g.* Luengos Vidal *et al.*, 2003; Fig. 1e). El último caso provee nutrientes y agua

al animal capturado, disminuyendo el estrés y riesgo asociados al encierro. Funciona mejor con animales carnívoros y, en menor medida, frugívoros, pero es poco eficiente para herbívoros, salvo en zonas áridas y/o calurosas donde el cebo represente un suministro importante de agua (e. g. trozos de manzana). Algunos animales desconfiados o capturados previamente, intentan extraer el cebo sin ingresar todo el cuerpo (e. g. sujetando la puerta con el lomo, común en zorros). Por ello, es conveniente fijar el cebo atándolo al piso o, mejor aun, colgándolo del techo de la jaula (Fig. 1e). Otra forma de incrementar la efectividad de las trampas es disponerlas abiertas y cebadas por un período de tiempo (i. e. 'precebado'; Fig. 1e), impidiendo físicamente el cierre de las puertas, de modo de que los individuos se familiaricen con ellas. Esto no sólo reduce la aversión al ingreso, sino también el estrés por el encierro una vez capturados. Efecto similar suele tener cubrir la trampa con ramas, hierbas u hojarasca. Para carnívoros muy desconfiados puede ser necesario el uso de carnada viva (e. g. Luengos Vidal *et al.*, 2003), donde la presa es colocada en una cámara contigua. Nótese que su uso hace necesario considerar también el bienestar de la presa y reducir al mínimo su estrés, mayor frecuencia de monitoreo de las trampas y mayores costos logísticos.

Las trampas de jaula están fabricadas con una malla de metal que no aísla al individuo capturado de la intemperie, por lo que deben ubicarse en sitios resguardados del sol, la lluvia o el viento (Powell & Proulx, 2003; Lane & McDonald, 2010; Fig. 1c-d). En zonas abiertas, debe proveerse de cobertura, u optar por trampas cerradas (e. g. cajas) que provean refugio, aunque las especies en este tipo de hábitat suelen evitar estos espacios cerrados. Las trampas de jaula deben disponerse siempre sobre superficies horizontales, planas y estables, ya que los animales evitarán ingresar si el piso no es firme. Es aconsejable sujetarla a estacas, ramas o postes para evitar que el individuo capturado se lastime si se vuelca o mueve de su posición inicial al intentar liberarse. Esto también evita que otras especies (e. g. perros) expongan o vuelquen la trampa al intentar alcanzar al individuo en su interior. En algunos casos, es posible adaptar las trampas para la captura de especies arborícolas, siempre que sean firmemente sujetadas a una rama robusta y horizontal.

Existen modificaciones al diseño general de las trampas de jaula para especies con características particulares. Para las de gran tamaño (i. e. osos, yaguarretés, pumas) se construyen grandes habitáculos cerrados o corrales fijos con troncos, rejas perimetrales, o tanques de metal, normalmente con una puerta de caída en guillotina. Si estas especies muestran aversión a ingresar en recintos cerrados (e. g. muchos ungulados), se usan corrales extensos abiertos o redes. Esto involucra su arreo y persecución hasta el dispositivo. Debido al costo de estos dispositivos y la dificultad de su traslado, el muestreo suele estar dirigido a áreas con registros previos. Para capturar especies subterráneas (e. g. tucu-tucu *Ctenomys* spp.), se adaptan tubos de metal o PVC, con un extremo cubierto con una malla y el otro con una puerta conectada a un piso falso, análoga a las utili-

zadas en trampas-jaula, que se introduce en la entrada de la galería. La rejilla en el extremo opuesto permite el paso del aire, y el individuo es capturado cuando intenta llegar a la abertura para tajarla. Por último, se han adaptado diversos tipos de trampas de jaula sobre balsas para la captura de especies semiacuáticas (e.g. visón *Neovison vison*, nutrias *Lontra spp.*).

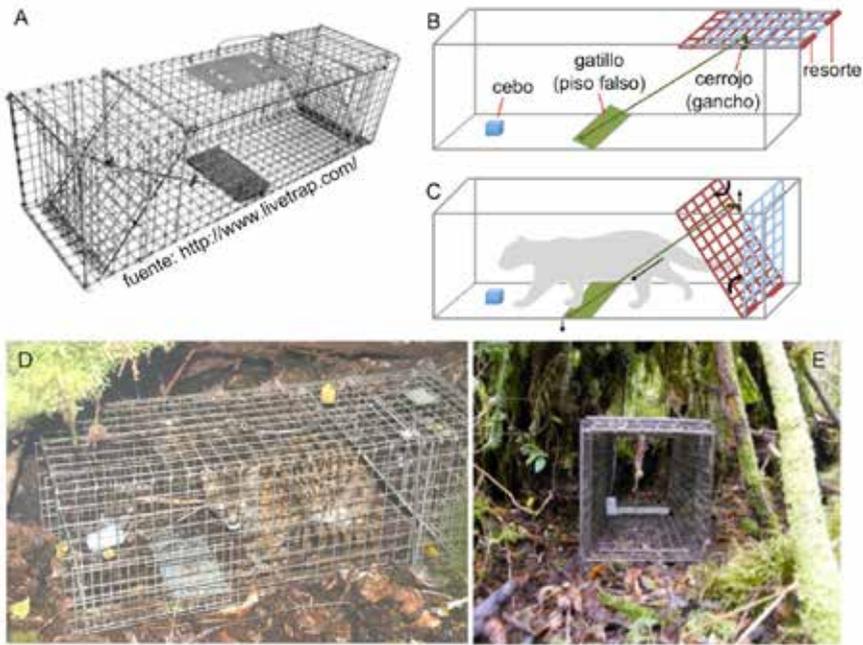


Figura 1. Trampas jaula de captura viva. A) Modelo Tomahawk con dos puertas. B-C) Esquema básico de funcionamiento de la trampa. B) La trampa se activa, sujetando la puerta en "V" con un gancho o cerrojo sujeto a una barra de metal conectada al piso falso, detrás del cual se ubica el cebo o atractor. C) Al ingresar un individuo atraído por el cebo, pisa el gatillo y desengancha el cerrojo, y la puerta de la trampa se cierra impulsada por un resorte. D) Gúña (*Leopardus guigna*) capturada en la estación experimental Senda Darwin, Chiloé, sur de Chile. E) Vista del interior de la jaula, donde se destaca la disposición del cebo (pollo crudo) colgando desde el techo, y el atractor olfativo (orina de lince) en el tubo blanco junto al piso falso; la trampa se encuentra totalmente abierta por ambos extremos, donde las puertas fueron trabadas con alambre, permaneciendo así por un período de precebado de tres días previo al inicio de las capturas. Se destaca en C y D la ubicación de las trampas sobre una superficie horizontal lisa y en una ubicación protegida.

Uno de los medios más efectivos para la captura de especies con marcada aversión a espacios cerrados es el uso de cepos acolchados (Fig. 2; e. g. Luengos Vidal *et al.*, 2003; 2016; Powell & Proulx, 2003; Michalski *et al.*, 2007; Lagos & Villalobos, 2012). Estos están conformados por dos mandíbulas de metal revestidas con goma o neopreno, y unidas en su base por una bisagra, que se cierran impulsadas por un resorte cuando un animal pisa un piso falso que actúa como gatillo

(Fig. 2a-b). Al cerrarse el cepto, fijado por una cadena a una estaca u otra estructura fija, atrapa la extremidad del animal. Se instalan sobre el suelo, ocultándolos con hojarasca u otro material natural, y evitando rocas y ramas que traben el dispositivo y/o lastimen el animal. Pueden ubicarse en senderos frecuentados por la especie de interés, en la entrada de un refugio, o en áreas abiertas junto a un cebo o señuelo (*e. g.* un elemento plástico vistoso; los cánidos suelen ser atraídos por objetos nuevos y coloridos). En este último caso, el cebo o señuelo se ubica entre dos o más dispositivos para incrementar la eficiencia de captura. Dado que no depende del ingreso a recintos cerrados, es altamente efectivo, y si su tamaño se escoge correctamente no genera mayor daño en el animal.

Sin embargo, el uso de ceptos requiere gran cuidado y esfuerzo (Powell & Proulx, 2003; Lagos & Villalobos, 2012). Si el gatillo no se ajusta convenientemente, puede ser activado por especies más pequeñas (y livianas) que la focal, resultando severamente lesionadas. Un dispositivo en malas condiciones (*e. g.* acolchado roto) puede también causar lesiones. Además, los animales quedan sujetos por una extremidad y completamente expuestos a otros animales, al ser humano, y a las inclemencias del tiempo. Esto puede ser muy traumático para el individuo, pudiendo lastimarse, e incluso amputar su extremidad, al intentar liberarse. Por lo tanto, es necesario controlar constantemente las trampas, reduciendo al mínimo posible el tiempo entre visitas. Debido a que el individuo no se encuentra confinado en un recinto cerrado, su manipulación e inmovilización reviste también mayor complejidad, y representa también una fuente de estrés. Esto eleva el costo logístico (*i. e.* personal necesario) y/o reduce el área factible de ser muestreada con un determinado esfuerzo.

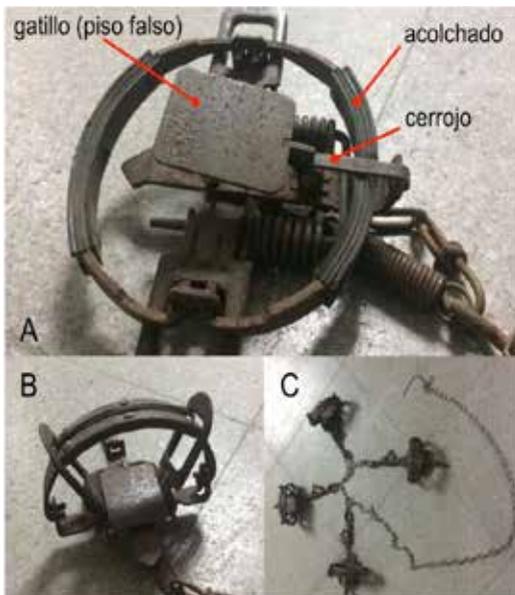


Figura 2. Cepto acolchado. A) Dispositivo abierto, señalando el piso falso o gatillo, cerrojo y mandíbulas acolchadas. B) Dispositivo cerrado; nótese la posición de las pestañas que sujetan las mandíbulas en posición cerrada. C) Dispositivo conformado por cuatro trampas unidas a una cadena común; en el campo, todo el dispositivo se oculta con hojarasca arena o tierra, y el cebo se sitúa en el centro del arreglo.

El uso de cepos sin acolchado, aunque común en la caza comercial, no es admisible en proyectos científicos o de manejo de fauna, aun cuando el objetivo involucre la captura muerta, ya que el proceso resulta demasiado cruento y prolongado (Powell & Proulx, 2003). Una alternativa a ello es el uso de trampas de golpe adecuadas para mamíferos pequeños a medianos. Un dispositivo común, y que provoca la muerte instantánea (“humanitaria”) de los individuos, reduciendo su sufrimiento al mínimo posible, son los modelos de mandíbulas rotativas (e. g. Conibear®), las cuales funcionan de forma similar a los cepos. Las mandíbulas realizan un giro completo, cierran en forma de tijera y descargan mayor energía en el golpe. Están diseñadas para golpear el tronco, cuello o cabeza del animal, y son convenientes principalmente para carnívoros pequeños, como algunos mustélidos. Su selectividad puede incrementarse localizándolas en galerías o espacios cerrados con evidencia de actividad de la especie focal. Para los carnívoros y marsupiales más pequeños pueden utilizarse trampas planas de golpe (e. g. Victor®) similares a las usadas en captura muerta de micromamíferos. Debido a la baja selectividad de estas trampas, es recomendable, aunque más costoso, realizar captura viva y luego aplicar la eutanasia siguiendo un protocolo humanitario, e. g. sobredosis de anestésicos (Lane & McDonald, 2010).

Otro tipo de dispositivo de captura viva eficiente son los lazos (Luengos Vidal *et al.*, 2003; Powell & Proulx, 2003; Lagos & Villalobos, 2012). Para incrementar su utilidad, estos suelen estar unidos a algún resorte, vara flexible o polea que, al ser liberado, permite su rápido cierre. Según su disposición puede atrapar al individuo por una extremidad, el cuello o el tronco, dependiendo del modo más efectivo de sujeción de la especie de interés. Es altamente efectivo para la captura viva si se lo provee de algún tope para evitar el exceso de presión (Powell & Proulx, 2003), pero ello requiere de un cálculo preciso y experiencia previa, y comparte la mayoría de los riesgos de operación descritos para los cepos. Si carecen de tope o traba, y son provistos de un resorte potente, son considerados como método apto (“humanitario”) para la captura muerta (Powell & Proulx, 2003) por asfixia rápida (o ahogamiento en especies acuáticas).

Por último, existen técnicas de captura que involucran rastreo y persecución de individuos, en general de gran tamaño, y muchas veces involucrando el uso de perros que facilitan su detección, rastreo y acorralamiento (Lagos & Villalobos, 2012). La inmovilización se realiza por medio de lazos manuales, redes arrojadas, dardos anestésicos o, en el caso de captura muerta, disparos con armas de fuego. El uso de dardos anestésicos o proyectiles convencionales (balas) debe realizarse por personal altamente calificado, y puede estar sujeto a regulación y requerir permisos especiales. Los dardos pueden arrojarse usando cerbatanas o armas de aire comprimido (Lagos & Villalobos, 2012). Un veterinario con experiencia debe evaluar cuidadosamente, y a distancia, el estado y peso del animal para calcular la dosis de anestésico. El dardo debe insertarse preferentemente en áreas del cuerpo con mayor masa muscular, evitando tocar órganos blandos

o hueso y producir lesiones graves. El anestésico puede suministrarse también usando una vara con una jeringa en el extremo si el animal fue acorralado en un lugar seguro. Se debe tener especial cuidado, ya que el uso de perros puede estresar al animal, y el sitio en que es acorralado, o a donde pudiera escapar tras recibir un dardo, puede ser de acceso difícil (e. g. árboles o desfiladeros). Además, estos procedimientos suelen realizarse sobre individuos de gran tamaño, peligrosos para el personal involucrado, representando también un problema en términos de bioseguridad.

Manipulación

Todo el proceso de manipulación de un individuo capturado debe involucrar un monitoreo cuidadoso de su bienestar (Luengos Vidal *et al.*, 2016; Lane & McDonald 2010; Lagos & Villalobos, 2012; Prolux *et al.*, 2012). Al chequear la trampa debe considerarse que la presa puede haber permanecido en ella por horas, expuesta a las inclemencias del tiempo y al acoso de otros animales o el hombre. Aunque la instalación correcta de la trampa debe minimizar estas fuentes de estrés, es necesario comenzar con una evaluación visual de su estado. Las respuestas conductuales al estrés varían entre especies, siendo relevante el conocimiento previo. El primer acercamiento debe hacerlo una única persona, sigilosamente, sin movimiento bruscos. Un indicador inicial del estado del animal, evidente desde cierta distancia, es la frecuencia y nivel de movimiento. Por ejemplo, paseos rápidos por la jaula, giros bruscos y morder los barrotes pueden revelar estrés, mientras que la ausencia de movimiento puede indicar problemas fisiológicos (e. g. hipo o hipertermia) o agotamiento, o constituir una respuesta defensiva ante la percepción de amenaza (e. g. lagomorfos). También es importante prestar atención a la emisión de vocalizaciones o sonidos agresivos y, a menor distancia, evaluar la frecuencia respiratoria. Si se detectan señales de estrés fisiológico, debe responderse rápidamente con tratamiento veterinario. Es aconsejable siempre el porte de mantas y bolsas de agua caliente para tratar casos de hipotermia, así como suero fisiológico para casos de deshidratación severa, y medicamentos para revertir una posible taquicardia o bradicardia. A su vez, se procede a una primera evaluación de la presencia de lesiones físicas evidentes (e. g. heridas, sangrado, dificultad para el movimiento). Al ser detectadas, el veterinario decide el procedimiento a realizar una vez inmovilizado el animal, incluyendo la eutanasia en casos extremos, u ordena su liberación inmediata si considera cualquier procedimiento riesgoso para su bienestar o la salud del personal involucrado.

Al detectar señales evidentes de estrés en un animal se debe proceder primero a tranquilizarlo, lo que puede conllevar previamente su inmovilización física. Ésta puede resultar traumática, debiendo ser rápida y eficiente, sin dañar el animal ni comprometer la seguridad del personal. Por ejemplo, los lagomorfos

silvestres son particularmente propensos a fracturas óseas o subluxación de la columna cuando patean bruscamente para liberarse, y pueden atacar con rasguños y mordeduras, por lo que debe sujetarse firmemente todo el cuerpo y especialmente sus patas traseras. Para inmovilizar animales capturados en trampas-jaula, se puede utilizar una superficie plana con un mango (pistón) para empujar y acorralar gradualmente al individuo contra el fondo, y aplicarle algún sedante a través de la reja (Fig. 3a-b). Se recomienda arrinconarlo gradualmente, introduciendo el pistón por pasos, y poniendo varas a través de la reja para trabarlo evitando que el animal lo empuje hacia atrás (Fig. 3a-b). En dispositivos de captura abiertos (e. g. lazos, cepos) la sujeción puede realizarse inicialmente por medio de redes, mantas o lazos manuales. Estos últimos, preferentemente sujetos a una vara o caña, deben colocarse rodeando conjuntamente el cuello y una extremidad delantera para evitar asfixiar al animal; es muy difícil liberar el lazo una vez ajustado, y si este rodea sólo el cuello, su ajuste excesivo puede ser irreversible. Cubrir la jaula o los ojos del individuo con una manta oscura ayuda en muchos casos a calmarlo. Guantes de seguridad pueden evitar rasguños y laceraciones menores, pero no detienen mordeduras potentes (i. e. trituración), y disminuyen la destreza y sensibilidad de las manos.

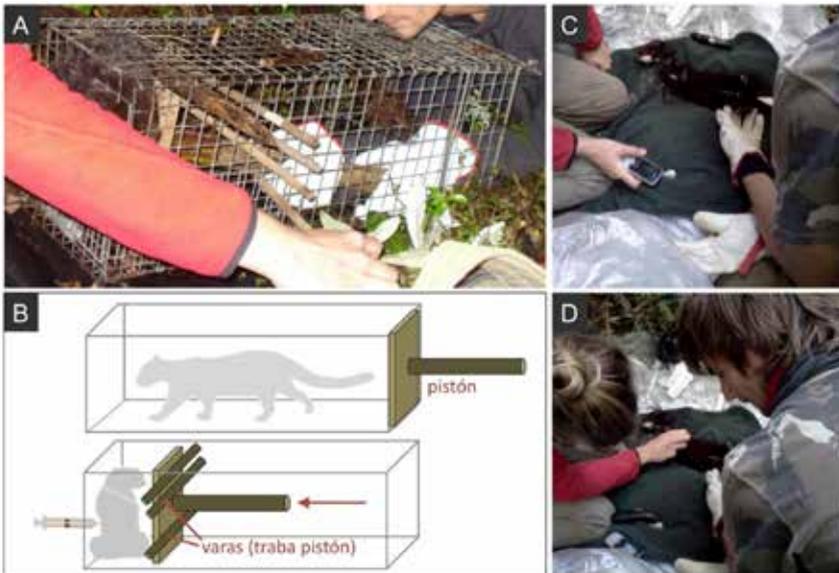


Figura 3. Procesamiento de un individuo de visón americano (*Neovison vison*), especie introducida, capturado en la localidad de Hornopirén, sur de Chile. A) Inmovilización física arrinconando el individuo con un pistón contra el fondo de la jaula, donde se inyecta el anestésico; nótese las varas que se colocaron a través de la reja para trabar el pistón en su posición. B) Esquema de funcionamiento del pistón. C-D) Monitoreo continuo de bienestar animal (C: temperatura rectal, D: frecuencia cardíaca) realizado por una veterinaria con experiencia en fauna silvestre y un asistente; nótese que el individuo es dispuesto sobre una superficie confortable constituida por una lona plástica y una manta para aislarlo de la humedad y el frío del suelo, respectivamente.

Tras la inmovilización, comienza un monitoreo frecuente (cada 5 a 10 minutos) de parámetros fisiológicos y conductuales (Luengos-Vidal *et al.*, 2016). Se registra temperatura rectal, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria, dilatación de la pupila, y signos que puedan sugerir pérdida del efecto de la anestesia (*e. g.* movimiento de la lengua, reflejo de deglución, parpadeo, contracción de pupila, movimientos en extremidades). También se buscan lesiones desapercibidas en el acercamiento inicial (*e. g.* laceraciones, hematomas, daños en la dentadura). El monitoreo se extiende a lo largo de todo el procedimiento, y la frecuencia puede incrementarse si el individuo muestra indicios de inestabilidad o anormalidad en los parámetros monitoreados. Finalizada la manipulación, el monitoreo continúa hasta la aparición de indicios de pérdida de efecto de la anestesia. Si se registran valores anormales de los indicadores, y se requiere continuar el monitoreo, puede inmovilizarse el individuo físicamente, o sedarse químicamente, hasta la recuperación de los parámetros normales. Finalmente, se controlan los mismos indicadores conductuales de estrés descritos más arriba, hasta que el individuo muestre completa recuperación y aptitud para ser liberado (*i. e.* pérdida de efectos de la anestesia, movimientos coordinados, reflejos adecuados).

Muchos mamíferos (*e. g.* carnívoros, lagomorfos) son particularmente sensibles al movimiento y a los ruidos, así como al contacto humano directo, por lo que la cantidad de personas involucradas en su procesamiento debe reducirse al mínimo. En el caso de mamíferos medianos y procedimientos sencillos y poco invasivos (*e. g.* mediciones morfométricas básicas, colocación de caravanas, extracción de sangre), el equipo mínimo necesario puede corresponder a dos personas: veterinario y asistente. Procesos invasivos (*e. g.* intervenciones quirúrgicas, implantes) y/o mamíferos grandes (*i. e.* > 10 kg), pueden requerir personal numeroso, monitorear otros indicadores de bienestar, o aplicar suero u oxígeno. En algunos de estos casos, el animal debe ser transportado a instalaciones adecuadas para procedimientos complejos, e incluso ser confinado para su rehabilitación posterior.

Marcaje y telemetría

Parte rutinaria al estimar abundancia bajo detección imperfecta o registrar el comportamiento individual, es la captura para el marcaje e identificación de los individuos. Existen marcas tanto permanentes y como corta duración (Lane & McDonald, 2010; Krebs, 2006; Wheeler *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012). Las primeras permiten seguir individuos por períodos prolongados, pero suelen ser más invasivas. Por ello, las de corta duración son preferibles en estudios breves.

Una marca permanente común son las caravanas (*i. e.* aretes plásticos; Powell & Proulx, 2003; Lagos & Villalobos, 2012). Se colocan rápidamente, perforando el pabellón auditivo o pliegues de piel, por lo que pueden requerir sólo inmovilización física. Sin embargo, en muchos casos los animales deben ser sedados

para reducir el estrés, o para realizar otra intervención sobre ellos. El principio de *reducción* (Russell & Burch, 1959) hace éticamente recomendable extraer toda la información posible de los individuos capturados para reducir el número de capturas necesarias en el futuro, siempre que no comprometa su bienestar o la seguridad del personal. Tras colocar las caravanas, el área afectada debe ser desinfectada mediante povidona u otro tóxico de uso externo. Las caravanas no deben quedar demasiado ajustadas o flojas, ya que pueden afectar la circulación sanguínea o arrancarse al engancharse en la vegetación o durante el acicalamiento, respectivamente, produciéndose heridas y perdiéndose la información. Según el tamaño pueden presentar un código alfanumérico, de colores, y/o superficies reflectantes para identificar el individuo incluso de noche. En especies de mayor tamaño, con caravanas visibles desde cierta distancia, la identificación posterior no requiere recaptura, sino su observación o registro fotográfico. Una alternativa es el uso de collares, que pueden funcionar bien en mamíferos relativamente grandes.

Otra marca permanente, los chips de identificación (*i. e.* PIT: "*passive integrated transponder*"; Powell & Proulx, 2003; Wheeler *et al.*, 2011), se han vuelto frecuentes al disminuir su costo económico. Se instalan debajo de la piel o intraperitonealmente, y emiten una señal al ser excitados por el campo magnético generado por un lector. Su instalación puede hacerse mediante inyección con jeringas especiales, o mediante una intervención quirúrgica mínima. Son útiles para especies pequeñas (*e. g.* mustélidos), y cuando no existen superficies adecuadas para instalar caravanas (*e. g.* pabellones auditivos pequeños). En general, requieren recapturar el animal para su identificación posterior. Otra marca permanente alternativa son los tatuajes mediante tinción o quema, con un elemento caliente o mediante nitrógeno líquido, de superficies de piel expuesta. Dependiendo de la especie y la superficie donde se realiza la marca, su revisión puede requerir también la recaptura de los individuos. En macromamíferos no es aceptable la amputación (*e. g.* falanges) como técnica de marcaje.

Las marcas de corta duración suelen involucrar el corte, afeitado, decoloración, tinción o uso de pinturas no tóxicas en porciones específicas del pelaje (Powell & Proulx, 2003; Wheeler *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012). Su duración está determinada por el crecimiento y renovación de pelaje (o lavabilidad de la pintura), abarcando desde pocos días a una estación del año. Se utilizan códigos de coloración, forma y posición de las marcas en el cuerpo para identificar los individuos. Si son conspicuas, los individuos pueden identificarse mediante observación o fotografía; en caso contrario requerirá su recaptura. Sin embargo, la marca no debe afectar el desempeño normal de los individuos; marcas llamativas y expuestas pueden reducir su mimetismo o afectar sus interacciones sociales (*e. g.* reconocimiento, selección sexual). Además, el corte o rasurado del pelaje sólo debe realizarse cuando no afecte su capacidad de termorregulación o aislamiento del agua.

Los estudios de telemetría no sólo permiten identificar individuos, sino también obtener información personalizada sobre su biología, incluyendo patrones de movimiento y actividad diaria, rango de hogar, distancia de dispersión y desempeño fisiológico (Fuller & Fuller, 2012; Lagos & Villalobos, 2012; Kays *et al.*, 2015, Wilmers *et al.*, 2015). Los individuos son capturados, sedados y provistos de un dispositivo que, en los casos más simples, contiene un radiotransmisor (VHF, UHF). Puede incluir además sensores de movimiento, fisiológicos o ambientales, acelerómetros, o un receptor GPS (Fuller & Fuller, 2012; Kays *et al.*, 2015; Wilmers *et al.*, 2015). Como regla general, a mayor tamaño (y peso) del transmisor, mayor es su potencia (*i. e.* distancia de detección), la duración de la batería, y la cantidad de sensores que puede contener (*i. e.* información). Pero se recomienda que su peso no supere el 3% del peso del animal (5% en casos excepcionales) para no interferir con su desempeño normal (Lagos & Villalobos, 2012). Afortunadamente, en las últimas décadas se ha avanzado mucho en la miniaturización de los dispositivos (Kays *et al.*, 2015; Wilmers *et al.*, 2015).

Existen distintas formas sujetar los transmisores (Fuller & Fuller, 2012; Kays *et al.*, 2015), siendo la más común el uso de radiocollares. Estos se sujetan al cuello del animal lo suficiente para minimizar su movimiento y abrasión sobre la piel, y evitar que se enganche en la vegetación o durante el acicalamiento, pero no tanto como para impedir los cambios naturales en el diámetro del cuello o el crecimiento (en individuos jóvenes). Algunas especies que son propensas a perder el collar porque su cabeza y cuello muestran diámetros similares (*e. g.* mustélidos), requieren el uso de un arnés que rodee el tronco y las extremidades anteriores (Luengos-Vidal *et al.*, 2016). Otra opción, también recomendable para especies acuáticas o fosoriales con rangos de hogar relativamente pequeño, es la implantación de un transmisor intraperitoneal pequeño, de corto alcance. Alternativamente, el transmisor puede sujetarse con un pegamento no tóxico directamente sobre el pelaje o la piel. Dependiendo del sistema de sujeción, los transmisores pueden o no ser recuperados al final del estudio, y su recuperación puede requerir la recaptura del animal o disponer de algún mecanismo de liberación automática. La recuperación siempre es recomendable para transmisores dispuestos externamente, así como evaluar sus efectos sobre el desempeño de los individuos en condiciones naturales. Los implantes internos requieren también consideraciones usuales en cualquier intervención quirúrgica menor (Wilmers *et al.*, 2015).

La señal de transmisor es registrada utilizando una antena direccional que emite un aviso sonoro cuya intensidad y/o frecuencia aumenta al ser apuntada hacia la fuente (Fuller & Fuller, 2012; Lagos & Villalobos, 2012; Kays *et al.*, 2015; Wilmers *et al.*, 2015). Al rastrear un número acotado de animales conspicuos, una persona con una antena puede seguirlos hasta observarlos directamente, y marcar su posición. Pero si los individuos son difíciles de observar, son numerosos, o se estresan ante la presencia humana, debe recurrirse a su localización por trian-

gulación. Esto involucra detectar la dirección de la señal de cada individuo (*i. e.* frecuencia distintiva) desde al menos dos puntos, y luego utilizar cálculos trigonométricos básicos para determinar el punto donde las direcciones se intersectan. Idealmente, debe hacerse simultáneamente en cada punto, incrementándose la precisión con el número de puntos de recepción. Pero si se cuenta con un único receptor, éste puede usarse desde dos puntos distintos si fuera razonable suponer que los individuos rastreados no se movieran mucho durante el tiempo que lleva al investigador trasladarse de un punto a otro, aunque las localizaciones estimadas serán menos precisas. Otros factores que inciden negativamente en la precisión de la estimación es la distancia del receptor al transmisor, la cercanía entre puntos de recepción, y el relieve y la cobertura vegetal (*i. e.* relieves quebrados y ambientes boscosos densos pueden disminuir la intensidad o desviar la dirección de la señal).

Finalmente, los dispositivos provistos de un receptor GPS almacenan la posición del individuo en intervalos preestablecidos de tiempo y, aunque más caros y de mayor tamaño, disminuyen los costos logísticos del estudio al no requerir personal permanentemente en el campo (Fuller & Fuller, 2012; Lagos & Villalobos, 2012; Kays *et al.*, 2015). El tamaño de la batería varía la duración del dispositivo, su potencia, y la frecuencia (detalle) máxima de registro, aunque para un dispositivo dado existe un compromiso entre estos tres parámetros. Los más grandes pueden enviar la información directamente al investigador en forma satelital, o a través de drones o antenas de telefonía móvil (Lagos & Villalobos, 2012; Wilmers *et al.*, 2015), pero sólo pueden ser sujetados a individuos también grandes. Los más pequeños pueden ser usados en especies más pequeñas, pero requieren su recuperación mediante recaptura o liberación automática para obtener la información guardada en su memoria interna.

Referencias

- Fuller M R, Fuller T K. 2012. Radio-telemetry equipment and applications for carnivores. En: L. Boitani & R. Powell, *Carnivore ecology and conservation: A handbook of techniques*. Oxford University Press Inc., New York, New York, USA. pp. 152-68.
- Kays R, Crofoot M C, Jetz W, Wikelski M. 2015. Terrestrial animal tracking as an eye on life and planet. *Science*, 348:aaa2478.
- Krebs C J. 2006. Mammals. En: Sutherland WJ, *Ecological Census Techniques: A Handbook*, 2nd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. pp. 351-369.
- Lagos N, Villalobos R. 2012. Técnicas de estudios de carnívoros terrestres. En: Iriarte A, Jaksic FM. (eds.), *Los carnívoros de Chile*. Ed. Flora & Fauna Chile y CASEB-PUC, Santiago, Chile. pp. 57-86.
- Lane J M, McDonald R A. 2010. Welfare and 'best practice' in field studies of wildlife. En: Hurbrecht R C, Kirkwood J (Eds.), *The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals*. John Wiley & Sons, Oxford, UK. pp. 92-106.

- Luegos Vidal E M, Lucherini M, Casanave E. 2003. An evaluation of three restraining devices for capturing pampas foxes. *Canid News* 6: 1-9.
- Luengos Vidal E M, Castillo D F, Caruso N C, Casanave EB, Lucherini M. 2016. Field capture, chemical immobilization, and morphometrics of a little-studied South American carnivore, the lesser grison. *Wildlife Society Bulletin* 40: 400-405.
- Michalski F, Crawshaw J R, Peter G, de Oliveira T G, Fabián M E. 2007. Efficiency of box-traps and leg-hold traps with several bait types for capturing small carnivores (Mammalia) in a disturbed area of Southeastern Brazil. *Revista de Biología Tropical* 55: 315-320.
- Powell R A, Proulx G. 2003. Trapping and marking terrestrial mammals for research: integrating ethics, performance criteria, techniques, and common sense. *Ilar Journal* 44: 259-276.
- Proulx G, Cattet M R, Powell R A. 2012. Humane and efficient capture and handling methods for carnivores. En: L. Boitani & R. Powell, *Carnivore ecology and conservation: A handbook of techniques*. Oxford University Press Inc., New York, New York, USA. pp. 70-129.
- Russell W M S, Burch R L. 1959. *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London, UK. ISBN 0900767782.
- Weather C P, Bell J R, Cook P A. 2011. *Practical Field Ecology*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 362 pp.
- Wilmers C C, Nickel B, Bryce C M, Smith J A, Wheat R E, Yovovich V. 2015. The golden age of bio-logging: how animal-borne sensors are advancing the frontiers of ecology. *Ecology* 96: 1741-1753.

CAPÍTULO 14

Captura y manejo de micromamíferos en el campo

Diego Queirolo¹

Conceptos generales y procedimientos técnicos básicos para el estudio de pequeños mamíferos en actividades de campo

La complejidad que significa llevar adelante una actividad en campo que contemple la captura de animales implica una planificación muy cuidadosa. Deben tomarse medidas previas, como la elaboración del proyecto científico, incluyendo un presupuesto completo y un cronograma de ejecución de las actividades a realizar. Luego, los investigadores participantes deben conocer la legislación que reglamenta la colecta de especímenes de fauna silvestre en Uruguay, someter el proyecto a la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), solicitar licencia de captura y transporte para especies de fauna nativa y conocer los procedimientos legales y éticos para la manipulación y uso de los micromamíferos.

Sumado a lo anterior, es necesario conocer el área donde se desarrollará el estudio, no solo por su accesibilidad geográfica y logística, sino también para identificar potenciales riesgos de infección con patógenos locales, para los cuales la inmunización de los profesionales involucrados debe ser la adecuada (por ejemplo, tétanos, hepatitis virales, rabia, etc.). Por otro lado, deben conocerse los mecanismos comunes de exposición a agentes de riesgo, como puede ser la inoculación directa por agujas, contaminación por cortes o heridas preexistentes, contaminación por instrumentos y agresión animal. Lo mismo para el contacto de membranas mucosas de ojos, boca o narinas con elementos líquidos comunes en el proceso de manipulación animal, manos y superficies contaminadas, así como contusiones o cortes efectuados durante el manejo de las trampas de captura (Penna *et al.*, 2010). Por último, utilizar correctamente los equipos de protección individual, tanto los del día a día del trabajo a campo (ropas y calzados adecuados), como los necesarios durante la manipulación directa de micromamíferos (Penna *et al.*, 2010).

1 Centro Universitario Regional Noreste, UdelaR. Uruguay - dqueirolo@cur.edu.uy

La elección de la técnica de captura, cantidades y tipos o modelos de trampas de captura, su disposición, etc., dependerá de los objetivos propuestos en el proyecto. Al mismo tiempo, también estarán supeditados al presupuesto disponible y a la logística en campo, tanto por la accesibilidad al área de estudio, como a la cantidad de investigadores participantes en la ejecución del proyecto de estudio. Por tal motivo deben seguirse recomendaciones y sugerencias existentes en trabajos científicos y libros que tratan específicamente sobre métodos de muestreo en mamíferos (Wilson *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2010) o, concretamente, en micromamíferos como roedores y marsupiales (Mills *et al.*, 1998; Auricchio & Salomão, 2002; Gurnell & Flowerdew, 2006; Romero-Almaraz *et al.*, 2007; Cáceres *et al.*, 2010).

En la actualidad se utilizan técnicas de captura viva de micromamíferos, básicamente mediante trampas de alambre tipo jaula (de la marca Tomahawk, por ejemplo) o de aluminio tipo caja (de la marca Sherman) y trampas de caída (*pit-fall*). Las dos primeras pueden ser dispuestas en transectos o grillas, en general con estaciones de muestreo conformadas por una o más trampas de distintos tamaños o dispuestas en distintos niveles del estrato vegetal, por ejemplo, una en el suelo y otra en la rama de un árbol (Fig. 1). Entre estaciones, las distancias suelen oscilar entre los diez y veinte metros, en un total de estaciones de entre diez y quince para los transectos (transectos de 150 o 350 metros de longitud) y de 25 hasta 100 o 120 en las grillas (grillas que pueden tener 200 hectáreas de superficie) (Fig. 2).



Figura 1. Trampas de captura viva de micromamíferos instaladas en campo. **A.** trampa de alambre, tipo jaula, instalada en el piso dentro del monte. **B.** trampas de aluminio, tipo caja, de distinto tamaño instaladas en el piso dentro del monte. **C.** trampa jaula activa, instalada a lo largo de un transecto en un pastizal.

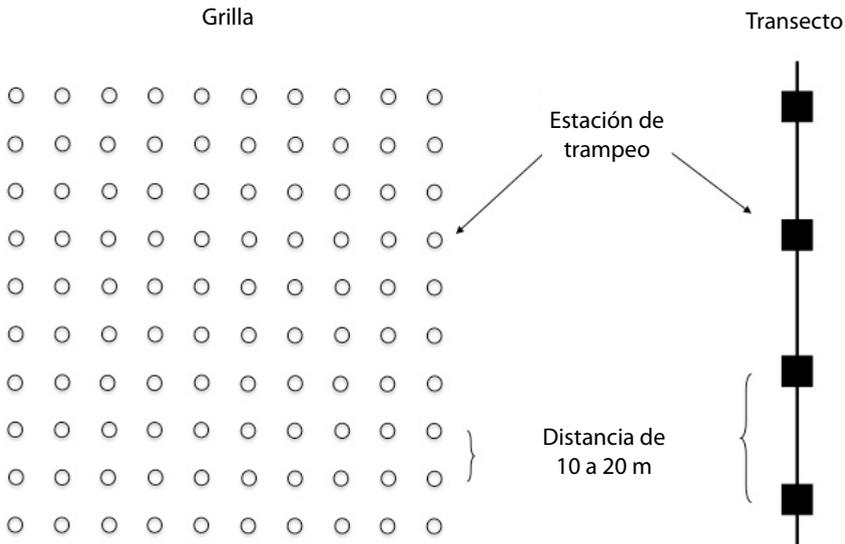


Figura 2. Diseño de muestreo señalando la disposición de las trampas de captura viva, jaulas o cajas, en grilla o transecto. Se indica en detalle las estaciones de trapeo (que pueden tener una o más trampas) y la distancia entre ellas.

Para las trampas de caída (baldes enterrados en el suelo de por lo menos 60 litros de capacidad) (Fig. 3) la disposición es más variable, en general se utilizan agrupadas de a cuatro en línea, conectadas por un vallado (tejido o lona gruesa de 50 cm de altura) o dispuestas en forma de estrella, con una central y tres en las puntas, también conectadas por un vallado (Fig. 4). Los muestreos pueden ser variables en el tiempo, dependiendo de las preguntas a contestar. Si se pretende, por ejemplo, cubrir un ciclo reproductivo de pequeños roedores (generalmente de 16 a 18 meses), se debe muestrear a lo largo de dos años con las trampas dispuestas en campo, activas durante por lo menos tres noches mensuales consecutivas. Debemos tener en cuenta que el éxito de captura, es decir, el número de trampas en las cuales aparecen capturados micromamíferos es de aproximadamente entre 5 y 7% para las del tipo jaula y caja.



Figura 3. Trampas de caída para micromamíferos. **A.** balde de 60 litros enterrado con vallado de lona negra a ambos lados. **B.** balde de 60 litros enterrado con vallado de tejido verde. **C.** transecto de trampas de caída, donde se ubican los baldes enterrados y el vallado de tejido verde.

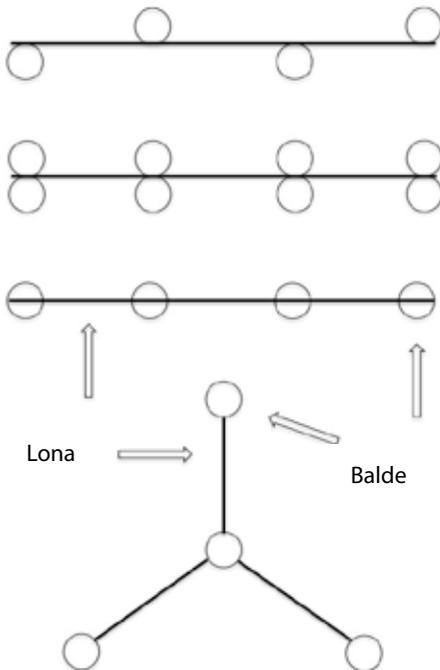


Figura 4. Disposición de trampas de caída. Agrupadas en líneas con cuatro baldes y vallado, mostrando tres maneras de colocar los baldes en relación al vallado y una estrella, con un balde central y tres en las puntas, unidos por un vallado.

En las trampas de caída, los micromamíferos son capturados porque el vallado les corta el paso y a su vez los guía hasta los baldes dispuestos en ambos extremos (Fig. 5). Por otro lado, en el caso de las trampas de jaula o de caja, un ítem muy importante es el cebo atrayente o carnada. El atrayente está compuesto por una mezcla de productos que libera un olor atractivo que atrae tanto a roedores como a marsupiales con diversos hábitos alimentares (granívoros, frugívoros, insectívoros, carnívoros u omnívoros). Un atrayente de mucha efectividad es la mezcla compuesta por: sardina en conserva, vainilla, banana, harina de maíz y pasta de maní.



Figura 5. Muestreo con trampas de caída. A. roedor capturado dentro del balde. B. actividad de revisión y control por parte del equipo de trabajo.

Lo expuesto anteriormente se aplica en general a la mayoría de los estudios con micromamíferos, pero existen excepciones en función de los objetivos de cada proyecto, los hábitos o los ambientes de las especies, que pueden requerir trampas o diseño de muestreo específicos. Ejemplos de estas condiciones particulares, pueden ser los roedores herbívoros (que pueden ser capturados en trampas de caída, pero difícilmente en las demás) o los roedores como los tuco-tuco (*Ctenomys* spp.), que por sus hábitos subterráneos pueden requerir trampas de captura específicas.

Los individuos capturados deben ser transportados a un local adecuado (laboratorio de campo) donde se les realizarán todos los procedimientos de colecta de datos y muestras. Si bien en algunas situaciones se puede trabajar en el lugar de captura, en otras eso no es posible. En estos casos durante el transporte y el período de espera el animal debe ser mantenido en un lugar seguro, protegido del sol y la lluvia y con ventilación natural.

Para aumentar la eficiencia del registro y toma de muestras es conveniente dividir las distintas tareas (anestésiar, pesar, medir, sacrificar, colectar tejido, taxidermizar, registrar datos en planilla, descontaminar, etc.) entre los integrantes del equipo de trabajo. Para evitar inconvenientes, todos los materiales necesarios para realizar correctamente el procedimiento deben estar próximos a la mesa de trabajo, en cantidades mínimas y suficientes.

Procedimientos legales para el estudio de pequeños mamíferos en actividades de campo

La fauna silvestre en Uruguay está protegida por la Ley de Fauna del 4 de julio de 1935 y su reglamentación del 2 de mayo de 1996 (Ley nº 9.481 y Decreto 164/996, respectivamente), en la cual están incluidas todas las especies de micromamíferos silvestres. Por tal motivo, las actividades de colecta de especímenes y muestras biológicas de vertebrados silvestres en Uruguay están reglamentadas desde el año 1996. En dicho decreto, se define en el artículo 2 a la caza científica o con fines educativos como: "...la acción lícita de capturar o abatir, mediante formas autorizadas, ejemplares de especies de la fauna silvestre, con destino a museos, zoológicos, proyectos de investigación, acciones educativas o de divulgación". Más adelante, en el primer párrafo del artículo 14 se menciona: "Facúltase a la Dirección de Áreas Protegidas y Fauna de la Dirección General de Recursos Naturales Renovables, a emitir permisos de caza o colecta científica, por resolución fundada en informe técnico, ante solicitud expresa de instituciones de carácter científico o educativo", indicando el órgano público competente encargado de emitir las autorizaciones necesarias para capturar, manipular, sacrificar o transportar los ejemplares de micromamíferos silvestres a ser estudiados.

Recientemente, en el artículo 153 de la ley 18.834 del 17 de noviembre de 2011, se dispone el traspaso de funciones de la División Áreas Protegidas y Fauna desde el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca al Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, concretamente a la Dirección Nacional de Medio Ambiente, complementando al final del artículo con lo siguiente: "...Transfiérense los créditos, personal y puestos de trabajo correspondientes, así como las atribuciones para el cumplimiento de sus fines, en la forma que establezca la reglamentación". Dicha disposición se concretó a partir de agosto del 2015, siendo actualmente la DINAMA el órgano público competente que tiene entre sus cometidos realizar las actividades de fiscalización del uso permitido de la fauna silvestre, de acuerdo a las normas legales vigentes.

Al mismo tiempo, todo proyecto que implique captura de micromamíferos debe someterse a la aprobación por parte de la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la institución responsable del proyecto, de acuerdo a la ley nº 18.611 del 21 de octubre de 2009 (Ley sobre Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica). Para aquellos que pertenezcan a la Universidad de la República (UdelaR) o realicen sus proyectos de investigación bajo la responsabilidad institucional de la UdelaR, deben presentar su proyecto para evaluación a la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), dependiente de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), que emitirá un parecer luego de la evaluación por parte del CEUA del servicio de referencia responsable. Dicho procedimiento está regido por la ordenanza sobre Uso de Animales en Experimentación, Docencia e Investigación Universitaria.

En resumen, los procesos legales necesarios para la realización del trabajo de campo que impliquen captura y/o colecta de micromamíferos silvestres en Uruguay, deben tener en cuenta, como orientación práctica, que necesitan de licencia para captura y colecta emitida por la DINAMA y la aprobación del proyecto por parte del CEUA del servicio, para obtener el permiso de la CHEA. Podemos agregar también la necesidad de un aval emitido por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), dependiente de la DINAMA, para aquellos estudios que se realicen dentro de alguna de las áreas protegidas incluidas dentro del Sistema.

Riesgos biológicos y bioseguridad en actividades de campo

Dominar los contenidos y conocimientos sobre aspectos relacionados con la bioseguridad, primeros auxilios, legislación y ética para el estudio con animales, es de suma importancia para todos aquellos que trabajan con zoonosis, ejecutan actividades asociadas con animales en campo o en laboratorio, trabajan con taxonomía de pequeños vertebrados silvestres y profesionales en general que necesitan de conocimientos que van más allá de los procedimientos básicos de captura y manipulación de micromamíferos. En actividades de investigación y vigilancia epidemiológica, en las cuales los profesionales están permanentemen-

te expuestos al riesgo de infección con bacterias, virus y otros parásitos transmitidos por pequeños mamíferos, la información y capacitación permanente de trabajadores, investigadores, estudiantes y personal técnico vinculados a esas actividades durante el trabajo de campo tiene que ser parte de una estrategia institucional. Los roedores son reservorios naturales de agentes causales de enfermedades con diferente grado de riesgo (Gómez Villafañe *et al.*, 2005). Los organismos patógenos son eliminados al medio ambiente a través de secreciones y/o excreciones, pudiendo el hombre infectarse, ya sea en forma directa a través de la piel o mucosas, o indirectamente, por entrar en contacto con agua o alimentos contaminados.

Luego de identificado el síndrome pulmonar por hantavirus, hace casi tres décadas, se estipularon nuevos procedimientos básicos de seguridad en campo para los profesionales que trabajan con micromamíferos, entre otros animales (Mills *et al.*, 1995 y 1998; OPS, 1999). Frente al riesgo potencial que implica para la salud humana el contacto directo o indirecto con roedores, los investigadores deben seguir algunas reglas básicas que implican conocer bien la biología del animal que va a ser utilizado o manejado, no manipular especímenes sin tener la calificación adecuada, utilizar equipamiento protector compuesto por túnicas con puños de elástico, guantes de látex, lentes protectores con visor de policarbonato, ajuste facial y respirador (Mills *et al.*, 1995; Penna *et al.*, 2010). En la preparación de especímenes para colecciones científicas de referencia o para fijar y conservar muestras, el investigador puede tener contacto también con distintos agentes químicos, por lo que deben tomarse medidas adecuadas recomendadas para el tratamiento con este tipo de sustancias.

Guías como las desarrolladas por la *American Society of Mammalogists* (ASM - Sociedad Americana de Mastozoólogos) (Sikes *et al.*, 2011) y el *Australian National Health and Medical Research Council* (Consejo Nacional Australiano sobre Investigación en Salud y Medicina) (NHMRC, 2013) proporcionan asesoramiento en el uso ético de animales en enseñanza e investigación. Aunque uno de los objetivos de tales guías es reducir el impacto de la manipulación en animales, hay circunstancias donde individuos tienen que ser sacrificados. Bajo condiciones de laboratorio o en áreas urbanas con acceso a asistencia veterinaria, el equipamiento necesario para la eutanasia puede estar fácilmente disponible. Sin embargo, es posible que biólogos que trabajan en campo, encargados de investigaciones que impliquen captura y liberación de animales, deban lidiar solos con estas situaciones (Reilly, 2001). Los métodos de eutanasia disponibles para biólogos de campo pueden estar limitados legalmente debido a restricciones de las licencias de posesión y administración de drogas como barbitúricos o anestésicos. Los métodos físicos de eutanasia como trauma contundente o dislocación cervical requieren cierto grado de práctica y confianza para realizarlos efectivamente y son difíciles de efectuar si el animal se está debatiendo. Recomendaciones desarrolladas por la ASM (Sikes *et al.*, 2011) determinan que los animales deben ser

inmovilizados mediante el uso de anestésicos antes de aplicar procedimientos de eutanasia con la intención de reducir el riesgo de daño, tanto al animal como al manipulador.

Contención química de pequeños mamíferos silvestres

Los investigadores, docentes, técnicos y estudiantes que realizan actividades en campos con micromamíferos, deben adoptar el mismo principio aplicado a animales de laboratorio, por el que deben cuidar a aquellos que están bajo su responsabilidad para evitar estrés, dolor y sufrimiento. En tal sentido, quienes trabajan en el campo deben adoptar medidas de protección que ofrezcan garantías al buen cumplimiento de los principios de bienestar animal y respeto a los parámetros éticos, con el objetivo de eliminar cualquier tipo de experiencia capaz de causar sufrimiento y, en situaciones donde la eutanasia sea necesaria, proporcionar una muerte rápida e indolora.

La manipulación y manejo de animales silvestres capturados en campo, debe realizarse luego de un proceso previo de sedación, analgesia o anestesia. A pesar de la existencia de protocolos anestésicos que pueden utilizarse en la contención química de animales domésticos y de laboratorio (FIOCRUZ, 2008; NHMC, 2013), para determinadas especies de vertebrados silvestres, especialmente micromamíferos, poca o casi ninguna información sobre protocolos anestésicos específicos está disponible en la literatura científica (Pachaly & Brito, 2001; Sikes *et al.*, 2011). Dichos protocolos pueden ser establecidos por extrapolación alométrica con base en la experiencia de campo de profesionales que capturan y manipulan pequeños mamíferos silvestres (Heard, 2007). La ketamina, en especial, es un analgésico que, en el contexto de los principios éticos, produce una analgesia suficiente, pero sin relajación muscular, para realizar procedimientos como la obtención de datos de biometría, extracción de ectoparásitos o marcaje del animal. En casos de anestesia más profunda, la asociación con el sedante miorelajante xilacina puede ayudar, aunque esta asociación no es recomendable para pequeños roedores y si para animales de mayor peso corporal, como comadrejas (*Didelphis albiventris*) o roedores de mayor porte.

La extrapolación alométrica es una técnica que reconoce que la duración y el efecto del analgésico dependen de la tasa metabólica del animal, es decir, la cantidad de energía consumida por el metabolismo de un determinado animal por unidad de tiempo. Como esta tasa es muy variable, por distintas situaciones normales dependientes del estado fisiológico de cada individuo, se utiliza el valor de tasa metabólica basal, medida en kilocalorías por día. Por tanto, podemos obtener valores promedio de dosis de fármaco en cada clase de peso, considerando que la ketamina es dosis dependiente. De acuerdo a los valores sugeridos por Heard (2007), si consideramos un roedor sigmodontino de 23 g deberíamos aplicar un volumen de ketamina de 0,02 ml, lo cual implica una gran dificultad

en el momento de medir con precisión la cantidad exacta de la dosis a ser suministrada. Por este motivo, para anestésicar animales de menos de 100 g de peso debemos diluir el anestésico en agua destilada estéril (no en suero fisiológico que puede alterar la propiedad del anestésico), por ejemplo, al diluir ketamina 5% disuelta en 1:10 se obtiene ketamina 0,5%. En el ejemplo del roedor sigmodontino, deberíamos aplicar un volumen de 0,2 ml, perfectamente controlable en una jeringa de insulina y adecuado al tamaño del animal. Dichas soluciones tienen que estar almacenadas en frascos estériles y, si fuera posible, en condiciones refrigeradas.

En caso de eutanasia la muerte del animal deberá ocurrir con un mínimo de sufrimiento físico o mental, con ausencia o reducción máxima de molestia, de dolor, de ansiedad y de miedo, seguidos por una inconsciencia inmediata y subsecuente muerte, además, el investigador tiene que tener las condiciones necesarias como para ejecutar el procedimiento con seguridad (Reilly, 2001). Técnicas de eutanasia que no cumplan con estos requisitos tienen que ser prohibidas o evitadas al máximo (CFMV, 2012). Para la eutanasia de pequeños vertebrados silvestres, especialmente roedores y marsupiales, se recomienda que los investigadores utilicen los protocolos de anestesia duplicando o triplicando la dosis indicada. El procedimiento se puede completar con la inyección de cloruro de potasio por vía intravenosa o intracardiaca (Reilly, 2001; CFMV, 2012; AVMA, 2013). Por último, además del conocimiento técnico y del cumplimiento previo con los protocolos exigidos por los distintos organismos públicos reguladores, los profesionales tienen que estar preparados para reconocer la molestia, el dolor, el miedo y la ansiedad de los animales durante la contención forzada y necesaria que puede ocurrir durante la manipulación y manejo de los pequeños mamíferos.

Referencias

- American Veterinary Medical Association (AVMA). 2013. AVMA guidelines for the eutanasia of animals. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, Illinois.
- Auricchio P, Salomão M G. 2002. Técnicas de coleta e preparação de vertebrados. Instituto Pau Brasil de História Natural, Arujá.
- Cáceres N C, Graipel ME, Monteiro-Filho ELA. 2010. Técnicas de observação e amostragem de marsupiais. In Reis, N. R., A. L. Peracchi, B. K. Rossaneis & M. N. Fregonezi, Técnicas de estudos aplicadas aos mamíferos silvestres brasileiros. Technical Books Editora, Rio de Janeiro: 21-36.
- Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). 2012. Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília.
- Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). 2008. Manual de utilização de animais/Fiocruz. Rio de Janeiro, Brasil.

- Gómez Villafañe I E, Miño M, Cavia R, Hodara K, Courtalón P, Suárez O, Busch M. 2005. Roedores. Guía de la provincia de Buenos Aires. L.O.L.A., Buenos Aires.
- Gurnell J, Flowerdew J R. 2006. Live trapping small mammals: a practical guide. 4th edition. The Mammal Society, London.
- Heard D J. 2007. Rodents. In West G, Heard D, Caulkett N. (Eds.). Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. Blackwell Publishing, Iowa: 655-663.
- Hoffmann A, Becker J, Rovero F, Schaer J, Voigt C, Wibbelt G. 2010. Field methods and techniques for monitoring mammals. In Eymann J, Degreef J, Häuser Ch, Monje J C, Samyn Y, VandenSpiegel D. (Eds.), Manual on field recording techniques and protocols for all taxa biodiversity inventories and monitoring. *Abc Taxa* 8: 482-529.
- Mills J N, Childs J E, Ksiazek T G, Peters C J. 1998. Métodos para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. Washington: Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio de Salud Pública, Centers for Disease Control and Prevention, OMS.
- Mills J N, Yates TL, Childs JE, Parmenter R R, Ksiazek T G, Rollin P E, Peters C J. 1995. Guidelines for working with rodents potentially infected with Hantavirus. *Journal of Mammalogy* 76(3): 716-722.
- National Health and Medical Research Council (NHMC). 2013. Australian code for the care and use of animals for scientific purposes. 8th edn. National Health and Medical Research Council, Canberra, Australia.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1999. Hantavirus en las Américas: guía para el diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control. Cuaderno Técnico, 47.
- Pachaly J R, Brito H F V. 2001. Interspecific allometric scaling. In Fowler M E, Cubas Z S. (Eds.), *Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals*. Iowa State University Press, Iowa: 475-481.
- Penna P M M, Aquino C F, Castanheira D D, Brandi I V, Cangussu A S R, Macedo Sobrinho E, Sari R S, Da Silva MP, Miguel Â S M. 2010. Biossegurança: uma revisão. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo* 77(3): 555-565.
- Reilly J S. (Ed.). 2001. Euthanasia of animals used for scientific purposes. 2nd edn. ANZCCART, Adelaide, Australia.
- Reis N R, Gallo P H, Andrade F R, Peracchi A L. 2010. Técnicas de estudo de mamíferos de médio porte, de grande porte e não voadores de pequeno porte. In Reis N R, Peracchi A L, Rossaneis B K, Fregonezi M N. *Técnicas de estudos aplicadas aos mamíferos silvestres brasileiros*. Technical Books Editora, Rio de Janeiro: 212-224.
- Romero-Almaraz M L, Sánchez-Hernández C, García-Estrada C, Owen R D. 2007. Mamíferos pequeños. Manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México.
- Sikes R S, Gannon W L and The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92(1): 235-253.

Wilson D E, Cole F R, Nichols J D, Rudran R, Foster M S. 1996. Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for mammals. Smithsonian Institution Press, Washington and London.

CAPÍTULO 15

Métodos alternativos para el estudio de mamíferos en campo: métodos directos e indirectos

Ariel Farías^{1,2}

Para un apropiado estudio de mamíferos en campo debe adoptarse el uso de técnicas que brinden la información necesaria con el menor compromiso para el bienestar animal, como lo indica el principio de *refinamiento*, tercera de las tres reglas de Russell & Burch 1959. La captura de individuos entrega gran cantidad de información, pero con altos niveles de estrés y riesgo para la salud de los individuos y del personal involucrado (Prolux *et al.*, 2012). Por ello, deben preferirse técnicas alternativas para obtener la información necesaria cuando estén disponibles. En esta sección se revisan brevemente las principales técnicas no invasivas disponibles para el estudio de la abundancia y distribución de mamíferos en el campo, con énfasis especial en carnívoros (Orden Carnivora). En general, pueden dividirse en métodos directos, si involucran la observación (o escucha) de los organismos, e indirectos, si se basan en el registro de indicios de su presencia o actividad, y en activos o pasivos, dependiendo de si requieren que se intervenga el medio o no para obtener dicho registro (Krebs, 2006; Wheeler *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012). Existe un compromiso entre robustez (precisión, exactitud) de la información obtenida y costo logístico, siendo ambos usualmente mayores para métodos directos y activos. Así, la captura es un caso extremo de método directo y activo, brindando gran cantidad de información, con un costo logístico muy alto, y con implicaciones importantes para el bienestar animal.

Métodos Indirectos

Uno de los métodos indirectos más comunes para cuantificar la presencia o actividad relativa de una especie es el registro huellas. Puede hacerse pasi-

1 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, Udelar. Uruguay.

2 Centro de Ecología Aplicada y Sustentabilidad (CAPES), Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile - ariel.farias@cure.edu.uy

vamente, registrando todos los rastros observados sobre el sustrato natural, y estandarizando luego por unidad de longitud o superficie recorrida (Krebs, 2006; Wheeler *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012). Estas estimaciones dependerán de la disponibilidad de sustratos aptos para el registro (*e. g.* arena fina), y pueden producir sesgos al comparar condiciones ambientales diferentes. Recientemente se han desarrollado técnicas de modelamiento estadístico que permiten tener en cuenta sesgos de detección y obtener estimadores de parámetros poblacionales específicos (*e. g.* Gopalaswamy *et al.*, 2012).

Las estaciones de registro de huellas constituyen un método activo alternativo que permite mayor estandarización del registro y control de los sesgos asociados a diferencias en detectabilidad (Lagos & Villalobos, 2012; Fig. 1). Consisten en una superficie limpia, generalmente circular, y cubierta de arena fina o cal tamizada y alisada, con un cebo o señuelo en el centro (Fig. 1a-b). Se visitan periódicamente registrando los rastros dejados por los individuos atraídos, estandarizando luego la cantidad de registros por el número de noches y estaciones activas. Este tipo de metodología es apto para el estudio mamíferos medianos a grandes, pero es sensible a las precipitaciones y el viento, y no brinda buenos registros de individuos pequeños. Para estos últimos se utilizan placas entintadas, ahumadas o cubiertas con un polvo fino (*e. g.* talco). En el primer caso se pone papel blanco a cada lado donde se imprimen las huellas tras pisar la superficie entintada (*e. g.* Wheeler *et al.*, 2011; Fig. 4, abajo). En los otros, las huellas se marcan directamente sobre la superficie ahumada o empolvada. Estos dispositivos se colocan dentro de una caja o tubo de metal, madera o PVC, que los protege de la lluvia, el viento y residuos. Son poco efectivos para individuos con aversión a espacios cerrados, pero puede proveerse de cebo para facilitar su ingreso, o ubicarse en senderos o galerías. Instalados en ramas horizontales gruesas puede brindar información sobre especies arborícolas. El registro pasivo o activo de huellas posee un costo logístico relativamente bajo y puede ser aplicado sobre grandes áreas. Si bien permite discriminar entre especies, normalmente no es útil para identificar individuos, y no brinda estimadores confiables de abundancia absoluta.



Figura 1. Dispositivos para el registro estandarizado de huellas. A) Representación esquemática de un huellero (*i. e.* estación de registro de huellas) abierto (arriba) y uno cerrado (abajo). B) Instalación de un huellero abierto con alumnos del curso “*Uso y manejo de animales no tradicionales en investigación*” (CHEA, noviembre 2017). Nótese que la superficie se cubre con una capa de polvo fino (tierra de color) alisada, y en el centro se dispone el cebo (*i. e.* atún en aceite). C-D) Dispositivos combinados, conformados por un huellero de barro y trampas abiertas de pelos construidas con fragmentos de velcro y viruta metálica adosados a superficies naturales como (C) troncos y (D) raíces entorno al cebo (*i. e.* pollo crudo y orina de lince). E) Aunque el barro constituye una superficie subóptima para el registro de huellas debido a las deformaciones que suele causar en los rastros, puede brindar registros adecuados si es revisado con frecuencia, y el animal permanece en él un tiempo prolongado, dejando numerosas huellas. En la imagen, huellas de guigña (*Leopardus guigna*).

El conteo pasivo de heces (Fig. 2a) sobre una superficie conocida, también brinda información sobre presencia o actividad relativa (*e. g.* Krebs, 2006; Lagos & Villalobos, 2012). Su precisión aumenta si previamente se limpia de heces el área a prospectar, y se registra el número de nuevas heces durante un tiempo definido. Esto puede combinarse luego con información sobre tasa de defecación individual y patrón de distribución espacial (*e. g.* agregado, aleatorio) para obtener estimaciones gruesas de abundancia (*e. g.* Novaro *et al.*, 1992; Webbon *et al.*, 2004). Una forma de incrementar la eficiencia en la detección de heces en el ambiente es usar perros de detección, los que han demostrado ser más eficientes

que la mayoría de las técnicas disponibles para la prospección de especies raras o crípticas (Long *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2012; DeMatteo *et al.*, 2014). Además, el análisis de heces en laboratorio (Fig. 2b-c) brinda información ecológica de la especie de interés (*e. g.* dieta), comparando restos diagnósticos no digeridos (*e. g.* dientes, huesos, pelos, plumas; Fig. 2d-e) con claves o material de referencia (Klare *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012; Wachter *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de su bajo costo logístico, la identificación certera de las heces a nivel específico suele ser problemática, y su tasa de degradación puede variar entre ambientes, estaciones del año y dependiendo de la dieta, sesgando las estimaciones de abundancia u ocurrencia relativa.

Otra fuente de información importante para especies poco conspicuas es la colecta pasiva de pelos en estructuras como vegetación o alambrados, o activa mediante la instalación de trampas de pelos (Krebs, 2006; Wheeler *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2012; Lagos & Villalobos, 2012). Existe gran variedad de estas últimas; las más usadas consisten en un tubo de malla metálica o PVC ubicado sobre un sendero frecuentado y/o provisto de un cebo, con un peine metálico o una superficie pegajosa en el interior del techo que captura los pelos de guarda del lomo cuando un animal ingresa (Krebs, 2006; Wheeler *et al.*, 2011; Lagos & Villalobos, 2012; Barja *et al.*, 2016). Una opción, para especies reticentes a ingresar en espacios cerrados es fijar cepillos metálicos, fragmentos de alfombra dura o cintas adhesivas fuertes sobre superficies naturales (*e. g.* troncos, rocas, raíces; Fig. 1c-e) en torno a un cebo, o rociadas con esencias. Esto último funciona particularmente bien con especies cuyo comportamiento territorial involucra frotarse sobre superficies marcadas por otros, como algunos félidos. La coloración, patrón de escamas (Fig. 2e) y estructura medular de los pelos colectados pueden analizarse bajo el microscopio y compararse con claves o material de referencia para identificar la especie de origen.

Recientemente se han desarrollado y perfeccionado técnicas de extracción, amplificación y secuenciación del ADN de células epiteliales del intestino presentes en las heces, o de folículos pilosos presentes en la base de pelos colectados (Kelly *et al.*, 2012; DeMatteo *et al.*, 2014). Estas técnicas permiten determinar certeramente no sólo la especie de origen, sino discriminar frecuentemente entre individuos, y puede usarse con técnicas de marcaje-recaptura para estimar tamaños poblacionales absolutos.



Figura 2. Procesamiento de heces para análisis de dieta. A) Hez de carnívoro. B) Tamizado en agua del material previamente disgregado para aislar los elementos diagnósticos no digeridos. C) Separación y clasificación de los elementos diagnósticos. En todo el proceso es de gran relevancia mantener medidas mínimas de bioseguridad, como el uso de guantes de látex y mascarillas, ya que las heces son fuente potencial de parásitos y enfermedades. D) Ejemplo de material diagnóstico clasificado, E) Ejemplo de estructuras microscópicas de los elementos diagnósticos.

observándose dientes y huesos de micromamíferos, pelos y material vegetal. E) Preparados microscópicos de la impronta de pelos guardianes sobre superficies traslúcidas, utilizadas en la identificación de presas en las heces, o para identificar especies a partir de material colectado en trampas de pelo.

Métodos directos alternativos a la captura

Entre los métodos directos alternativos a la captura se encuentran opciones pasivas, como las prospecciones visuales a lo largo de transectos o en puntos de conteo, donde se registran los individuos observados en una superficie o lapso determinados. Si se registra la distancia de cada animal, se pueden utilizar modelos estadísticos para estimar abundancias absolutas, suponiendo algún tipo de kernel de disminución de la probabilidad de detección con la distancia (Thomas *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2013). Esta técnica es efectiva con especies medianas a grandes y conspicuas, principalmente diurnas, aunque existen buenas experiencias para especies nocturnas de fácil detección utilizando reflectores potentes. Para especies que vocalizan frecuentemente (*e. g.* cánidos en etapa reproductiva), el registro pasivo de vocalizaciones, o su incitación activa mediante la reproducción de grabaciones, representan otra opción. Sin embargo, estas técnicas no son eficientes para especies pequeñas, crípticas o que se vean inhibidas por la presencia humana, o en áreas de vegetación densa, y pueden generar cierto disturbio o estrés en especies territoriales o en sus presas.

El perfeccionamiento y miniaturización de las cámaras digitales, y su marcada reducción de costos, ha propiciado un incremento en el uso de dispositivos automáticos de registro, siendo las trampa-cámaras los más usados para la prospección de mamíferos (Burton *et al.*, 2015; Caravaggi *et al.*, 2017; Wearn & Glover-Kapfer, 2017). Estos están conformados por una cámara digital conectada a un sensor de movimiento, el cual dispara el registro fotográfico o de video cuando un animal pasa frente al área de detección (Fig. 3). De esta manera, los registros obtenidos brindan información sobre parámetros poblacionales, interacciones, comportamiento y diversidad de especies de porte mediano a grande (Kelly *et al.*, 2012; Rowcliffe *et al.*, 2014; 2016; Tobler *et al.*, 2015; Cusack *et al.*, 2017; Wearn & Glover-Kapfer, 2017). Las cámaras almacenan la información en una tarjeta de memoria, cuya capacidad, así como la eficiencia energética y duración de las baterías en el campo, se incrementan día a día. No es raro en la actualidad encontrar cámaras que en condiciones normales permanezcan activas por más de seis meses y sean capaces de almacenar decenas de miles de fotografías. En general, los dispositivos están provistos de un área de comando que permite personalizar opciones como el número de disparos fotográficos tras una detección, la resolución de las fotografías, la longitud de los videos, o la impresión de información accesoria en la imagen como hora y fecha, variables ambientales, etc. Algunas permiten también programar disparos en horarios predeterminados y registrar sonido en los videos (Hamel *et al.*, 2013; Wearn & Glover-Kapfer, 2017). Dado que la mayoría de las especies de interés son nocturnas o crepusculares, la obtención

de registros adecuados con poca luz es fundamental. Para ello existen opciones con flash visible, infrarrojo, e infrarrojo de bajo brillo ("no-glow"); mientras la calidad de la imagen disminuye en ese orden, también lo hace la detectabilidad de la cámara y el disturbio o estrés generado sobre los animales.

La trampa-cámara debe sujetarse a un árbol, poste o estaca frente a un área que permita una buena visibilidad o un sendero, registrando pasivamente los individuos que pasan, o activamente aquellos atraídos a un cebo ubicado al frente. Las tasas de registro de algunas especies se incrementan notoriamente al utilizar cebos, lo cual es particularmente útil para el estudio de especies crípticas o en baja densidad, o inventarios de biodiversidad (Hamel *et al.*, 2013; du Preez *et al.*, 2014), pero estos también pueden sesgar las estimaciones de uso de hábitat y densidad al atraer individuos distantes, o alterar su comportamiento. No deben colocarse muy lejos ni muy cerca de la cámara, ya que los individuos atraídos pueden quedar fuera del rango de detección o las fotografías pueden mostrar sobreexposición y abarcar sólo una porción del animal, respectivamente. El ángulo de registros de la cámara no suele coincidir con el de detección (Fig. 3a-c). Si éste último es muy amplio, puede generar disparos sin registro fotográfico (en falso) de individuos por fuera del ángulo de registro; si es muy estrecho, puede generar fotografías tardías y parciales. Lo óptimo en estos casos es que el ángulo de detección del sensor sea levemente mayor al de registro de la cámara (Fig. 3c). Es aconsejable en algunos casos colocar dos o tres cebos distribuidos dentro del campo de registro de la cámara para incrementar la permanencia del animal al recorrerlos, o colocar dos cámaras apuntando desde distintos ángulos (no enfrentadas), mejorando así el registro (Fig. 3d-e). Es importante cuidar que no existan ramas o hierbas dentro del ángulo de detección que puedan generar disparos en falso al ser movidas por el viento. Del mismo modo, no es aconsejable instalar cámaras que enfocan hacia áreas abiertas o el horizonte ya que pueden ser disparadas múltiples veces al cambiar el ángulo del sol. La altura de fijación dependerá del tamaño de las especies de interés y del relieve frente a la cámara, pero 30 a 40 cm frente a una superficie plana suele ser adecuado para mamíferos medianos (Fig. 3f).

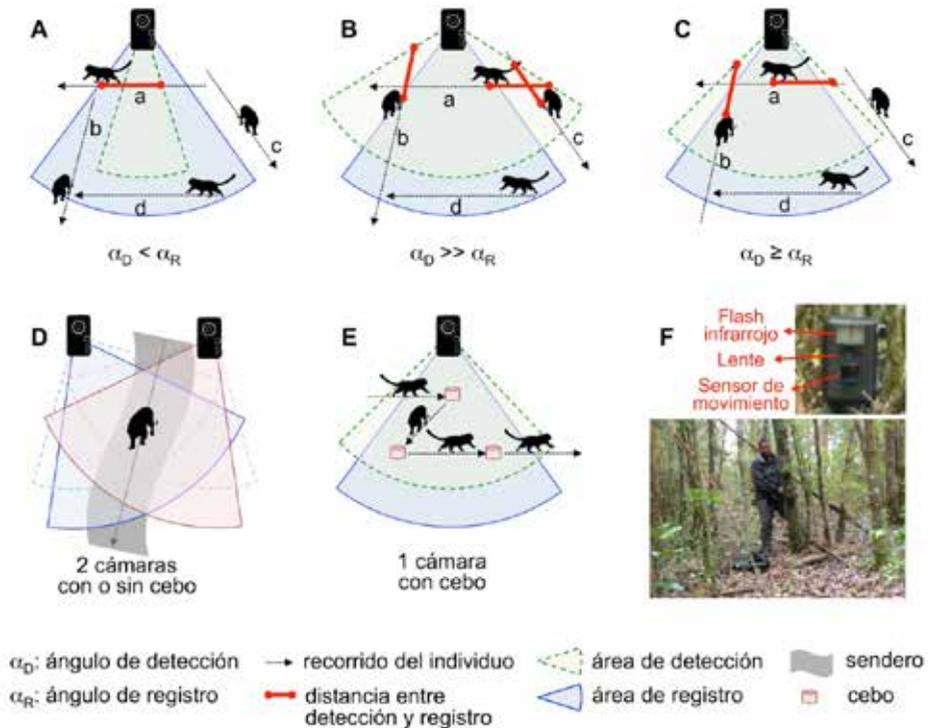


Figura 3. Esquema indicando factores que limitan o mejoran la calidad de los registros obtenidos mediante trampas-cámara. A-C) Distintos escenarios de relación entre el área cubierta por el sensor de movimiento y el lente que realiza el registro. A) El área de registro es muy superior a la de detección, dando lugar a ausencia de disparos en presencia de individuos en el área de registro (casos b y d), así como disparos muy retrasados que fallan en registrar en forma completa el animal (caso a). B) El área de registro es muy inferior a la de detección, produciéndose disparos cuando el individuo se encuentra total o parcialmente fuera del área de registro. C) Situación ideal donde el área de detección supera levemente la de registro, garantizando una proporción elevada de registros adecuados y completos. Nótese que normalmente, incluso en el mejor de los escenarios, no se registran individuos que, aunque se encuentran dentro del área de registro efectivo de la cámara, se ubican más allá del alcance del sensor de movimiento (caso d). D-E) Técnicas para incrementar la calidad de los registros, (D) localizando dos cámaras en forma oblicua a un sendero o área transitada (muestreo pasivo), o (E) ubicar dos o más puntos de cebado en el área de registro, promoviendo una mayor permanencia y exposición de los individuos frente a la cámara (muestreo activo). F) Elementos mínimos e instalación de una trampa-cámara (modelo Bushnell Trophy Cam); la altura escogida para fijarla al tronco (ca. 40-50 cm) es adecuada para la detección de mamíferos medianos a grandes.

Si los individuos muestran marcas distinguibles a simple vista (e. g. patrones de manchas, cicatrices), estos métodos directos permiten el uso de técnicas de marcaje-recaptura para la estimación de abundancia poblacional sin necesidad de capturas (e. g. Kelly *et al.*, 2008; Goswami *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 2012; Wearn & Glover-Kapfer, 2017). Alternativamente, los modelos de encuentro aleatorio pueden brindar información sobre abundancia absoluta de individuos sin necesidad de que estos posean marcas distinguibles si se posee información accesoria

sobre su velocidad y patrones de movimiento (Rowcliffe *et al.*, 2008; Zero *et al.*, 2013). En caso contrario, sólo permiten obtener índices de actividad relativa (e. g. Rovero & Marshall, 2009). Sin embargo, son una buena alternativa para complementar estudios de captura, donde la “recaptura” de los animales marcados se realiza visualmente, haciendo innecesaria su recaptura física, reduciendo así efectos adversos sobre el bienestar animal.

Referencias

- Barja I, Navarro-Castilla Á, Pérez L. 2016. Effectiveness and applications of hair traps for the study of wild mammal populations. *Polish Journal of Ecology* 64:409-419.
- Burton A C, Neilson E, Moreira D, Ladle A, Steenweg R, Fisher J T, Bayne E, Boutin S. 2015. Wildlife camera trapping: a review and recommendations for linking surveys to ecological processes. *Journal of Applied Ecology* 52: 675-685.
- Caravaggi A, Banks P B, Burton C A, Finlay C, Haswell PM, Hayward M W, Rowcliffe M J, Wood M D. 2017. A review of camera trapping for conservation behaviour research. *Remote Sensing in Ecology & Conservation* 3:109-122.
- Cusack J J, Dickman AJ, Kalyahe M, Rowcliffe J M, Carbone C, MacDonald D W, Coulson T. 2017. Revealing kleptoparasitic and predatory tendencies in an African mammal community using camera traps: a comparison of spatiotemporal approaches. *Oikos*, 126:812-822.
- DeMatteo K E, Rinas M A, Argüelles C F, Zurano J P, Selleski N, Bitetti M S, Eggert L S. 2014. Noninvasive techniques provide novel insights for the elusive bush dog (*Speothos veneticus*). *Wildlife Society Bulletin*, 38:862-873.
- du Preez B D, Loveridge A J, Macdonald D W. 2014. To bait or not to bait: a comparison of camera-trapping methods for estimating leopard *Panthera pardus* density. *Biological Conservation* 176:153-161.
- Gopaldaswamy A M, Karanth K U, Kumar N S, Macdonald D W. 2012. Estimating tropical forest ungulate densities from sign surveys using abundance models of occupancy. *Animal Conservation* 15:669-679.
- Goswami V R, Laretta M V, Madhusudan M D, Karanth K U. 2012. Optimizing individual identification and survey effort for photographic capture-recapture sampling of species with temporally variable morphological traits. *Animal Conservation*, 15:174-183.
- Hamel S, Killengreen S T, Henden J A, Eide NE, Roed-Eriksen L, Ims R A, Yoccoz N G. 2013. Towards good practice guidance in using camera-traps in ecology: influence of sampling design on validity of ecological inferences. *Methods in Ecology & Evolution*, 4:105-113.
- Kelly M J, Betsch J, Wultsch C, Mesa B, Mills L S. 2012. Noninvasive sampling for carnivores. En: *Carnivore Ecology and Conservation: A handbook of techniques*. Eds. L. Boitani & R. Powell, Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 47-69.

- Klare U, Kalmer J F, Macdonald D W. 2011. A comparison and critique of different scat-analysis methods for determining carnivore diet. *Mammal Review* 41:294-312.
- Krebs C J. 2006. Mammals. En: W. J. Sutherland, *Ecological Census Techniques: A Handbook*, 2nd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. pp. 351-369.
- Lagos N, Villalobos R. 2012. Técnicas de estudios de carnívoros terrestres. En: Iriarte AW, Jaksic FM (Eds.), *Los carnívoros de Chile*. Ed. Flora & Fauna Chile y CASEB-PUC, Santiago, Chile. pp. 57-86.
- Long R A, Donovan T M, Mackay P, Zielinski W J, Buzas JS. 2007. Comparing scat detection dogs, cameras, and hair snares for surveying carnivores. *Journal of Wildlife Management* 71:2018-2025.
- Miller D L, Burt M L, Rexstad E A, Thomas L. 2013. Spatial models for distance sampling data: recent developments and future directions. *Methods in Ecology and Evolution* 4(11): 1001-1010.
- Novaro A J, Capurro A F, Travaini A, Funes M C, Rabinovich J E. 1992. Pellet-count sampling based on spatial distribution: a case study of the European hare in Patagonia. *Ecología Austral* 2: 11-18.
- Proulx G, Cattet M R, Powell R A. 2012. Humane and efficient capture and handling methods for carnivores. En: Boitani L, Powell, R. *Carnivore ecology and conservation: A handbook of techniques*. Oxford University Press Inc., New York, New York, USA. pp. 70-129.
- Rovero F, Marshall AR. 2009. Camera trapping photographic rate as an index of density in forest ungulates. *Journal of Applied Ecology* 46: 1011-1017.
- Rowcliffe J M, Field J, Turvey S T, Carbone C. 2008. Estimating animal density using camera traps without the need for individual recognition. *Journal of Applied Ecology* 45: 1228-1236.
- Rowcliffe J M, Kays R, Kranstauber B, Carbone C, Jansen P A. 2014. Quantifying levels of animal activity using camera trap data. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 1170-1179.
- Rowcliffe J M, Jansen P A, Kays R, Kranstauber B, Carbone C. 2016. Wildlife speed cameras: measuring animal travel speed and day range using camera traps. *Remote Sensing in Ecology & Conservation* 2: 84-94.
- Russell W M S, Burch R L. 1959. *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London, UK. ISBN 0900767782.
- Thomas L, Buckland S T, Rexstad E A, Laake J L, Strindberg S, Hedley S L, Bishop J R B, Marques T A, Burnham K P. 2010. Distance software: design and analysis of distance sampling surveys for estimating population size. *Journal of Applied Ecology* 47: 5-14.
- Tobler M W, Zuñiga Hartley A, Carrillo-Percastegui S E, Powell G V. 2015. Spatiotemporal hierarchical modelling of species richness and occupancy using camera trap data. *Journal of Applied Ecology* 52: 413-421.
- Wearn O R, Glover-Kapfer P. 2017. *Camera-trapping for conservation: a guide to best-practices*. WWF Conservation Technology Series 1(1). WWF-UK, Woking, UK. 180 pp.

- Weather C P, Bell J R, Cook P A. 2011. *Practical Field Ecology*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 362 pp.
- Webbon C C, Baker P J, Harris S. 2004. Faecal density counts for monitoring changes in red fox numbers in rural Britain. *Journal of Applied Ecology* 41:768-779.
- Zero V H, Sundaresan S R, O'Brien T G, Kinnaird M F. 2013. Monitoring an Endangered savannah ungulate, Grevy's zebra *Equus grevyi*: choosing a method for estimating population densities. *Oryx* 47: 410-419.

CAPÍTULO 16

Avances de estudios en Uruguay: pautas para la captura de ejemplares de venado de campo

Susana González^{1,2}

El venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus, 1758) es un cérvido nativo que habitaba una amplia área de distribución geográfica, que comprende regiones de campo abierto en Brasil, Bolivia, Paraguay, Argentina y todo el Uruguay (Jackson, 1987). Era una especie abundante en los distintos tipos de ambientes abiertos sudamericanos como el cerrado brasileño, los pastizales inundables del Pantanal, chaco argentino-paraguayo, pampa húmeda y seca argentina y en el campo de todo el Uruguay.

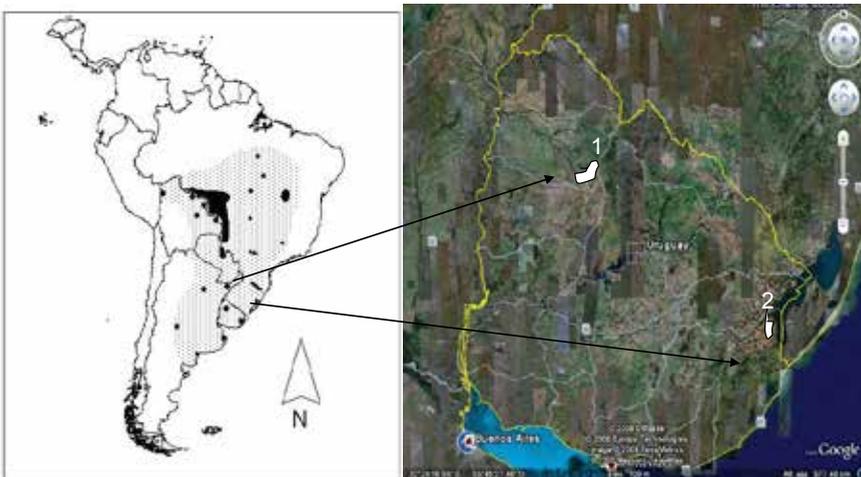


Figura 1. Mapa de la distribución geográfica en el continente sudamericano. En detalle se observa la ubicación de las poblaciones Uruguayas: 1) Arerungá, Departamento de Salto y 2) Los Ajos, Departamento de Rocha.

- 1 Genética de la Conservación - Departamento de Biodiversidad y Genética IIBCE-MEC. Uruguay.
- 2 Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay - iconservacionneotropical@gmail.com

El venado de campo es un cérvido de tamaño mediano: 70 cm de altura a la cruz y 25 a 35 kg de peso. El color del pelaje es “bayo claro” en toda la zona dorsal. En los flancos, la parte inferior del cuello, vientre, la cara inferior de la cola, y el área que rodea los ojos y labios, es de color “ante crema” (*cream buff*) muy claro. Los machos se diferencian de las hembras por poseer un par de astas de unos 30 cm de longitud que, en el adulto, presentan 3 puntas o garcetas, aunque se han registrado individuos con puntas supernumerarias. Las hembras son de menor tamaño y se diferencian de los machos por presentar un mechón blanquecino en forma de remolino en la zona frontal.

Factores que determinaron la declinación poblacional

La declinación y extinción de las poblaciones de venado se debió a diversos factores. Los registros históricos y arqueológicos muestran que el venado de campo era sumamente abundante e integraba parte importante de la dieta de los habitantes indígenas del Río de la Plata.

Cuando Charles Darwin visita nuestro país en 1839, lo describe como un cérvido “excesivamente abundante”, que se encontraba en general en pequeños grupos en ambos márgenes del Río de la Plata. Otro dato histórico relevante que Thornback & Jenkins (1982) comentan es que durante 1870-1880 se exportaron 2.000.000 de cueros desde los puertos de Buenos Aires y Montevideo. Esta cita permite inferir los grandes tamaños poblacionales de la época y el nivel de explotación que se ejercía en ese período.

Situación actual de la especie en el Uruguay

A nivel internacional la Convención Internacional para el Tráfico y comercio de Especies Amenazadas (CITES) incluyó al venado de campo en el Apéndice I, ya que catalogó a la especie “en peligro de extinción en toda el área de distribución” (Giménez Dixon, 1991). El proceso de declinación en el número de poblaciones, ocurrido a escala regional, se encuentra claramente representado en nuestro país. En el Uruguay en el año 1985, el Poder Ejecutivo declaró al venado de campo como “Monumento Natural”, considerando su crítica situación poblacional (Decreto 12/985). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) evaluó a la especie globalmente con la categoría de “Preocupación Menor”. Sin embargo en Uruguay se conocen dos poblaciones de venado de campo: El Tapado (1.000-1.200 individuos) en el Depto. de Salto, y Los Ajos (300-400 individuos), en el Depto. de Rocha. Las dos poblaciones están catalogadas por la UICN “en peligro de extinción”. A su vez en el panorama regional, las poblaciones uruguayas presentan tres características de gran interés desde el punto de vista de la conservación de nuestros recursos biológicos:

- Han sido recientemente consideradas como dos nuevas subespecies para la ciencia, perteneciendo la población de Salto a la subespecie *O. b. arerunguaensis* y la de Rocha a la subespecie *O. b. uruguayensis*, estas subespecies son endémicas de nuestro país (González *et al.*, 1998; 2002).
- A diferencia de las otras subespecies que se encuentran representadas en áreas protegidas de Brasil, Paraguay y Argentina; las poblaciones uruguayas se encuentran exclusivamente en establecimientos privados, donde se desarrollan actividades agropecuarias.
- Las características biológicas de esta especie la hacen un excelente candidato como *Especie focal* de la conservación del paisaje de pastizal.

Protocolos de captura y toma de muestras

En 2002, ante un brote de brucelosis en el stock ganadero de Rocha, se efectuó la captura de 15 ejemplares a solicitud de la División Sanidad Animal del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca del Uruguay, para evaluar si los ejemplares eran portadores. La captura de animales es fundamental para poder realizar la evaluación serológica de la especie, y es un procedimiento invasivo, especialmente en los ciervos, que son muy sensibles a los efectos del estrés. Es muy común que ocurran accidentes traumáticos, problemas cardiorrespiratorios y disturbios metabólicos graves como acidez y miopatía de la captura. En esta oportunidad se siguieron los criterios de la UICN para las especies en peligro de extinción para una captura segura que minimizara los riesgos y que permitiera efectuar la evaluación sanitaria.

Según Duarte *et al.* (2001) se deben considerar los siguientes factores en la selección de la técnica de captura:

- Debe ser segura para el equipo que la va a efectuar:

El equipo que participará en la captura tiene que tener perfecto conocimiento de los materiales, estrategia y manejo que se emplearán. Es importante que se defina quién es el profesional a cargo del procedimiento y cual será el rol de todos los participantes (inmovilización, toma de notas, toma de muestras, fotos, biometría, caravaneo). Si los roles están claramente definidos y aceptados se logrará una mejor coordinación en el momento de la captura. Debe haber un médico veterinario responsable y, en lo posible, con experiencia en animales silvestres. Se debe tener claro todos los materiales que serán necesarios para el traslado al lugar de la captura. A modo de ejemplo, es importante realizar una lista de materiales: drogas anestésicas y antagonistas, antihelmínticos, antibióticos, materiales y tubos para extracción serológica, muestras genéticas, ectoparásitos, fecas; para registro: fichas para los ejemplares, computadora, filmadora, fotografía; para toma de peso y medidas: balanza, centímetro; para marcar e identificar: caravanas y pinza.

- Debe estar considerada la máxima seguridad para el animal.
Se estará realizando una evaluación simultánea de todo el proceso de captura y recuperación de los ejemplares. Si se detectan problemas, se suspenderá el procedimiento.
- La metodología debe ser totalmente viable y, en lo posible, ya probada.
- El animal objeto de la captura debe tener una constante atención, observación y seguimiento hasta lograr una total recuperación de la captura física y química.

Principales emergencias durante la anestesia

1. Paro respiratorio

Si el animal no respira por más de un minuto, y el corazón está latiendo, está con paro respiratorio y se deberá:

- suspender inmediatamente la aplicación de las drogas inmovilizantes;
- verificar que no exista obstrucción de las vías aéreas, por exceso de saliva, lengua, postura anormal, aspiración del contenido del estómago, espasmo bronquial, corregir la posición, limpiar la vía y sacar la lengua para afuera;
- ventilar al animal manualmente comprimiendo el pecho, colocar oxígeno. Hacer 20 movimientos por minuto (1 cada 2 o 3 segundos) en animales jóvenes y 10 (1 cada 5 o 6 segundos) para animales mayores;
- aplicar drogas antagonistas como el clorhidrato de *yoimbina* o analépticos respiratorios como *clorhidrato de doxapran*.

2. Paro cardíaco

Si el animal está en un paro respiratorio y el corazón no se puede auscultar, repetir los pasos a, b y c, y además:

- comenzar masaje cardíaco con la palma de la mano abierta sobre la 4^{ta} a 6^{ta} costilla;
- usar drogas cardioestimulantes y vasopresoras; canular una vena y administrar los fluidos especialmente *Ringer Lactato* para combatir acidez respiratoria y aplicar *cloruro de calcio* al 10% (1 ml por cada 10 kg); continuar masaje, inyectar *adrenalina* de 0,1 a 2 ml y continuar masaje. Si el corazón continúa sin latir, repetir las dosis.

3. Shock

El síndrome de *shock* es un colapso general, con la reducción del volumen sanguíneo circulante, a través de la progresiva queda de la circulación periférica. Debido a la contracción de los capilares, provoca isquemia, hipoxia y

necrosis celular. La muerte ocurre por congestión y edema pulmonar y necrosis de los riñones e hígado.

4. Miopatía de la captura

Es una condición fisiopatológica descrita originalmente en herbívoros salvajes en África que se diagnostica clínicamente por intensa rigidez locomotora, incoordinación, depresión y muerte. Es un proceso complejo que envuelve la percepción de miedo por el sistema nervioso simpático y su interacción con las glándulas adrenales y la actividad muscular. Dado que una vez que el proceso se inicia es muy difícil revertirlo, la única medida posible es evitar que esto ocurra. Si la captura a persecución lleva mucho tiempo, hay mayores posibilidades que el animal la desarrolle. Es conveniente también reducir al máximo el tiempo de inmovilización, para evitar el estrés. El equipo que interacciona con el animal debe ser reducido y entrenado, evitar hacer ruido y realizar movimientos sincronizados. Se debe evitar la captura en las horas del día de mayor temperatura y se recomienda colocar al animal a la sombra en un lugar aireado, así como mantener húmedas cabeza, patas y orejas. Además, es importante monitorear continuamente la temperatura corporal y evitar la hipertemia. En los ciervos no se recomienda realizar la persecución por más de 5 minutos, porque se corre riesgo de que se desencadenen niveles de estrés peligrosos. Por último, se debe recordar que este síndrome es irreversible, así que la única profilaxis es evitarlo.

Inmovilización química

Se recomienda utilizar la siguiente asociación de drogas: *Xilazina* (1 mg/kg) + *ketamina* (5 mg/kg) + *atropina* (0,04 mg/kg). Se empleará como droga antagonista el *clorhidrato de yohimbina*.

Toma de muestras

Se realizará la biometría y se tomarán las muestras sangre, fecas, ectoparásitos. Se procederá a colocar caravana, pintura y fotografiar. Se evaluará en cada caso la necesidad de revertir la anestesia.

Consideraciones finales

Una vez realizado el procedimiento es fundamental realizar la evaluación final de cada etapa de la captura para determinar si es necesario realizar cambios a futuro. En los cérvidos, una mortalidad superior a 2% durante el procedimiento no es aceptable, por lo que se debe revisar el protocolo y el equipo utilizado. También se debe realizar el seguimiento de los ejemplares marcados para evaluar cómo se adaptan luego del proceso y si se reintegran a la población. Si los

animales fueron además equipados con radiocollares, se podrán conocer otros aspectos como éxito reproductivo, y otros datos del comportamiento de la especie.

Agradecimientos

A los productores de los establecimientos, por su dedicación para mantener esta especie emblemática. A la Facultad de Ciencias, IIBCE, CSIC-UdelaR PEDECI-BA y PPR-GEF del Uruguay, por el apoyo al proyecto Biología y conservación del Venado de Campo. A Wildlife Trust Alliance, Whitley Award, L'Oréal y UNESCO, por apoyo en el financiamiento.

Referencias

- Darwin C. 1839. Narrative of the surveying voyages of His Majesty's ships Adventure and Beagle between the years 1826 and 1836, describing their examination of the southern shores of South America and the Beagle's Circumnavigation of the Globe. London, Henry Colburn.
- Duarte J M B, Merino M L, González S, Veloso Nunes A L, Mansano Garcia J, Szabó M P J, Pandolfi J R, Arantes I G, do Nascimento A A, Zacarias Machado R, Pessoa Araujo Jr. J, Catão-Dias J L, Werther K, García J E, da Silva Girio R J, Reiko Matushima E. 2001. Order Artiodactyla, Family Cervidae (Deer). In: Biology, Medicine and surgery of South American Wild Animals, (Fowler M E, Cubas Z S Eds), Iowa State University press. Pp. 402-422, USA.
- González S, Maldonado J E, Leonard J A, Vilà C, Barbanti Duarte J M, Merino M, Brum-Zorrilla N, Wayne R K. 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology* 7:47-56.
- González S, Álvares-Valin F, Maldonado J. 2002. Morphometric Differentiation of Endangered Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with Description of New Subspecies from Uruguay. *Journal of Mammalogy* 83(4): 1127-1140.
- Giménez Dixon M. 1991. Estimación de parámetros poblacionales del venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus celer*, Cabrera, 1943 - Cervidae) en la costa de la Bahía de Samborombón (Pcia. de Buenos Aires) A partir de datos obtenidos mediante censos aéreos. Tesis U.N.L.P. 116 pp.
- Jackson J. 1987. *Ozotoceros bezoarticus*. *Mammals Species*, 259: 1-5.
- Thornback J, Jenkins M. 1982. The IUCN Mammal Red Data Book Part II. Internat. Union. Cons. Nature, Gland Switzerland, 516 pp.

CAPÍTULO 17

Avances de estudios en Uruguay: protocolos de manipulación de lobos y leones marinos

Valentina Franco-Trecu¹ - Helena Katz²

Realizar investigaciones científicas sobre la biología y ecología de animales silvestres mediante estudios a largo plazo, es una estrategia fundamental para una correcta conservación, gestión y uso sustentable de los recursos naturales. A diferencia de los modelos tradicionales usados en laboratorio, donde se buscan reactivos y condiciones biológicas lo más homogéneas posible, al trabajar con animales silvestres en su hábitat natural nos enfrentamos a heterogeneidad somática, genética, fisiológica, nutricional y reproductiva, bajo la influencia de numerosas variables ambientales. Estas condiciones determinan que los individuos de una misma población manifiesten respuestas diferentes frente a un mismo estímulo o desafío, por lo que la interpretación de resultados experimentales o fenómenos biológicos naturales deben ser analizados en una matriz muy compleja. Las investigaciones sobre el comportamiento maternal y reproductivo, los hábitos tróficos, la dinámica de poblaciones o estudios epidemiológicos, entre otros, requieren del seguimiento de individuos en el tiempo mediante marcaje, de la obtención de muestras y/o equipamiento con diferentes dispositivos, haciendo necesaria su captura y manipulación. Es importante lograr estos objetivos cuidando del bienestar de los ejemplares, de los operarios y del ambiente.

En Uruguay habitan dos especies de pinnípedos: el lobo fino sudamericano (*Arctocephalus australis* -Aa) y león marino sudamericano (*Otaria flavescens* -Of). Presentan ciclos de reproducción anuales, con una estación reproductiva que se extiende desde noviembre a diciembre para Aa y desde enero a febrero para Of (Franco-Trecu *et al.*, 2014; 2015). A continuación se resumen las experiencias obtenidas en la manipulación de estos animales (cachorros de ambos sexos y hembras adultas) a lo largo de un programa de investigación realizado entre los años

1 Departamento Ecología y Evolución. Facultad de Ciencias. Udelar. Uruguay. vfranco-trecu@fcien.edu.uy

2 Facultad de Veterinaria, Udelar. Montevideo. Uruguay. helekatz@gmail.com

2004 y 2013. Los cachorros de ambas especies, pueden ser capturados con lazo, copos o, en ciertas circunstancias, manualmente (si están alejados de individuos adultos). Una vez capturada la cría, debe ser sujeta en las aletas posteriores con una mano y en la zona pectoral con la otra. Sujetada de esta manera, la cría no se muestra estresada ni realiza fuerza significativa para liberarse (Fig. 1). En el momento de marcar u obtener muestras, deben sujetarse contra una superficie lisa y estable el cuello y las aletas posteriores, evitando que apoye las aletas anteriores, con las que realiza la mayor fuerza de movimiento. Para reducir parte del estrés de la manipulación es aconsejable colocar un pañuelo o tela sobre la cabeza o los ojos, manteniendo las vías respiratorias despejadas. Como método de identificación a corto plazo se pueden realizar pequeñas marcas en el pelo con pintura sintética (usando diferentes colores), con decolorante de cabello o con diferentes cortes de pelo (números, letras, símbolos). Sin embargo, para ciertos estudios comportamentales o poblacionales, que requieren el seguimiento individual a largo plazo, es necesario realizar marcas permanentes y visibles a distancia. En este caso se utilizan caravanas (tags) marca Allflex® N° 12 (<http://www.allflex.com.uy/Home.aspx>) con numeración grabada a láser (Fig. 1).



Figura 1. Forma correcta de sujetar una cría, en este caso de lobo fino (*Arctocephalus australis*).

Pueden usarse diferentes colores para los años, colonias, etc. Antes de colocar la caravana con las pinzas, es aconsejable realizar una perforación con un sacabocado de manera de poder desinfectar la piel y la herida con iodopovidona y *spray* cicatrizante (por ejemplo, bactrovet plata®); a su vez, la porción de piel sustraída puede usarse como muestra para estudios de genética o isótopos estables (entre otros) (Fig. 2 ejemplo en adulto). El sexado de las crías se realiza por observación de la zona del atrio donde se encuentra el ano y el vestíbulo en las hembras, mientras que en machos se verifica además el orificio prepucial en la región ventral caudal cercana al ombligo. Las medidas morfométricas generalmente utilizadas son el largo estándar medido en línea recta (punta de la nariz

a punta de la cola) y el perímetro axilar (circunferencia a la altura de las aletas anteriores).



Figura 2. Procedimiento de marcaje de individuos con caravanas numeradas. Perforación, conservación del tejido, desinfección y colocación de la caravana. Ejemplo en hembra adulta de león marino (*Otaria flavescens*).

Para pesar a los cachorros se colocan en una bolsa de tela y se cuelgan de una balanza de brazo o de gancho. En este procedimiento no es necesario suministrar ningún tipo de fármaco tranquilizante, ya que es una manipulación breve (3-6 minutos por individuo) y no traumática. En caso de ser necesario obtener muestras de sangre, es obtenida de las venas de las aletas caudales o de la vena glútea. La venopunción de las aletas caudales es más fácil en los días calurosos debido a la vasodilatación periférica; se realiza una ligadura en la región tarsiana y hacia la región distal puede observarse sobre la piel dorsal el recorrido de las venas digitales. Una vez ligado el miembro y manteniendo la aleta distendida, se realiza la punción en sentido oblicuo (25-30°) utilizando mariposa 21 o 23G, de preferencia de tubos cortos (para evitar que se coagule la sangre); una vez que se accede a la vena, se ensambla la jeringa (en general de 10 cc) para la colecta de sangre (Fig. 3). Antes y después de la punción debe desinfectarse la piel con alcohol 70°.



Figura 3. Extracción de sangre por venopunción en aleta caudal. Ejemplo en hembra adulta de león marino (*Otaria flavescens*).

Si es necesario obtener muestras de piel, pelo o grasa de individuos adultos, pueden realizarse biopsias a distancia, sin necesidad de manipular directamente el animal. En este caso se utiliza un rifle de aire comprimido (Dan-inject) y dardos especialmente fabricados para este fin (Fig. 4). Esto es especialmente útil para obtener muestras de machos, ya que estos, por su tamaño y comportamiento, generalmente no son capturados.



Figura 4. Obtención de biopsia por medio del disparo de dardos con rifle de aire comprimido, en un macho adulto de león marino (*Otaria flavescens*).

Cuando se trabaja con animales de mayor porte, y deben realizarse procedimientos más complejos, es necesario el uso de fármacos psicotrópicos (tranquilizantes, anestésicos). De esta manera se complementa la contención física, se evita o reduce la probabilidad de daño a los animales (golpes, traumatismos, excesivo estrés por el forcejeo), o accidentes con los operarios que realizan la

captura (mordidas, golpes, traumatismos en general, cansancio). A su vez, esto permite minimizar el estrés, reducir el tiempo total de manipulación y obtener muestras de forma segura (Champagne *et al.*, 2012). Desde el punto de vista fisiológico, el aparato cardiorespiratorio de los pinnípedos presenta adaptaciones morfofuncionales que permiten la respuesta de buceo caracterizada por la apnea, bradicardia y vasoconstricción periféricas; de esta manera se concentra la mayor parte del flujo sanguíneo hacia el cerebro y corazón (Thornton & Hochachka, 2004). Debido a estas adaptaciones, la anestesia en este grupo de animales es un proceso desafiante, ya que puede implicar riesgos en la respuesta a los fármacos utilizados. Uno de los potenciales riesgos es la inducción a una apnea y bradicardia prolongada que, asociado a la redistribución sanguínea, puede resultar en una alta concentración de drogas liberadas hacia el sistema nervioso central y corazón. Esta situación influye desproporcionadamente en el nivel de anestesia para una dosis dada (Bornemann & Plotz, 1993; Wheatley *et al.*, 2006) pudiendo causar la muerte de los animales (Lynch *et al.*, 1999; Haulena & Heath, 2001) o causar complicaciones derivadas de una sobredosis de drogas (Haulena, 2007). Por otro lado, algunos anestésicos o combinaciones no producen una buena relajación muscular y pueden estar asociados a tiempos prolongados de inducción o recuperación (Spelman, 2004). La hipertermia y la hipotermia pueden ocurrir debido a cambios en el metabolismo relacionados con el estrés de captura o anestesia, alteración de los centros termorreguladores inducida por fármacos o cuando la temperatura ambiente es alta o baja (Lynch *et al.*, 1999; Baylis *et al.*, 2014). El estado fisiológico de los individuos (estado nutricional, sexo, edad, gestación, lactancia) y salud (patógenos, enfermedad) también influye en el efecto anestésico (Fowler, 1995; Kreeger *et al.*, 2002). Por tanto, las características de la especie, la respuesta individual y las condiciones ambientales son factores clave en la selección de los fármacos a utilizar.

A continuación se presentan los protocolos de sedación e inmovilización farmacológica de hembras adultas de ambas especies de pinnípedos utilizados exitosamente en Uruguay (Katz *et al.*, 2018), reportando los parámetros fisiológicos básicos durante el posparto temprano. De acuerdo a la bibliografía disponible, y a la experiencia de diferentes veterinarios, se seleccionaron fármacos que tuvieran un amplio margen terapéutico, con un efecto mínimo a nivel cardiovascular y respiratorio, que dispusieran de drogas antagónicas (antídotos), asegurando su reversibilidad. De esta manera, además de poder trabajar manteniendo parámetros fisiológicos estables, una vez finalizada la manipulación, aseguramos la recuperación y el retorno de los animales a su ambiente (Lynch *et al.*, 1999; Haulena & Heath, 2001). Durante los meses calurosos, la captura de los animales debe realizarse temprano en la mañana (7:00 a 10:00 am) o al final de la tarde (después de las 17 hs) evitando las horas de mayor temperatura (por tendencia a la hipertermia). La dosis se estimó en base a un peso de las hembras adultas de 45 kg en Aa y de 130 kg para Of. Es importante seleccionar animales con

apariciencia sana de acuerdo a su comportamiento (alerta, respuesta adecuada a estímulos de otros animales de la colonia o de la cría) y con buena condición corporal (curvas redondeadas en tórax-abdomen-grupa por la grasa subcutánea). Las hembras deben ser enlazadas o capturadas con copos para retirarlas de la colonia e introducir las en una jaula; antes de cerrar la puerta trasera, se les inyecta el fármaco correspondiente por vía intramuscular en la región glútea. Para Aa se utilizó midazolam (0,5%) (Midapine®, Laboratorio Vetcross), con una dosis de 0,25-0,35 mg/kg de como única droga. Para Of se utilizó una combinación de Midazolam (5%) (Lauden's Pharmacy, 1820 41st Avenue, Suite F Capitola, CA 95010, USA, <http://www.laudenpharmacy.com/>), 0,15-0,5 mg/kg y Dexmedetomidina clorhidrato (0,5 %) (Dexdormitor®, Laboratorio Zoetis), 0,003-0,005 mg/kg en la misma jeringa. Luego de administrado el fármaco se cerraba la jaula y se cubría con una tela hasta obtener el efecto deseado (tranquilizante para Aa, inmovilización física para Of). Una vez alcanzado ese efecto, los animales deben ser retirados de la jaula y colocados en camilla de contención. Tanto en el momento de colocarse en la camilla, como al final del procedimiento, debe monitorearse la mucosa oral y regularmente la temperatura corporal rectal (termómetro digital), la frecuencia cardíaca y respiratoria (observación de movimientos del tórax: respiraciones/minuto, el choque de punta del corazón: golpes/minuto) o disponer de un pulsoxímetro. La auscultación estetoscópica es difícil de evaluar debido al espesor de la grasa subcutánea y de los planos musculares. Para Aa el tiempo promedio de inducción (tiempo entre la inyección de la droga y efecto tranquilizante) fue de 13 min (rango = 5-26 min). Los animales permanecen deprimidos, pero mantienen una respuesta de defensa, por lo que son sujetados en una camilla de contención para la obtención de muestras, colocación de dispositivos o la manipulación que sea necesaria. La temperatura corporal promedio para las hembras de Aa fue de 37,9°C (SD = 0,59). En esta especie las frecuencias cardíaca y respiratoria no fueron monitoreadas en detalle, ya que las hembras permanecían reactivas durante todo el procedimiento, lo que dificulta el control preciso. Para Of, el tiempo promedio de inducción fue de 23 min (rango = 15-45 min); los animales alcanzaron un buen plano anestésico, buena relajación muscular corporal de la cabeza y de la quijada, manteniendo el reflejo de cierre de narinas y palpebral; la temperatura corporal promedio fue de 38,5°C (rango = 37,5-39,2°C); la frecuencia cardíaca media fue 84/min (80-92), mientras la frecuencia respiratoria media fue de 6/minuto (5 a 8/min). Si las hembras presentan temperatura rectal mayor a 39°C, se les debe mojar las aletas y cabeza con agua fresca para evitar hipertermia. En todos los casos las mucosas oral y vaginal presentaron color normal. El marcaje permanente de las hembras se realiza de la misma manera que para los cachorros, solo que se utilizan caravanas Allflex N° 4 (Fig. 2). La obtención de muestras de sangre (Fig. 3) y de las medidas morfométricas también se realiza de la misma manera. Para pesar a los animales, la balanza es colocada en un trípode y se cuelga la hembra sujeta a la camilla. Al finalizar la manipulación, cada animal debe ser colocado próximo a la zona donde fue capturado (~

5 m) para evaluar su recuperación apropiada, facilitar el retorno a la colonia y el encuentro con la cría, de ser el caso. En el caso de Of, se le inyectó uno de los reversores (de la dexmedetomidina) en forma intramuscular en la región glútea: Atipamezol 5% (Antisedan®, Lab. Zoetis), 0,15 mg/kg. El tiempo de recuperación promedio fue de 28 min (rango = 5 a 45), en general con un rápido despertar y en alerta, mientras que algunas hembras se mantuvieron somnolientas, pero con capacidad para trasladarse hacia su harén y reencontrarse con la cría.

Los protocolos de sedación y anestesia presentados constituyen herramientas apropiadas para la inmovilización de las especies de pinnípedos que habitan en Uruguay (Katz *et al.*, 2018). Las combinaciones anestésicas que cuentan con antidotos permiten trabajar con mayor seguridad, en particular cuando se trabaja con animales nerviosos o de gran porte. En todos los casos se deberá contar con drogas de emergencia y equipos de respiración asistida ante la eventual sobredosisificación o respuesta adversa frente a los fármacos utilizados. Esto es de particular importancia cuando se desconocen las condiciones de salud o estado fisiológico (preñez, adelgazamiento por ayuno) de los ejemplares capturados. Para cualquier procedimiento de captura de animales silvestres en su hábitat natural es primordial hacer una planificación adecuada, evaluar las condiciones climáticas, los protocolos de captura disponibles y contar con un equipo de personas entrenadas a los efectos de realizar un trabajo eficiente, minimizando riesgos, obteniendo muestras de calidad y optimizando el trabajo de equipo.

Agradecimientos

Agradecemos los aportes de numerosos veterinarios que trabajan en pinnípedos silvestres o en cautividad: D. Schuman, M. Haulena, W. Van Bonn, G. Lacave, F. Cirillo, F. Muñoz, N. Crosignani y V. Ruoppollo. También a los Laboratorios König, Vetcross y Pfizer por la donación de drogas y medicamentos en las diferentes oportunidades de trabajo. También a DINARA-MGAP, por los permisos de captura otorgados en el marco de diferentes proyectos de investigación (Resoluciones N° 1022/2010, N° 126/2012, N° 83/2013); a los loberos que nos ayudaron y enseñaron la captura de animales (L. Olivera, N. Veiga, M. Casella) y a los numerosos voluntarios que colaboraron en el trabajo de campo: F. Riet, C. Abud, M. García, E. Haller, P. Sitjar, J. Gutiérrez, L. Verger.

Referencias

- Baylis A M M, Page B, Staniland I, Arnould J P Y, McKenzie J. 2015. Taking the sting out of darting: Risks, restraint drugs and procedures for the chemical restraint of Southern Hemisphere otariids. *Marine Mammals Science*, 31: 322-344.
- Bornemann H, Plötz J. 1993. A field method for immobilising Weddel seals. *Wildlife Society Bulletin* 21: 437-441.

- Champagne C D, Houser D S, Costa D P, Crocker D E. 2012. The Effects of Handling and Anesthetic Agents on the Stress Response and Carbohydrate Metabolism in Northern Elephant Seals. *PLoS ONE*, 7(5): e38442.
- Fowler M E. 1995. Restraint and handling of wild and domestic animals, 2nd edition. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Franco-Trecu V, Costa-Urrutia P, Schramm Y, Tassino B, Inchausti P. 2014. Sex on the rocks: breeding tactics and reproductive success of the for South American fur seal males. *Behavioral Ecology* 25(6): 1513-1523.
- Franco-Trecu V, Costa-Urrutia P, Schramm Y, Tassino B, Inchausti P. 2015. Tide line vs internal pool: mating system and breeding success in the South American sea lion males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 69(12): 1985-1996.
- Haulena M. 2007. Otariid seals. In: Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. Blackwell Publishing, Ames G, West IA, Heard D, Caulkett N. Eds. pp 469-478.
- Haulena M., Heath R B. 2001. Marine mammal anesthesia. In Dierauf L A, Gulland F M D, Eds. CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. 2nd edition. CRC Press, Baco Raton FL. Pp 655-688.
- Katz H., Reisfeld L., Franco-Trecu V. 2018. Chemical immobilization protocols in free-ranging South American fur seal (*Arctocephalus australis*) and adult female South American sea lion (*Otaria flavescens*). *Marine Mammals Science* 35: 327-335.
- Kreeger T, Aremo J, Raath J. 2002. Handbook of wildlife chemical immobilization. Wildlife Pharmaceuticals, Fort Collins, Colorado, USA.
- Lynch MJ, Tahmindjis MA, Gardner H. 1999. Immobilisation of pinniped species. *Australian Veterinary Journal* 77: 181-185.
- Spelman L H. 2004. Reversible anesthesia of captive California sea lions (*Zalophus californianus*) with medetomidine, midazolam, butorphanol, and isoflurane. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35(1): 65-69.
- Thornton S J, Hochachka P W, Uhm. 2004. Oxygen And the diving seal. *Journal of Undersea Hyperbaric Medicine* 31(1): 81-95.
- Wheatley K E, Bradshaw C J A, Harcourt R G, Davis L S, Hindell M A. 2006. Chemical immobilization of adult female Weddell seals with tiletamine and zolazepam: effects of age, condition and stage of lactation. *BMC Veterinary Research*. 2:8, <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-8>.

CAPÍTULO 18

Avances de estudios en Uruguay: murciélagos

Ana L. Rodales¹ - Germán Botto²

El siguiente apartado trata sobre el Orden Chiroptera e intenta mostrar cómo se trabaja con este grupo en el país. Los temas que se abordan refieren a métodos de muestreos, técnicas de manipulación, toma de muestras biológicas, marcaje, liberación, eutanasia y colecta para colecciones científicas, utilizados por el Programa para la Conservación de los Murciélagos de Uruguay (PCMU).

El Orden Chiroptera representa alrededor de la cuarta parte de los mamíferos actuales, con aproximadamente 1.200 especies (Kunz *et al.*, 2011). En Uruguay se han registrado hasta el momento 23 especies pertenecientes a tres familias: Vespertilionidae (12 spp.), Molossidae (8 spp.) y Phyllostomidae (3 spp) (González & Martínez-Lanfranco, 2010).

Métodos de muestreo

Los métodos de muestreo utilizados en Uruguay para el estudio de murciélagos se pueden dividir básicamente en dos: métodos invasivos, donde se tiene un contacto cercano con el animal (red de niebla, calderín, captura manual) y el método no invasivo de detección de vocalizaciones ultrasónicas emitidas por los murciélagos, donde no existe la necesidad de entrar en contacto directo con el animal.

1 Programa para la Conservación de los Murciélagos de Uruguay (PCMU)/Museo Nacional de Historia Natural/MEC. Uruguay - arodales@gmail.com

2 - Programa para la Conservación de los Murciélagos de Uruguay (PCMU)/Museo Nacional de Historia Natural/MEC. Uruguay
- Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina. Universidad de la República. Uruguay - germanbotto@gmail.com

Redes de niebla

Es el método más utilizado en Uruguay. Consiste en desplegar una o varias mallas de material sintético (nylon) de diferentes longitudes (6, 9 y 12 metros) en sitios donde es probable capturar murciélagos (pasajes o claros dentro del monte, refugios, bordes de cuerpos de aguas, bordes de montes) como muestra la figura 1. Los murciélagos que vuelan por dichos sitios chocan y quedan enredados en la red (Fig. 2), por lo que éstas deben ser revisadas periódicamente para evitar que los animales se enreden excesivamente haciendo que el tiempo de manipulación aumente, lo cual provoca un mayor nivel de estrés en ellos. Si la red de niebla es colocada a la salida de un refugio, se recomienda no abandonarla, para así poder desenredar a los murciélagos a medida que son capturados. En cambio, si la red es colocada en un sitio de pasaje, el tiempo entre revisiones puede ser mayor, ya que el número de murciélagos que se capturan es notoriamente menor que frente a un refugio.

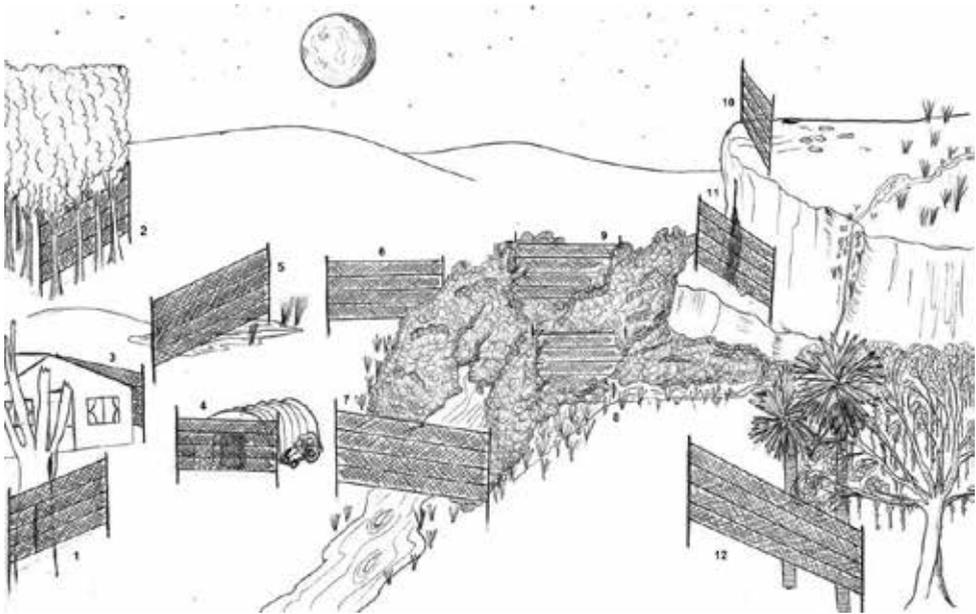


Figura 1. Doce sitios donde colocar redes de niebla: 1. frente a árboles huecos, 2. en montes de abrigo de eucaliptus viejos, 3. en bordes de techados con grietas y ranuras, 4. en puertas de galpones, 5. sobre cuerpos de agua lénticos, 6. perpendicular al borde del monte, 7. cruzando cuerpos de agua lóticos, 8. dentro del monte a nivel del suelo, 9. en el dosel arbóreo, 10. en el borde de desniveles en el terreno, 11. frente a cuevas y grietas, 12. cerca de palmeras y de árboles con abundante vegetación epífita. Tomado de González & Martínez-Lanfranco, 2010. Dibujo por E. M. González.

Calderín de mano

Se utiliza principalmente en los refugios (cuevas, minas, edificios, árboles), cuando los murciélagos se encuentran a la vista del investigador (Fig. 2). Es recomendable que el calderín sea profundo y de malla fina (tipo calderín para insectos), para que los murciélagos se deslicen hacia el fondo evitando que se escapen o se enganchen. A su vez, debería ser lo más liviano posible para poder realizar un movimiento rápido y maniobrable que permita capturar los animales lo más rápido y seguro posible. Kunz & Kurta (1988) recomiendan que el calderín tenga alrededor de 45 cm de diámetro, 85 cm de profundidad y que el soporte por donde lo asimos sea extensible para utilizarlo con murciélagos que se encuentren a diferentes alturas. Además, Kunz *et al.* (2009) recomiendan acolchonar el aro de alambre y la unión de éste al mango, para evitar causar lesiones a los animales.



Figura 2. Métodos de captura de murciélagos. Izquierda: uso de calderín en un refugio. Derecha: murciélago enredado en la red de niebla.

Captura manual

También es un método utilizado cuando los murciélagos se encuentran en su refugio. Es recomendable utilizar guantes de cuero o un recipiente para cubrir el murciélago mientras se le desliza por debajo un trozo de cartón, evitando de esta forma el contacto directo con el animal. En otras ocasiones, el investigador quizás necesite utilizar una pinza larga para extraer a los murciélagos de grietas profundas. En estos casos, hay que tener especial cuidado para evitar daños en los huesos y membranas de las alas. Kunz *et al.* (2009) recomiendan acolchonar los extremos de las pinzas para evitar estos daños.

Para capturar murciélagos en sus refugios, el investigador deberá tener especial cuidado con la frecuencia con la que va a intervenir y el momento del año, para de esta forma minimizar los disturbios. Capturas muy frecuentes pueden llevar al abandono del refugio. A su vez, se recomienda minimizar las capturas

durante períodos sensibles, como la preñez tardía, durante la lactación temprana o en largos períodos de inactividad (meses fríos) (Kunz *et al.*, 2009).

La Ley de Fauna (ley n° 9.481 de 1935) y sus decretos reglamentarios regulan la caza o captura de la fauna uruguaya, dentro de la cual se encuentran los murciélagos. El Decreto 164/996 prohíbe expresamente la caza, tenencia, comercialización, transporte e industrialización de la fauna silvestre. A su vez, el mismo decreto establece la caza o colecta científica o con fines educativos, como la acción lícita de capturar o abatir mediante formas autorizadas, ejemplares de la fauna silvestre, con destino a museos, zoológicos, proyectos de investigación, acciones educativas o de divulgación. Por tanto, para la captura de murciélagos es imprescindible solicitar el permiso de colecta científica que emite la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA).

Detección de ultrasonido

Los murciélagos presentes en Uruguay emiten ultrasonidos en diferentes frecuencias para orientarse y alimentarse en el ambiente que los rodea. La detección de estas emisiones es un método relativamente reciente en Uruguay y consiste en colocar detectores de ultrasonido en sitios donde vuelan murciélagos para luego analizar las grabaciones obtenidas y así determinar las especies registradas. Cada especie de murciélago difiere en su canto (o llamada) de las demás, y previa confección de una biblioteca de cantos de referencia los investigadores pueden muestrear zonas donde las redes de niebla no son efectivas. Estos detectores pueden dividirse en detectores de registro activo, donde el investigador realiza transectas o muestreos por puntos donde activamente graba los cantos de murciélagos que va registrando; y detectores de registro pasivo donde el dispositivo permanece en el sitio a muestrear por un tiempo prolongado (toda la noche o incluso semanas) y se activa y graba automáticamente cuando un murciélago pasa en las inmediaciones del aparato. Actualmente en Uruguay existe una biblioteca parcial de referencia y un algoritmo de identificación de especies basado en esa biblioteca (Botto Núñez *et al.*, 2018).

Manipulación

Los murciélagos deben ser manipulados delicadamente, pero con firmeza, para evitar ser mordidos o causarle daños al animal, especialmente en los huesos y membranas de las alas que son particularmente frágiles (Barlow, 1999; Kunz *et al.*, 2009).

Previo a la manipulación de cualquier especie de murciélago, el investigador debe estar inmunizado contra el virus de la rabia. Este virus se transmite a través de la saliva, y aunque solo el 0,1% de los murciélagos puede estar infectado

(Sheeler-Gordon & Smith, 2001; Alegría-Moran *et al.*, 2017), una pequeña mordida puede poner en riesgo la salud del investigador. Teniendo en cuenta esto, algunos investigadores prefieren el uso de un guante de cuero (o una bolsa de tela) en la mano que sostiene al murciélago y con la otra mano desnuda desenredarlo de la red o tomar las muestras necesarias (Fig. 3). Generalmente el dedo pulgar es utilizado para sujetar el murciélago por la espalda, mientras que el abdomen se apoya sobre los demás dedos del investigador, como muestra la figura 3. Si el investigador no tiene experiencia en la manipulación es imprescindible que utilice guantes de cuero para sostener al animal.



Figura 3. Manipulación. Izquierda: investigador desenredando un murciélago utilizando una bolsa de tela para proteger la mano que sostiene al animal. Derecha: utilización de guante de cuero para sujetar al murciélago.

Al momento de desenredar un murciélago de una red de niebla, la práctica y la paciencia son factores muy importantes para lograr liberarlo de forma rápida y segura para ambos (murciélago e investigador). El primer paso es determinar de qué lado de la red entró el murciélago, para trabajar la liberación sobre ese lado. Una vez establecido donde se trabajará, se comienza a desenredar la zona posterior (cola y patas), ya que generalmente esta parte es la última en entrar a la red. Luego se sostiene la parte posterior para evitar que se enrede nuevamente y se continúa con las alas, una a la vez, con movimientos delicados para no dañar los huesos y la membrana de la mano. Por último, se desenredan la cabeza y las orejas (Kunz *et al.*, 2009).

Si se trata de un vampiro (*Desmodus rotundus*), se recomienda utilizar guantes de cuero holgados en ambas manos, para evitar que los dientes del murciélago lleguen a los dedos del investigador. Esta especie se comporta de forma más agresiva que el resto de las especies presentes en Uruguay, por lo que se recomienda inmovilizar la cabeza con el pulgar cuando el investigador lo está sosteniendo, como muestra la figura 4. El tiempo de manipulación dependerá, además, de la experiencia del investigador, del grado de enredo del murciélago,

siendo generalmente fácil y rápido cuanto menos tiempo haya pasado desde que cayó en la red. Por más detalles sobre la remoción de murciélagos de una red de niebla se recomienda consultar a Barlow (1999), Mitchell-Jones y Mc Leish (2004) y Kunz *et al.* (2009).



Figura 4. Se muestra la forma recomendada de sujetar a *Desmodus rotundus* (vampiro) luego de ser extraído de la red. El pulgar debe estar colocado firme por detrás de la cabeza para evitar que esta pueda girar y morder.

Otra forma de sujetar a los murciélagos, especialmente si uno quiere tomar datos sobre el estado reproductivo de los individuos, es colocando el dedo índice sobre el lomo del animal y con el dedo pulgar y el anular sostener hacia atrás las alas, dejando la zona ventral al descubierto, como se puede observar en la Fig. 5.



Figura 5. Se observa, de tres perspectivas diferentes, la mano del investigador sujetando al murciélago de forma tal que la zona ventral queda expuesta.

Toma de muestras

La manipulación de los murciélagos normalmente está vinculada a la toma de muestras biológicas, para análisis posteriores. En este apartado nos centraremos en las muestras a tomar sin necesidad de eutanasia. Entre las muestras más frecuentemente tomadas podemos mencionar las muestras de sangre (sangre completa, suero, plasma, frotis), hisopados de mucosas (bucal, rectal), pelo, piel, leche, materia fecal y ectoparásitos.

Sangre

Dependiendo de la especie, la muestra de sangre puede tomarse de la vena braquial, sobre el antebrazo o de la vena caudal en el uropatagio (Wibbelt et al., 2009). En cualesquiera de los casos, se puede realizar utilizando un capilar de vidrio (heparinizado o no, según el destino de la muestra). Al menos en *Eptesicus fuscus* se ha mostrado que la toma de sangre puede realizarse sin anestesia, sin que se encuentren diferencias en la sobrevida de los animales (Wimsatt et al., 2005; Ellison et al., 2006). Evitar la anestesia reduce significativamente el tiempo de manipulación y evita exponer a los animales a los riesgos de la anestesia y su recuperación. Si la muestra se toma del antebrazo y sin anestesia, se requiere inmovilizar al animal en decúbito dorsal para exponer el sitio de la incisión. Con entrenamiento, esto puede hacerlo un solo investigador. El volumen total de la muestra no debe superar el 1,0-1,5% del peso corporal (Wibbelt et al., 2009; Sikes, 2016). Se debe aplicar presión sobre la herida para favorecer la coagulación y comprobar que el sangrado se detuvo antes de liberar al ejemplar.

Mucosas

Una de las muestras habitualmente recolectada de murciélagos son los hisopados de mucosas para detección viral. Los dos más habituales son bucal y rectal (Wray *et al.*, 2016, Anthony *et al.*, 2017, Seltmann *et al.*, 2017). En ambos casos se trata de un procedimiento poco invasivo que puede realizarse sin anestesia. Para el hisopado bucal, la muestra puede tomarse pasando el hisopo por dentro de un cilindro que evite que el ejemplar muerda el hisopo durante la toma de muestra. Para evitar que el animal muerda el hisopo, puede utilizarse un espéculo. Wimsatt *et al.* (2005) utilizan el cuerpo de una jeringa de 1 cm³ para este fin en *E. fuscus*. En el caso de las especies presentes en Uruguay, un tubo eppendorf al que se le corta el extremo puede cumplir la misma función.

Piel

Para estudios moleculares, tanto las muestras de piel como de músculo presentan buena calidad para extracción de ADN nuclear y mitocondrial (Simmons & Voss 2009; Streicker *et al.*, 2016). En estudios que no implican la colecta de los ejemplares, la muestra de piel es la muestra de elección. Se puede tomar una muestra del plagiopatagio, utilizando un *punch* para biopsias de piel (Streicker *et al.*, 2016). Para las especies de Uruguay, agujas de 1,5 o 2,0 mm de diámetro resultan adecuadas. En caso de requerir muestras duplicadas, se debe tomar una de cada ala. Las muestras se deben tomar evitando las zonas vascularizadas o los haces musculares (evidentes observando el ala por transiluminación). Este procedimiento puede realizarse sin anestesia, procurando la coagulación, aplicando presión sobre la herida y comprobando que el sangrado se detuvo, antes de liberar al animal.

Leche

La toma de muestras de leche de hembras durante el período de lactación es de interés para analizar el aporte de nutrientes e inmunoglobulinas a las crías. Debido al tamaño de los ejemplares y al reducido volumen de la muestra, la contaminación es probable, y puede tener efectos considerables en los análisis posteriores (Hood *et al.*, 2009). Los métodos básicos para prevenir la contaminación incluyen el recorte del pelo circundante, la desinfección del área del pezón, y la prevención de la recontaminación con orina o materia fecal durante la manipulación (Hood *et al.*, 2009). Para aumentar el volumen de la muestra, puede usarse la inyección de oxitocina por vía intraperitoneal o intramuscular (inyectando en el pectoral mayor); las dosis empleadas en murciélagos sin efectos negativos observados han sido de 0,1 a 0,4 IU/g (Hood *et al.*, 2009). La colecta puede hacerse manualmente o utilizando pipetas o capilares (no heparinizados) (Hood *et al.*, 2009). Para la preservación es importante prever la posible pérdida de agua de

la muestra que puede llevar a la desnaturalización de las proteínas (Hood *et al.*, 2009). En Uruguay, hasta donde conocemos, sólo se realizó la toma de muestras de leche en murciélagos en 2005-2006, utilizando pipetas pasteur plásticas descartables, estimulando la secreción con una inyección de oxitocina intramuscular (datos no publicados).

Materia fecal

En murciélagos insectívoros, la colecta de materia fecal permite la identificación de presas, tanto mediante morfología de los restos como por técnicas moleculares (Whitaker *et al.*, 2009a). Para la colecta de la materia fecal en estas especies, se pueden capturar ejemplares previo al retorno al refugio y luego de alimentarse, y conservarlos en bolsas de tela suave hasta obtener la muestra (Rodaless, 2015). Se debe tener especial precaución para reducir la pérdida de calor y/o de agua en los ejemplares capturados. La materia fecal puede utilizarse también para la detección de virus, especialmente Coronavirus. En ese caso pueden utilizarse muestras individuales, o pueden tomarse muestras de colonias, colocando láminas plásticas bajo los sitios de refugio para recolectar muestras agrupadas de orina y materia fecal.

Ectoparásitos

Los ectoparásitos pueden colectarse directamente de los ejemplares utilizando una pinza de puntas finas. La preservación de los ectoparásitos en etanol 70 o 95% es adecuada (Frampton *et al.*, 2008; Whitaker *et al.*, 2009b). La mayor concentración permite una mejor conservación de los ácidos nucleicos para estudios moleculares, pero rigidiza más las estructuras del exoesqueleto, lo que puede dificultar la identificación taxonómica y disminuir su calidad como voucher morfológico (Whitaker *et al.*, 2009b). La selección del medio de conservación dependerá entonces de los objetivos del estudio. En caso de utilizarse etanol 95% como medio de preservación, se debe realizar la fijación en etanol 70% por 24 a 48 horas para asegurar la inactivación de patógenos potencialmente presentes en los ectoparásitos, ya que esta concentración muestra la mayor capacidad de inactivación de patógenos (Malik *et al.*, 2006). El compromiso entre la seguridad en el manejo de las muestras y la preservación de las estructuras morfológicas de interés en la identificación taxonómica y ácidos nucleicos poco fragmentados para estudios moleculares llevan al diseño de protocolos específicos para cada caso, de acuerdo a los objetivos. Whitaker *et al.*, (2009b) proponen un protocolo empleado con éxito por C. W. Dick, que utiliza etanol 95% para matar y fijar a los parásitos, seguido de la identificación taxonómica y preservación en etanol 95% a -80°C o en nitrógeno líquido para estudios moleculares; los ejemplares que se conserven como *vouchers* morfológicos son transferidos, tras la identificación,

a etanol 70% para su preservación. El problema con este protocolo es que sólo los ejemplares preservados a largo plazo como *vouchers* morfológicos están expuestos a una solución descontaminante efectiva. Nuestra propuesta es el uso de etanol 70% primero, seguido de transferencia a alcohol 95% y preservación en frío de las muestras para estudios moleculares tras 24 a 48 horas.

Marcaje

Para el estudio de este grupo se han desarrollado varias técnicas de marcaje, las que a través del tiempo se han ido ajustando según diversos factores como los objetivos de la investigación, la especie, la edad y el bienestar de los animales (Rodríguez-Posada & Santa-Sepúlveda, 2013). El marcaje de murciélagos ha sido una actividad poco desarrollada en Uruguay. Hasta 2015 la única forma utilizada para marcar a los animales era cortándoles un mechón de pelo sobre el lomo. Esta técnica se utiliza para estudios a corto plazo, ya que dependiendo de la estación del año o del período de muda del pelaje, el corte puede durar desde unas pocas semanas hasta cerca de un año (Stebbing, 2004). Otros métodos utilizados para marcar a corto plazo son etiquetas luminosas, tintas, decoloración de pelo, corte de uñas, correctores líquidos, esmaltes para uñas entre otras (Mitchell-Jones & McLeish, 2004; Kunz & Weise, 2009; Rodríguez-Posada & Santa-Sepúlveda, 2013).

Por otro lado, existen varios tipos de marcas que son utilizadas para estudios a largo plazo, como anillos (bandas metálicas de aves, bandas metálicas labiadas para murciélagos y bandas de plástico), collares y transponders, entre otras. A partir de 2015 el PCMU comenzó a marcar murciélagos en Uruguay utilizando la técnica del anillado con bandas metálicas labiadas (Fig. 6). Estas bandas tienen la particularidad de que fueron diseñadas específicamente para murciélagos, ya que los bordes labiados ayudan a prevenir las laceraciones en las membranas de las alas que provocan los bordes sin labios de las bandas metálicas utilizadas para aves. Son de fácil colocación, ya que no es necesario utilizar pinzas especiales, simplemente se coloca la banda abierta en el antebrazo y se oprime suavemente con el pulgar y el índice para cerrarla.



Figura 6. *Myotis* sp. con anilla labiada numerada en el antebrazo derecho.

Liberación

Generalmente, luego de la captura los murciélagos son colocados temporalmente en bolsas de tela suave, holgadas, de colores apagados, con un cordón para mantenerlas cerradas (Fig. 7). De esta forma los murciélagos pueden perchar sin estímulos externos que puedan incrementar su estrés, además de que se evitan daños en sus extremidades y el sobrecalentamiento o sofocación (Kunz & Kurta, 1988). El tiempo de permanencia en las bolsas depende de la muestra que se quiera obtener, pero se recomienda que no sea prolongado para evitar un estrés innecesario y el agotamiento de las reservas energéticas (Kunz *et al.*, 2009). Luego de la toma de datos, los murciélagos pueden ser liberados, teniendo en cuenta los requerimientos de altura de despegue de las diferentes especies.



Figura 7. Se observan las bolsas de tela para mantener a los murciélagos capturados.

Cómo regla general para los murciélagos de Uruguay, las especies pertenecientes a las Familias Vespertilionidae y Phyllostomidae pueden ser liberadas abriendo la bolsa y dejando salir al animal directamente desde la mano del investigador, como muestra la figura 8. Para el caso de *D. rotundus* (Phyllostomidae) se recomienda dejar la bolsa abierta sobre el suelo, ya que para esta especie no es un impedimento despegar desde ahí, y de esta forma evitamos que la mano entre en contacto con el animal. Las especies pertenecientes a la Familia Molossidae generalmente no pueden despegar desde la mano del investigador, debido a que necesitan mayor altura. En estos casos se recomienda buscar un poste de tres o más metros de altura (Fig. 8), o un árbol, donde dejar a los murciélagos, ellos treparán hasta la altura necesaria y se lanzarán al vuelo.



Figura 8. Liberación de murciélagos. Izquierda: Molósidos siendo liberados sobre un poste de tres metros aproximadamente. Derecha: Vespertilionido siendo liberado desde la mano del investigador.

Anestesia y eutanasia

El método de anestesia recomendado para las especies presentes en Uruguay es la anestesia gaseosa con Isoflurano (Mathews *et al.*, 2002; Lewis, 2004; Wimsatt *et al.*, 2005; Ellison *et al.*, 2006). También se ha utilizado en algunos casos la anestesia con ketamina, administrada intramuscularmente (Streicker & Allgeier, 2016). Hasta el momento no hay protocolos aprobados en el país que utilicen anestesia para murciélagos. Para procedimientos poco invasivos, como la extracción de sangre, se ha mostrado que la no utilización de anestesia no tiene un efecto negativo en la sobrevivencia de los murciélagos (Wimsatt *et al.*, 2005; Ellison *et al.*, 2006).

Para la eutanasia, el método más aceptado es el uso de barbitúricos, en particular pentobarbital sódico combinado con difenilhidantoína. La administración puede ser intracardiaca o intraperitoneal (Leary *et al.*, 2013; Sikes 2016). La administración intraperitoneal puede ser dolorosa debido al efecto irritante del compuesto, pero la intracardiaca requiere de mayor entrenamiento, especialmente en las especies pequeñas presentes en Uruguay. Los protocolos más recientes aprobados en la UdelaR para murciélagos proponen una dosis de 100 mg de pentobarbital por kg de peso corporal, en administración intracardiaca. Además de los barbitúricos, también se han utilizado diferentes agentes inhalantes, aunque varios de estos presentan problemas como la toxicidad para el investigador (*e. g.* cloroformo) o los riesgos de transporte (*e. g.* éter) (Simmons & Voss, 2009). Métodos físicos como la dislocación cervical y la compresión torácica han sido objeto de larga controversia. Para la American Veterinary Medical Association, la compresión torácica es inaceptable a menos que el animal se encuentre inconsciente (Leary *et al.*, 2013), mientras que para la American Society of Mammalogists es un método que puede ser utilizado, especialmente cuando en situaciones en el campo no se cuenta con agentes químicos (Simmons & Voss, 2009; Sikes, 2016). La dislocación cervical, si bien requiere mayor entrenamiento es un método más rápido y existe mayor consenso en considerarlo aceptable como método de eutanasia (Simmons & Voss, 2009; Leary *et al.*, 2013; Sikes 2016). Los métodos físicos tienen la ventaja de no requerir el transporte, almacenamiento y autorización de sustancias controladas como los barbitúricos.

Colecta para colecciones científicas

El principio general para la preservación de ejemplares es maximizar la información que se guarda de cada animal colectado, utilizando una técnica apropiada de preparación y depositando el ejemplar y las muestras anexas en una colección científica acreditada (Sikes, 2016). Las técnicas de preparación varían según el objetivo e incluyen la preparación de piel, esqueleto, en líquido (alcohol o formalina), o una combinación de varias (Simmons & Voss, 2009). Para murciéla-

gos, la preparación en piel conserva parte del esqueleto (miembros) y los vuelve inaccesibles para estudios morfológicos. De igual forma, la preparación de esqueleto completo implica la destrucción de caracteres externos, especialmente en las alas. La preparación en piel se realiza cortando los húmeros y fémures y dejando los huesos distales completos en la piel. Los ejemplares se montan con las alas plegadas, pero cuidando de exponer todos los dedos para permitir medidas de las falanges y metacarpos (Simmons & Voss, 2009). Para la preparación en líquido se combina una fijación inicial en formalina al 10% con preservación a largo plazo en alcohol etílico al 70% (Simmons & Voss, 2009). La fijación inicial en formalina asegura la preservación de los tejidos y además permite la inactivación del virus de rabia, disminuyendo el riesgo en el manejo posterior de los ejemplares. Debido a que la formalina degrada los ácidos nucleicos, es importante preservar muestras para estudios moleculares previo a la fijación, para lo que las muestras de músculo son ideales.

Referencias

- Alegria-Moran, R., D. Miranda, M. Barnard, A. Parra, & L. Lapierre. 2017. Characterization of the epidemiology of bat-borne rabies in Chile between 2003 and 2013. *Preventive Veterinary Medicine* 143: 30-38.
- Anthony S J, Johnson C K, Greig D J, Kramer S, Che X, Wells H, Hicks A L, Joly D O, Wolfe N D, Daszak P, Karesh W, Lipkin W I, Morse S S, Mazet J A K, Goldstein T. 2017. Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evolution* 3:1-15.
- Barlow K. 1999. *Bats. Expedition field techniques*, Royal Geographical Society with I B G, London.
- Botto Núñez G, Lemus G, Muñoz-Wolf G, Rodales A L, González E M, Crisci C. 2018. The first artificial intelligence algorithm for identification of bat species in Uruguay. *Ecological Informatics* 46:97-102.
- Ellison L E, O'Shea T J, Wimsatt J, Pearce R D, Neubaum D J, Neubaum M A, Bowen R A. 2006. Sampling blood from big brown bats (*Eptesicus fuscus*) in the field with and without anesthesia: impacts on survival. *Journal of wildlife diseases* 42:849-852.
- Frampton M, Droege S, Conrad T, Prager S, Richards M H, Sciences B, Patuxent U, Frampton M, Droege S, Conrad T, Prager S, Richards M H. 2008. Evaluation of Specimen Preservatives for DNA Analyses of Bees. *Journal of Hymenoptera Research* 17:195-200.
- González E M, Martínez-Lanfranco J A. 2010. *Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación*. Banda Oriental, Vida Silvestre & MNHN, Montevideo.
- Hood W R, Voltura M B, Oftedal O T. 2009. Methods of measuring milk composition and yield in small mammals. In Kunz TH, Parsons S (Eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, 2nd ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 529-553.

- Kunz T H, Braun de Torrez E, Bauer D, Lobova T, Fleming T H. 2011. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 1-38.
- Kunz T H, Hodgkison R, Weise C D. 2009. Methods of capturing and handling bats. In Kunz, T. H. & S. Parsons (eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, 2nd ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 3-35.
- Kunz T H, Kurta A. 1988. Capture methods and holding devices. In Kunz, T. H., (Ed.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. Smithsonian Institution Press, Washington DC: 1-30.
- Kunz T H, Weise C D. 2009. Methods and devices for marking bats. In Kunz, T. H. & S. Parsons (Eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, 2nd ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 36-56.
- Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S. 2013. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Page American Veterinary Medical Association.
- Lewis J C M. 2004. Field use of isoflurane and air anesthetic equipment in wildlife. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 35:303-311.
- Malik Y S, Maherchandani S, Goyal S M. 2006. Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate. *American Journal of Infection Control* 34:31-35.
- Mathews F, Honess P, Wolfensohn S. 2002. Use of inhalation anaesthesia for wild mammals in the field. *Veterinary Record* 150:785-787.
- Mitchell-Jones A J, McLeish A P. 2004. *The Bat Workers' Manual*, 3rd ed. Nature Conservancy Council, Interpretative Services Branch, United Kingdom.
- Rodales A L. 2015. Dieta de murciélagos insectívoros en Uruguay: una aproximación al conocimiento sobre su potencialidad como controladores de insectos nocivos. Universidad de la República.
- Rodríguez-Posada ME, Santa-Sepúlveda MA. 2013. Reporte de lesiones en murciélagos causadas por el uso incorrecto de collares plásticos como método de marcaje. *THERYA* 4: 395-400.
- Seltmann A, Corman V M, Rasche A, Drosten C, Czirják G Á, Bernard H, Struebig M J, Voigt C C. 2017. Seasonal fluctuations of Astrovirus, but not Coronavirus shedding in bats inhabiting human-modified tropical forests. *EcoHealth* 14:272-284.
- Sheeler-Gordon L L, Smith J S. 2001. Survey of Bat Populations from Mexico and Paraguay for Rabies. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 582-593.
- Sikes R S. 2016. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy* 97:663-688.
- Simmons N B, Voss R S. 2009. Collection, preparation, and fixation of bat specimens and tissues. In Kunz T H, Parsons S. (Eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, 2nd ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 849-867.

- Stebbing R E. 2004. Ringing and marking. In Mitchell-Jones, A. J. & A. P. McLeish (eds.), *The Bat Workers' Manual*, 3rd ed. Nature Conservancy Council, Interpretative Services Branch, United Kingdom: 59-62.
- Streicker D G, Allgeier J E. 2016. Foraging choices of vampire bats in diverse landscapes: potential implications for land-use change and disease transmission. *Journal of Applied Ecology*: 53:1280-1288.
- Streicker D G, Winternitz J, Satterfield D, Condori Condori R E, Velasco-Villa A, Recuenco S, Altizer S, Valderrama W. 2016. Host-pathogen evolutionary signatures reveal dynamics and future invasions of vampire bat rabies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:10926-10931.
- Whitaker J O, McCracken Q F, Siemers B M. 2009a. Food habits analysis of insectivorous bats. In Kunz T. H. & S. Parsons (Eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, 2nd ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 567-592.
- Whitaker J O, Ritz C M, Dick C W. 2009b. Collecting and preserving bat ectoparasites for ecological study. In Kunz T H, Parsons S. (Eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, 2nd ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 806-827.
- Wibbelt G, Speck S, Field H E. 2009. Methods for assessing diseases in bats. In Kunz T H, Parsons S. (Eds.), *Ecological and behavioral methods for the study of bats*, 2nd ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 775-794.
- Wimsatt J, O'Shea T J, Ellison L E, Pearce R D, Price V R. 2005. Anesthesia and blood sampling of wild big brown bats (*Eptesicus fuscus*) with an assessment of impacts on survival. *Journal of wildlife diseases* 41:87-95.
- Wray A K, Olival K J, Morán D, López MR, Álvarez D, Navarrete-Macias I, Liang E, Simmons N B, Lipkin W I, Daszak P, Anthony S J. 2016. Viral diversity, prey preference, and Bartonella prevalence in *Desmodus rotundus* in Guatemala. *EcoHealth* 13:761-774.



CAPÍTULO 19

Avances de estudios en Uruguay: el dilema del control y erradicación de las especies exóticas invasoras ante los requerimientos de la opinión pública

Gabriel Laufer¹

La necesidad de control de las invasiones biológicas

Nos encontramos atravesando una crisis de la biodiversidad de enorme magnitud, por lo cual se requiere la urgente mitigación de sus causantes (Rocks-tröm *et al.*, 2009). Entre estos, la introducción de especies exóticas es una de las mayores amenazas a la conservación de la biodiversidad a nivel global (Maxwell *et al.*, 2016). La actividad humana, y en especial la globalización, ha promovido el movimiento de muchas especies fuera de sus rangos de distribución históricos, y el problema radica en que algunas de estas especies introducidas son capaces de invadir, generando importantes efectos negativos sobre la biodiversidad, las funciones ecosistémicas, la economía y la salud humana y animal (Davis, 2009; Neill & Arim, 2011; Ricciardi *et al.*, 2017). En 2005, la base de datos de las Listas Rojas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza describió las causas de la extinción de 170 especies nativas, evidenciando que las especies exóticas invasoras (EEI) contribuyeron a la pérdida del 54%, y fueron el factor determinante en el 20% de las extinciones. Los efectos negativos de las EEI fueron mayormente asociadas a alteraciones de hábitat, depredación, competencia, introducción de enfermedades e hibridación. Aunque la extinción es a menudo el resultado extremo de las invasiones, hay otros impactos ecológicos y evolutivos, como la homogeneización biótica, que son menos comprendidos y podrían ser aun mucho más riesgosos a largo plazo (Clavero & García-Berthou, 2005). En base a la amplia evidencia empírica, existe un consenso entre investigadores y gestores acerca de los efectos negativos de varias de las EEI sobre los diferentes niveles de organización ecológica y de la necesidad de su control (Simberloff *et al.*, 2005; Simberloff, 2009; Walsh *et al.*, 2016). Además, lejos de ser un problema

1 Área Biodiversidad y Conservación, Museo Nacional de Historia Natural. Uruguay - gabriel.laufer@gmail.com

acotado, las invasiones biológicas se mantienen en incremento y se prevé que seguirán creciendo en el futuro (Seebens *et al.*, 2017).

Este fenómeno no es ajeno a Uruguay, donde se han reportado numerosas EEI (Fig. 1), con varios efectos no deseados, y por tanto se ha establecido que su control debería ser una prioridad nacional (Laufer *et al.*, 2008; 2017; Aber & Ferrari, 2010; Masciadri *et al.*, 2010; Aber *et al.*, 2012; Clavijo *et al.*, 2013; Pereira-Garbero *et al.*, 2013). De hecho, Uruguay es signatario de convenios internacionales, como el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) y las más recientes Metas Aichi, que plantean claramente que para la preservación de la biodiversidad global será necesario dar prioridad a los esfuerzos de gestión, control y erradicación de las especies invasoras (Genovesi, 2005; Caffrey *et al.*, 2014). Además, la Estrategia Nacional para la Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica del Uruguay 2016-2020 plantea como meta el disminuir el número de invasiones en las diferentes regiones, lo cual se logrará con la prevención de nuevos ingresos y la erradicación de las EEI existentes (MVOTMA, 2016). Por tanto, si bien Uruguay no cuenta aún con muchos planes de control y erradicación, resulta inminente su implementación.

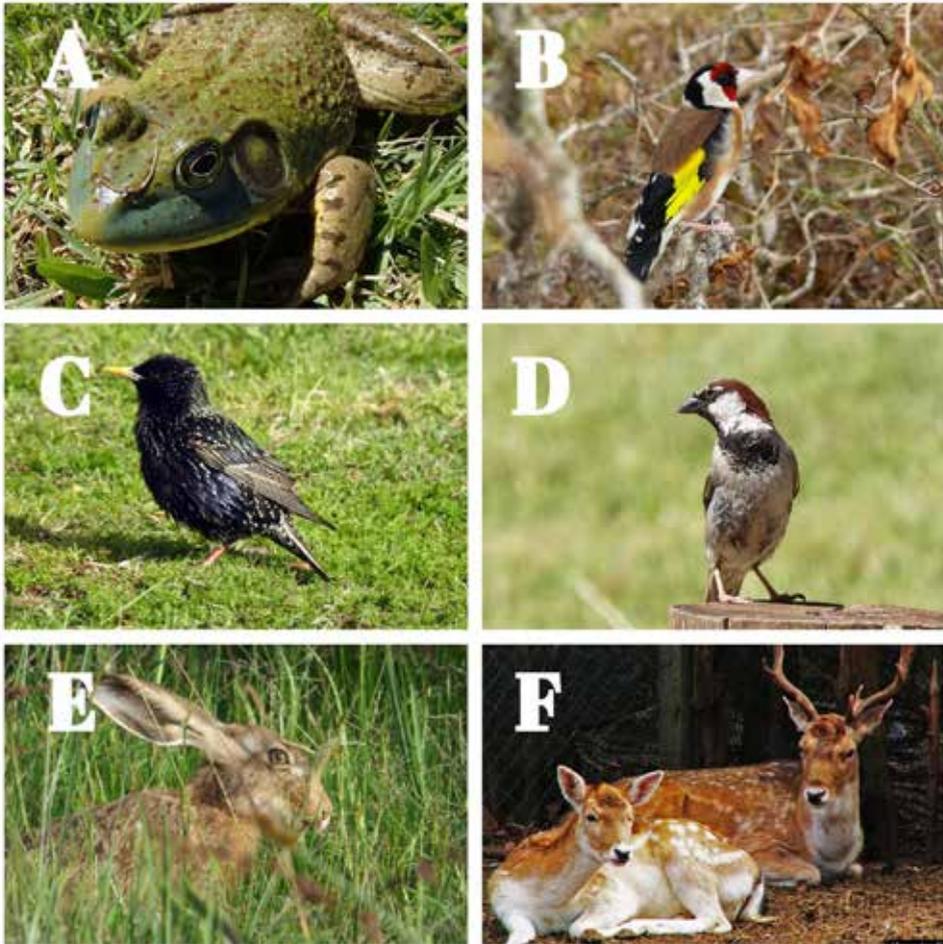


Figura 1. Algunos vertebrados exóticos que invaden en Uruguay: la rana toro *Lithobates catesbeianus* (A, foto de Noelia Gobel), el cardelino *Carduelis carduelis* (B, foto de Alejandro Sosa), el estornino pinto *Sturnus vulgaris* (C, foto de Álvaro Castro), el gorrion *Passer domesticus* (D, foto de Alejandro Sosa), la liebre europea *Lepus europaeus* (E, foto de Alejandro Fallabrino) y el ciervo axis *Axis axis* (F, foto de Alejandro Sosa).

Sin duda la erradicación o la disminución de los tamaños poblacionales de las EEI son las medidas más eficientes y duraderas a aplicar para conseguir las metas propuestas a nivel internacional (Vitousek *et al.*, 1996; Clout & Russell, 2008). Sin embargo, dicho control implica un manejo que generalmente recurre a la manipulación e incluso el sacrificio de grandes cantidades de ejemplares de las EEI (Tabla 1). Lo que es más, este control puede llegar a tener efectos no deseados sobre especies de la fauna nativa en los sitios invadidos (Rejmánek & Pitcairn, 2002). Por esto, el manejo de la fauna exótica invasora es cada vez más el centro de atención pública, debido al dilema existente en “matar para conservar”. Es así

que la ética del control letal y/o los impactos del manejo en el bienestar animal, se plantean como un importante tema emergente asociado a la biología de la conservación y a los programas de gestión (Warburton & Norton, 2009; Cowan & Warburton, 2011).

Tabla 1. Métodos de control de especies exóticas invasoras más comúnmente utilizados, separados entre letales y no letales

Métodos letales
- eliminación con armas de fuego (tiro)
- caza con arcos
- caza con perros
- uso de explosivos
- electrocución
- trampas y redes
- cebos envenenados, inyecciones y gases
- control por introducción de enfermedades
- control por introducción de depredadores
- pesca
Métodos no letales
- trampas de captura en vivo
- repelentes y medidas disuasorias
- barreras físicas, como vallas de exclusión
- control de la fertilidad

Paradójicamente los programas de conservación y las corrientes animalistas han generado en la opinión pública una identificación con ciertas especies atractivas, en general aves o mamíferos de gran tamaño corporal (especies carismáticas; Feldhamer *et al.*, 2002; Clucas *et al.*, 2008). Posiblemente esto haya contribuido a generar la fuerte oposición al manejo y las matanzas de las EEI (Crowley *et al.*, 2017; Lute & Attari, 2017). Esto no resulta difícil de imaginar en ciertos casos en los que las especies a controlar y sacrificar, pueden ser tan carismáticas como los caballos salvajes, que tienen un impacto muy negativo sobre determinados ecosistemas en Australia (Nimmo & Miller, 2007; Nimmo *et al.*, 2007), o ardillas en sistemas urbanos de Europa (Genovesi & Bertolino, 2001). Este último caso es un buen ejemplo en el que los planes de control y erradicación fueron detenidos por la presión de la opinión pública. La ardilla gris americana, introducida en Italia y las Islas Británicas está desplazando a la ardilla roja nativa a través de la exclusión competitiva. En este caso, un proyecto de erradicación en Italia, apoyado por una importante fuerza de ONGs locales, fracasó debido a la fuerte oposición

de grupos de derechos de los animales (Genovesi & Bertolino, 2001; Bertolino & Genovesi, 2003; Genovesi, 2005).

La opinión pública puede ver negativamente las diferentes estrategias de manejo (Nimmo & Miller, 2007; Miller, 2009), desde las prácticas no letales como las esterilizaciones (Bruce Lauber *et al.*, 2007), hasta las prácticas letales, que resultan las más polémicas (Warburton & Norton, 2009). Por esto, un número creciente de investigadores está reconociendo que la cuestión de la gestión de las especies invasoras es mayormente un problema social, que abarca factores políticos y humanos, en mayor grado que factores científicos (Reaser, 2001; Crowley *et al.*, 2017; Lute & Attari, 2017). De hecho, la presencia de pobladores locales aparece como una de las mayores limitantes a alcanzar el éxito en las experiencias de erradicación de EEI en islas (Oppel *et al.*, 2011).

Evaluación del dilema en Uruguay

Considerando que resulta inminente la toma de medidas de control o erradicación de especies exóticas en Uruguay, se torna necesario el entender cómo respondería la opinión pública (Aber *et al.*, 2012; MVOTMA, 2016). Con esta finalidad se realizó una encuesta on-line, utilizando la herramienta Formularios de Google (<https://www.google.com/forms>). Esta encuesta fue difundida por listados de correos de diferentes ONGs y centros de formación, investigación y gestión, así como por diferentes páginas y grupos de redes sociales referentes a medio ambiente, conservación, invasiones biológicas e interesados en la naturaleza. En dicha encuesta se realizó una serie de preguntas de valoración de las invasiones y el nivel de aceptación del uso de medidas de control y erradicación de EEI en Uruguay. Se planteó una serie de ejemplos de especies (ratas, *Rattus rattus* y *R. norvegicus*; jabalí, *Sus scrofa*; caracol rapana, *Rapana venosa*; carpa, *Cyprinus carpio*; rana toro, *Lithobates catesbeianus*; liebre europea, *Lepus europaeus*; estornino, *Sturnus vulgaris*; y ciervo axis, *Axis axis*) para consultar la aceptación del uso de medidas de control que implican sufrimiento animal (pudiendo optar el encuestado por la no intervención o no matanza, por medidas de control que eviten las matanzas, por matanzas de caza, pesca, o explotaciones comerciales, y finalmente por matanzas masivas de control o erradicación). La encuesta fue anónima, de libre acceso y difusión, y estuvo abierta desde el 13 de julio al 8 de agosto de 2017, alcanzando un total de 663 encuestados que plantearon tener alguna relación o afinidad con las temáticas ambientales. Según sus datos, los encuestados fueron categorizados como miembros de organizaciones de gestión (N = 73), miembros de ONGs ambientalistas (N = 76), investigadores en temáticas ambientales (N = 98), profesionales especializados en temáticas ambientales (N = 131) y amantes de la naturaleza y los animales (N = 285). En los casos en que los encuestados pertenecían a más de un grupo, se categorizaron priorizando el orden recién mencionado.

Resulta interesante que la mayor parte de los encuestados consideró que en Uruguay las invasiones biológicas son una importante amenaza a la conservación de la biodiversidad (81,7 %) y que por tanto deberían controlarse (87,1 %). Sin embargo, resultó mucho menor el número de encuestados que manifestó estar de acuerdo con la utilización de métodos de control que impliquen la remoción y matanza de animales exóticos invasores (46,1 %). Tal vez es más interesante considerar los resultados de la valoración que realizaron los diferentes grupos sociales sobre las acciones en cada una de las diferentes especies consideradas. Un bajo número de encuestados se opuso a la intervención o matanza de las especies menos carismáticas y/o especies plaga (rata, jabalí, caracol rapana), pero esto cambió en las especies más carismáticas. Si bien todos los grupos sociales considerados aumentaron en proporción la oposición a toda intervención, el grupo de los amantes de la naturaleza y los animales aumentó más rápidamente y alcanzó valores mayores, en relación a las especies carismáticas. Este grupo alcanzó altos valores de dicha opinión para el estornino (27%) y el ciervo axis (59%). El grupo social que se mantuvo en los menores valores fue el de los miembros de organismos oficiales de gestión (Figura 2). Por otra parte, cuando consideramos las respuestas de no intervenir y no matar, junto con las de buscar medidas de control que eviten las matanzas, observamos las mayores diferencias entre los amantes de la naturaleza y los animales, y el resto de los grupos considerados (Figura 2). Tanto es así que este último grupo coincidió con el resto únicamente en su opinión sobre el control de las ratas (no oponiéndose a las matanzas), e incrementó su oposición a las matanzas de cualquier tipo (caza, explotación comercial y control o erradicación) en todas las otras especies, aumentando en relación a su carisma. En este caso nuevamente se elevó también la oposición a las medidas de control que incluyan matanzas de todos los grupos, para el estornino y en menor medida para el ciervo axis (Fig. 2).

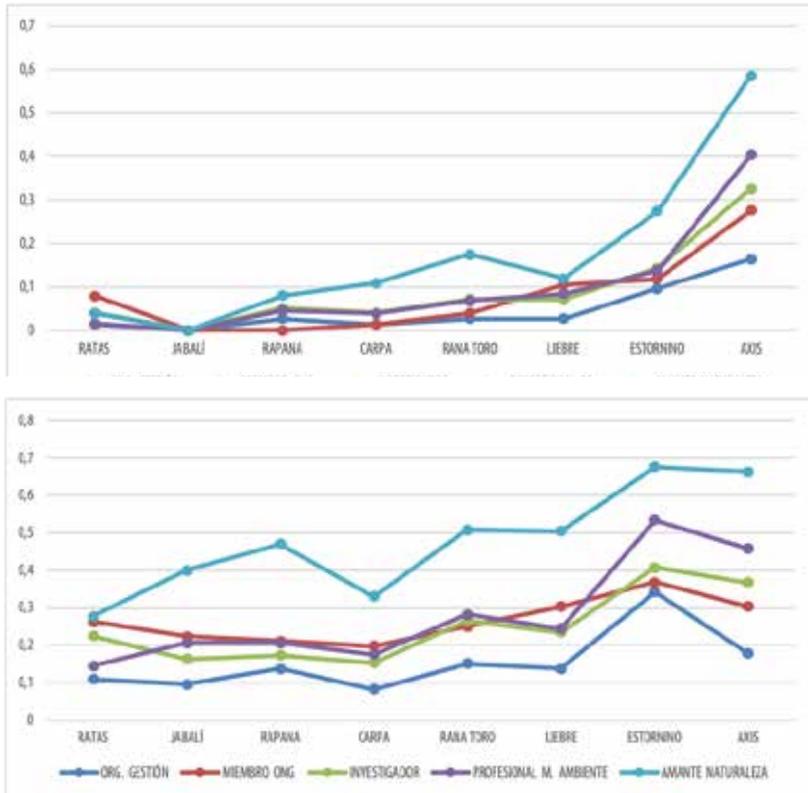


Figura 2. Evaluación de opiniones de personas de diferentes grupos sociales asociados a temas ambientales (miembros de organismos de gestión: miembros de ONG ambientalistas, investigadores en temas ambientales, profesionales en temas ambientales, amantes de la naturaleza o los animales) sobre las medidas éticas de manejo a un conjunto modelo de especies exóticas invasoras en Uruguay (ratas, jabalí, caracol rapana, rana toro, liebre europea, estornino pinto y ciervo axis). Arriba se presentan los que respondieron a la encuesta excluyendo todo tipo de manejo e intervención, y debajo se presenta el total de los que no aceptan ninguna intervención y/o aceptan solo medidas de manejo que eviten las matanzas.

El resultado de esta encuesta es la primera información acerca de los posibles conflictos éticos sobre el control de las EEl en Uruguay. Si bien esta consulta no fue realizada a la opinión pública en general, restringiéndose únicamente a las personas que expresaban algún tipo de relación –o al menos afinidad– con las temáticas ambientales, sus resultados brindan una información interesante acerca de los grupos que lideran este tipo de debates a nivel internacional (Crowley *et al.*, 2017; Lute & Attari, 2017). Podemos observar dos resultados mayormente relevantes de la encuesta, por un lado, la diferencia existente entre las posiciones de los amantes de la naturaleza y los animales con respecto a los grupos sociales considerados, y por el otro, una tendencia común a todos los grupos de elegir medidas que eviten las matanzas en las especies más carismáticas (Perry & Perry, 2008). Dicha preocupación común de los diferentes grupos involucrados ya ha sido documen-

tada en otras regiones, evidenciando una preocupación social general de evitar el sufrimiento animal (Bremner & Park, 2007; García-Llorente *et al.*, 2008). De todas formas, la distancia observada en la aceptación de los métodos de control, entre los colectivos más asociados a la gestión, la conservación y la investigación, y el grupo de los amantes de la naturaleza y los animales, puede ser interpretada en asociación a la distancia entre quienes cuentan con el conocimiento del problema que implican las EEI y quienes tienen una versión más romántica y distante del estudio de la biodiversidad local (Bremner & Park, 2007). De hecho, se han reportado este tipo de diferencias entre ciudadanos rurales y urbanos, por su diferente proximidad a los sistemas naturales (Naughton-Treves *et al.*, 2003).

Algunas ideas que pueden ayudar a mitigar los conflictos

Considerando que la implementación de planes de gestión de EEI es una necesidad en la región (Anderson & Valenzuela, 2014), debemos comprender que la aprobación del manejo por parte de la opinión pública es una de las claves para el éxito (Mack *et al.*, 2000). Entendiendo que la preocupación ética es común a todos los grupos sociales considerados, debemos analizar y plantear una visión acerca de cómo acortar distancias de opinión y lograr los objetivos nacionales e internacionales de conservación de la biodiversidad. Para eso, se plantea a continuación una serie de ideas que pueden apoyar a la generación de consensos sociales, acercando a las diferentes partes para evitar el conflicto frente a los diferentes planes de gestión de las EEI Uruguay.

Categorizar, evaluar e identificar en el terreno las especies exóticas prioritarias

Se debe evaluar y focalizar claramente en las especies prioritarias a controlar, siguiendo los protocolos existentes de análisis de riesgo (Lodge *et al.*, 1998; 2006). Además, se debe contar con información disponible a todo público, con datos de distribución geográfica y métodos de identificación y reporte de dichas EEI. Sería conveniente involucrar a las diferentes fuerzas sociales en el seguimiento de las invasiones, especialmente a los amantes de la naturaleza y los animales, además de investigadores y gestores (Hattingh, 2001). Existe una gran oportunidad para esto en las nuevas tecnologías, las redes sociales y los programas de participación ciudadana en la investigación y la conservación.

Educar sobre la biodiversidad local y las amenazas a su conservación

Para poder valorar se debe conocer la biodiversidad nativa, por lo que resulta urgente la educación efectiva de la población, especialmente de aquella que se encuentra en los sitios donde se deben controlar las invasiones (Speziale *et al.*, 2012). La presentación del problema de una especie exótica invasora a un

público que ignora el valor de la biodiversidad nativa, puede ser uno de los generadores de conflictos. Una vez conocida y valorada la biodiversidad local, se debe generar la consciencia sobre los riesgos asociados a las especies invasoras y sus efectos en la calidad de vida, la economía y la conservación de la biodiversidad local. De esta forma se podrían acortar las distancias en el conocimiento, logrando una comprensión más cabal de la situación.

Concientizar en la idea de que la de pérdida de biodiversidad es también un gran sufrimiento animal y humano

Existe hoy en la opinión pública, en los animalistas y en otros colectivos sociales, un reclamo tendiente a disminuir el sufrimiento animal –asociado a las actividades que son más visibles (como maltratos, caza, matanzas)– pero, en general, se ignora otro tipo de sufrimiento menos visible. Por ejemplo, enfrentarse a un depredador o un gran competidor no conocido puede generar un gran sufrimiento a un animal, tal como enfrentarse a una alteración intolerable del ambiente, a la falta de recursos, a una enfermedad o a la disminución de su población. Esto es lo que están generando algunas de las invasiones sobre la fauna nativa y no hacer nada es estar permitiendo que se establezca el sufrimiento sobre toda la comunidad, solo porque no lo queremos ver. Todos esos efectos generados por las EEI deben ser comunicados y valorados como parte del debate, dimensionando el sufrimiento de toda la comunidad nativa, como entidad única y característica de la región (Estévez *et al.*, 2015).

Involucrar a la sociedad en los problemas de las EEI y en su solución

Los temas ambientales no pertenecen a los científicos ni a los gestores, son un asunto social prioritario sobre el que todos deberían informarse y opinar. Entendiendo que ya que no contamos con sistema prístino en Uruguay, y que el mantenimiento de nuestra biodiversidad dependerá cada vez más de la gestión, debemos poner en discusión la implementación de medidas de control de las EEI. Sin embargo, este tipo de decisiones deben involucrar a los diferentes grupos sociales y especialmente a los pobladores locales de las áreas invadidas. El involucrar a los diferentes colectivos sociales en las etapas de decisión y ejecución de los planes de manejo de EEI, evitará la existencia de grupos ejecutores y otros pasivos evaluadores de la gestión (Estévez *et al.*, 2015; Crowley *et al.*, 2017). El éxito de esta gestión estará sujeto a que las decisiones difíciles de control y erradicación, se tomen e implementen por los diferentes grupos sociales. Considerando que en todos los grupos existe una sensibilidad a las matanzas, se deben analizar en base al conocimiento existente, los costos de no intervenir y las diferentes medidas a tomar.

Revisar el marco legal

Se debe adecuar la legislación y sin duda no pueden utilizarse los mismos criterios de bienestar animal de experimentación o producción al manejo de EEL. Existe una serie de incompatibilidades difíciles de resolver y el modelo de implementación de protocolos de ética de experimentación animal no parece aplicable al control de exóticas (Treves & Naughton-Treves, 2005; Buckley, 2008). La necesidad de eliminar cantidades importantes de animales, por períodos prolongados y de maximizar el efecto, complica la implementación de protocolos de bienestar animal. Además, se trata un trabajo de campo de gran escala, realizado muchas veces con voluntarios o funcionarios no especializados. En la literatura se identifica una serie de riesgos asociados a las diferentes medidas de control (Tabla 2), que deben ser considerados para generar protocolos que eviten o disminuyan el sufrimiento. Dichos protocolos deberían proveer de un mecanismo ágil de autorización y evaluación de medidas de manejo frente a la detección de nuevos focos de invasiones peligrosas (Sharp *et al.*, 2011).

Tabla 2. Factores que afectan el bienestar animal en una serie de métodos de control de las especies exóticas invasoras

Método	Factores que afectan el bienestar animal
Trampas	lesiones por trampas de restricción y otros efectos de la captura (fisiológicas, el estrés, la angustia, la hipotermia/hipertermia, la inanición)
	permanencia por períodos prolongados en trampas
	huida de animales lesionados
Envenenamientos	productos de largo período de acción
	efectos no deseados
	riesgo de intoxicación subletal
Caza con rifle	estrés de disparo/malestar durante la caza
	huida de animales lesionados
Caza con perros	estrés de la persecución
	huida de animales lesionados
	herida y muerte de perros

En conclusión, cualquier plan de manejo de EEL debería considerar la dimensión social para lograr un éxito sostenido en el tiempo (Larson *et al.*, 2011). Pero

esto no será suficiente si no se trabaja en un nuevo concepto de valoración en la opinión pública de la conservación de la diversidad de los ecosistemas y las especies nativas, que justifiquen la aplicación de medidas de control. Para ello, se hace necesario educar, mostrando cuáles especies invasoras son las realmente peligrosas y qué efectos podría causar el no removerlas. Esto debe hacerse con un especial esfuerzo en transmitir claramente el conocimiento científico a los diferentes actores involucrados (Shine & Doody, 2011).

En los casos en que el riesgo de no ejercer un control sea muy alto, se debe contar con un respaldo administrativo para generar acciones. Para esto resulta necesario generar sensibilización social, revisar y adecuar el marco legal, y establecer procesos de consulta y participación en la toma de decisiones (García-Llorente *et al.*, 2008). En este contexto es fundamental el fomentar la creación de políticas estatales sobre el control de EEI, que mantengan las buenas prácticas de bienestar animal, evitando o minimizando, en la medida de lo posible, el sufrimiento y maximizando los beneficios para la biodiversidad nativa y los pobladores locales.

Finalmente, dado el efecto y los posibles conflictos asociados a las EEI, debemos reforzar los mecanismos de prevención (Genovesi, 2005). Por tanto, el análisis de riesgo previo a la autorización de una nueva introducción debe considerar los aspectos de posibles complicaciones éticas o de oposición de la opinión pública a las medidas de control (especialmente en animales carismáticos). La evidencia muestra que, si bien hay mucho para aprender aún, cada vez se contará con más herramientas y el resultado de las erradicaciones resulta muy alentador (Ricciardi *et al.*, 2017; Prior *et al.*, 2017). La remoción de especies exóticas, junto con la restauración son una gran herramienta que debe ser considerada en los programas de conservación nacionales y regionales (Zavaleta, 2002; Genovesi, 2005). Sin duda involucrar a los diferentes actores sociales, y que estos puedan visualizar sus beneficios es uno de los mayores desafíos del control de especies invasoras a futuro.

Referencias

- Aber A, Ferrari G. 2010. Lineamientos para la gestión nacional de especies exóticas invasoras. UNESCO, Montevideo.
- Aber A, Ferrari G, Porcile J F, *et al.*, 2012. Identificación de prioridades para la gestión nacional de las especies exóticas invasoras. UNESCO, Montevideo.
- Anderson C D, Valenzuela A E. 2014. Do what I say, not what I do: Are we linking research and decision-making about invasive species in Patagonia? *Ecologia Austral* 24:193-202.
- Bertolino S, Genovesi P. 2003. Spread and attempted eradication of the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) in Italy, and consequences for the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in Eurasia. *Biol Conserv* 109: 351-358.

- Bremner A, Park K. 2007. Public attitudes to the management of invasive non-native species in Scotland. *Biol Conserv* 139: 306-314.
- Bruce Lauber T, Knuth B A, Tantillo J A, Curtis P D. 2007. The role of ethical judgments related to wildlife fertility control. *Society & Natural Resources* 20: 119-133.
- Buckley Y M. 2008. The role of research for integrated management of invasive species, invaded landscapes and communities. *Journal of Applied Ecology* 45: 397-402.
- Caffrey J M, Baars J R, Barbour J H, *et al.* 2014. Tackling invasive alien species in Europe: the top 20 issues. *Manag Biol Invasions* 5: 1-20.
- Clavero M, García-Berthou, E. 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 110-110.
- Clavijo C, Martínez-Lanfranco J A, Soutullo A. 2013. Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DI-NAMA/MVOTMA y DICYT/MEC, Montevideo.
- Clout M N, Russell, J C. 2008. The invasion ecology of mammals: a global perspective. *Wildlife Research* 35: 180-184.
- Clucas B, McHugh K, Caro T. 2008. Flagship species on covers of US conservation and nature magazines. *Biodiversity Conservation* 17: 1517.
- Cowan P, Warburton B. 2011. Animal welfare and ethical issues in island pest eradication. In: *Island invasives: eradication and management. Proceedings of the international conference on Island invasives.* IUCN, Gland, Switzerland and Auckland, New Zealand. pp 418-421
- Crowley SL, Hinchliffe S, McDonald, R A. 2017. Conflict in invasive species management.
- Davis, M A, 2009. *Invasion Biology.* Oxford University Press, USA.
- Estévez R A, Anderson C B, Pizarro J C, Burgman M A. 2015. Clarifying values, risk perceptions, and attitudes to resolve or avoid social conflicts in invasive species management. *Conservation Biology* 29: 19-30.
- Feldhamer G, Whittaker J, Monty A M, Weickert C. 2002. Charismatic mammalian megafauna: Public empathy and marketing strategy. *Japanese Popular Culture* 36: 160-167.
- García-Llorente M, Martín-López B, González J A, *et al.*, 2008. Social perceptions of the impacts and benefits of invasive alien species: implications for management. *Biological Conservation* 141: 2969-2983.
- Genovesi P. 2005. Eradications of invasive alien species in Europe: a review. In: *Issues in Bioinvasion Science.* Springer, pp 127-133.
- Genovesi P, Bertolino S. 2001. Human dimension aspects in invasive alien species issues: the case of the failure of the grey squirrel eradication project in Italy. *Gt Reshuffling Hum Dimens Invasive Alien Species* 113-119.
- Hattingh, J., 2001. Human dimensions of invasive alien species in philosophical perspective: towards an ethic of conceptual responsibility. *Gt Reshuffling Hum Dimens Invasive Species* 183-194.

- Larson D L, Phillips-Mao L, Quiram G, *et al.*, 2011. A framework for sustainable invasive species management: environmental, social, and economic objectives. *Journal of Environmental Management* 92: 14-22.
- Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R. 2008. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biological Invasions* 10: 1183-1189.
- Laufer G, Gobel N, Borteiro C, *et al.*, 2017. Current status of American bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, invasion in Uruguay and exploration of chytrid infection. *Biological Invasions* 20: 285-291.
- Lodge D M, Stein R A, Brown, K M *et al.* 1998. Predicting impact of freshwater exotic species on native biodiversity: challenges in spatial scaling. *Australian Journal of Ecology* 23: 53-7.
- Lodge D M, Williams S, Maclsaac H J, *et al.* 2006. Biological invasions: recommendations for US policy and management. *Ecological Applications* 16: 2035-2054.
- Lute M L, Attari S Z. 2017. Public preferences for species conservation: choosing between lethal control, habitat protection and no action. *Environmental Conservation* 44: 139-147.
- Mack R N, Simberloff D, Mark Lonsdale W, *et al.*, 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10: 689-710.
- Masciadri S, Brugnoli E, Muniz P. 2010. InBUy database of invasive and alien species in Uruguay: a useful tool to confront this threat to biodiversity. *Biota Neotropica* 10: 205-213.
- Maxwell S L, Fuller R A, Brooks T M, Watson J E. 2016. Biodiversity: The ravages of guns, nets and bulldozers. *Nature* 536: 143-145.
- Miller K K. 2009. Human dimensions of wildlife population management in Australasia—history, approaches and directions. *Wildlife Research* 36: 48-56.
- MVOTMA, 2016. Estrategia nacional para la conservación y uso sostenible de la diversidad biológica del Uruguay 2016-2020. Montevideo.
- Naughton-Treves L, Grossberg R, Treves A. 2003. Paying for tolerance: rural citizens' attitudes toward wolf depredation and compensation. *Conservation Biology* 17: 1500-1511.
- Neill P, Arim M. 2011. Human Health Link to Invasive Species. 116-123. *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier. Amsterdam.
- Nimmo D G, Miller K K. 2007. Ecological and human dimensions of management of feral horses in Australia: a review. *Wildlife Research* 34: 408-417.
- Nimmo D G, Miller K K, Adams R. 2007. Managing feral horses in Victoria: A study of community attitudes and perceptions. *Ecological Management & Restoration* 8: 237-243.
- Oppel S, Beaven B M, Bolton M, *et al.*, 2011. Eradication of invasive mammals on islands inhabited by humans and domestic animals. *Conservation Biology* 25: 232-240.
- Pereira-Garbero R, Barreneche J M, Laufer G, *et al.*, 2013. Mamíferos invasores en Uruguay, historia, perspectivas y consecuencias. *Revista Chilena de Historia Natural* 86: 403-421.

- Perry D, Perry G. 2008. Improving interactions between animal rights groups and conservation biologists. *Conservation Biology* 22: 27-35.
- Prior K M, Adams D C, Klepzig K D, Hulcr J. 2017. When does invasive species removal lead to ecological recovery? Implications for management success. *Biological Invasions* 20(2): 267-283.
- Reaser J K. 2001. Invasive alien species prevention and control: the art and science of managing people. *Gt Reshuffling Hum Dimens Invasive Alien Species* 89-104.
- Rejmánek M, Pitcairn M J. 2002. When is eradication of exotic pest plants a realistic goal. *Turn Tide Erad Invasive Species* 249-253.
- Ricciardi A, Blackburn T M, Carlton J T, *et al.*, 2017. Invasion science: a horizon scan of emerging challenges and opportunities. *Trends in Ecology & Evolution* 32: 464-474.
- Rockström J, Steffen W, Noone K, *et al.*, 2009. A safe operating space for humanity. *Nature* 461:4 72-475.
- Seebens H, Blackburn T M, Dyer E E, *et al.*, 2017. No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nature Communications* 8: 14435.
- Sharp R L, Larson L R, Green G T. 2011. Factors influencing public preferences for invasive alien species management. *Biological Conservation* 144: 2097-2104.
- Shine R, Doody J S. 2011. Invasive species control: understanding conflicts between researchers and the general community. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9: 400-406.
- Simberloff D. 2009. We can eliminate invasions or live with them. Successful management projects. *Biological Invasions* 11: 149-157.
- Simberloff D, Parker I M, Windle P N. 2005. Introduced species policy, management, and future research needs. *Frontiers in Ecology and the Environment* 3: 12-20.
- Speziale K L, Lambertucci S A, Carrete M, Tella J L. 2012. Dealing with non-native species: what makes the difference in South America? *Biological Invasions* 14: 1609-1621.
- Treves A, Naughton-Treves L. 2005. Evaluating lethal control in the management of human-wildlife conflict. *Conservation Biology* 9: 86.
- Vitousek P M, D'Antonio C M, Loope L L, Westbrooks, R. 1996. Biological invasions as global environmental change. *Am Sci* 84: 468-478.
- Walsh J R, Carpenter S R, Vander Zanden M J. 2016. Invasive species triggers a massive loss of ecosystem services through a trophic cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 4081-4085.
- Warburton B, Norton B G. 2009. Towards a knowledge-based ethic for lethal control of nuisance wildlife. *The journal of wildlife management* 73: 158-164.
- Zavaleta E S. 2002. It's often better to eradicate, but can we eradicate better. *Turn Tide Erad Invasive Species* 393-404.

CAPÍTULO 20

Desarrollo estadístico como herramienta experimental

Matías Arim¹ - Mariana Meerhoff²

Introducción

En este capítulo nos centraremos en la importancia del diseño de muestreo o del experimento, en cualquier actividad científica, pero muy en particular en aquella investigación que involucra animales. Lo que hacemos los biólogos (en sentido amplio) es importante desde muchos puntos de vista, inclusive para contribuir al bienestar presente y futuro de la sociedad. Cómo hacemos lo que hacemos es, por lo tanto, sumamente importante (Underwood, 1997). Este capítulo toma elementos tratados en varios libros fundamentales para investigadores que hacen trabajo de campo y trabajo experimental, así como se nutre de la experiencia acumulada a lo largo de muchos proyectos de investigación junto con otros colegas.

Todos los procedimientos estadísticos deben estar supeditados a los conceptos biológicos que se quiere investigar. La lógica, la estadística y el diseño del estudio son fundamentales para atravesar la complejidad biológica y generar conocimiento para comprender los sistemas naturales y para lidiar adecuadamente con ellos. Lograr un diseño bien pensado es clave para la aplicación de estadística con sentido, la realización de pruebas de hipótesis y la obtención de resultados útiles, realizando el esfuerzo humano y material adecuado (Jongman *et al.*, 1995) y con el menor daño animal posible. Por el contrario, un mal diseño genera resultados que tienen baja o nula relevancia para la comunidad científica y la sociedad en general, o que incluso pueden ser usados como base para una toma de decisiones no apropiada, por ejemplo, en programas de conservación de la biodiversidad, o en la definición de estrategias o prioridades para el monitoreo, etc. Un mal diseño, además, frecuentemente conlleva un mayor costo eco-

1 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, UdelaR. Uruguay. matiasarim@gmail.com

2 Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, CURE, Maldonado, UdelaR. Uruguay. mm@bios.au.dk

nómico y de esfuerzo humano y, sin duda, a un mayor impacto ambiental de la investigación, en particular, un sacrificio o daño innecesario a los animales objeto o parte del estudio. Habiendo métodos para minimizar esos costos e impactos, hacerlo es un imperativo ético.

Todo proyecto de investigación debe basarse en un planteo explícito del problema y de los objetivos. Sin esa etapa, en medio del cúmulo de detalles de la planificación del estudio, es fácil tomar decisiones que en realidad atentan contra los objetivos originales (Cochran, 1963). El establecimiento de los objetivos guía las decisiones que se deben tomar sobre los tratamientos posibles, las variables explicatorias y las variables respuesta, de forma de evitar metas caras, irrelevantes o incluso imposibles de obtener. En el caso de incluir varias disciplinas o varios investigadores, es fundamental, además, que todas las partes estén de acuerdo con esos objetivos y con los criterios que determinarán si el objetivo se ha cumplido o no, o con los cambios que surjan sobre la marcha de la investigación (Box, 1976).

Es importante tener en mente que el propósito del proyecto de investigación restringe la forma en la que los datos serán colectados e interpretados. Un grupo de datos útiles para un objetivo, puede ser totalmente inapropiado para otro objetivo. La especulación teórica y la colecta de datos deben ser actividades conectadas, lo que sucede a través de procesos iterativos de ajuste (Box, 1976). En esa conexión entre teoría y práctica la metodología estadística juega un papel clave, mediante métodos y técnicas que permiten que ese proceso iterativo ocurra de manera fluida. Para aplicar esos métodos y técnicas de forma adecuada es fundamental contar con lineamientos, que se desarrollan en las siguientes secciones.

Marco conceptual y prueba de hipótesis

Si bien existen diversos marcos conceptuales en la ciencia, y en la biología en particular, es clara la necesidad de contar con un procedimiento lógico que permita identificar las explicaciones más probables para los fenómenos biológicos (Underwood, 1997). Cualquier proyecto de investigación es uno de los pasos en una secuencia de pasos lógicos. Es interesante considerar que las observaciones que luego son descritas como patrones o fenómenos biológicos dependen, en gran medida, de factores subjetivos, incluyendo características personales de los investigadores y su contexto histórico y cultural. Por ello, una característica clave de la investigación científica, y que la diferencia de otras áreas del conocimiento, es que sigue un método con marcos conceptuales claros, de forma de ser evaluable por terceros en el momento actual y en el futuro.

Establecer hipótesis, articular sus predicciones, diseñar y ejecutar experimentos o muestreos válidos, y colectar, organizar y resumir los datos, son pa-

sos previos al uso de los tests estadísticos (Gotelli & Ellison, 2004). Las hipótesis son explicaciones posibles (las causas) de fenómenos observados en el mundo real (los efectos). Una *hipótesis científica* es una explicación lógica que describe el mecanismo por el cual ocurre ese fenómeno, que surge de un modelo o teoría científica, de las observaciones mismas, de la literatura científica, o incluso la intuición del investigador (Gotelli & Ellison, 2004). La hipótesis científica debe ser pasible de ser puesta a prueba, y la colecta de datos apropiados debería permitir modificar, rechazar o sostener esa hipótesis (Underwood, 1997). Si esa hipótesis es cierta, entonces esperamos observar determinada respuesta (e. g. determinado valor de una variable, determinada relación entre variables, determinada diferencia entre grupos de datos) a partir de los datos obtenidos en el muestreo o experimento. Esto último constituye la *predicción* generada por la hipótesis de trabajo, la que idealmente no debería ser generada por otras explicaciones o hipótesis alternativas. Es importante tener clara la diferencia con la *hipótesis estadística*, en particular la *hipótesis estadística nula*, que es una herramienta estadística usada para evaluar dichas predicciones. En general es la hipótesis basada en el patrón esperado en ausencia de efectos o, dicho de otra forma, es la hipótesis de "ausencia de patrón" (e. g. ausencia de relación entre variables o ausencia de diferencias entre grupos de datos, más allá de las esperables por la variación al azar entre los grupos).

Dos de las aproximaciones más importantes que guían la puesta a prueba de hipótesis científicas son la deducción y la inducción, ambas usadas ampliamente en el razonamiento científico. La deducción parte del caso general y concluye sobre el caso específico, mientras que la inducción generaliza a partir de casos específicos. La primera, por lo tanto, realiza inferencias con certeza, mientras que la segunda hace inferencias probables. El método inductivo parte de una observación y enfatiza el vínculo entre los datos y la teoría, construyendo y modificando en forma explícita la hipótesis generada. En ese sentido, es un método que pretende confirmar la hipótesis de trabajo. Actualmente, el método se ha modernizado (mediante la inferencia Bayesiana) de forma de usar el conocimiento científico previo para la generación de hipótesis nulas realistas o informadas (se sugiere leer Gotelli & Ellison, 2004, en caso de querer profundizar sobre esta aproximación y tener un pantallazo de discusiones epistemológicas sobre el método científico).

El método hipotético-deductivo, por el contrario, no busca confirmar las hipótesis planteadas para explicar un fenómeno biológico, sino que se basa en un proceso de sucesivas falsificaciones de las hipótesis alternativas incorrectas. La hipótesis que sobreviva a ese proceso es la que se considera aceptada por el momento, nunca confirmada (Fig. 1).

En cualquiera de los casos y aproximaciones, es fundamental tener presente que aceptar o rechazar una hipótesis estadística, producto de un diseño de

estudio particular y en el marco de un proyecto específico, no es lo mismo que aceptar o rechazar una hipótesis científica de un fenómeno o patrón biológico. Cuando una hipótesis nula (*i. e.* ausencia de patrón) no puede rechazarse (o falsificarse) con los datos colectados, los datos pueden o no apoyar las predicciones generadas por la hipótesis científica correspondiente. La hipótesis estadística nula e hipótesis estadística alternativa refieren sólo al patrón presente en los datos colectados. Es el investigador quien luego realiza inferencias sobre los mecanismos biológicos subyacentes a ese patrón observado. El test estadístico indica qué tan probable o improbable es el patrón observado, suponiendo que la hipótesis nula sea correcta. Asimismo, no poder rechazar una hipótesis nula no es lo mismo que aceptarla, y la ausencia de evidencia no es lo mismo que evidencia de ausencia. En la misma línea, la significancia estadística no es sinónimo de significancia biológica, y viceversa.

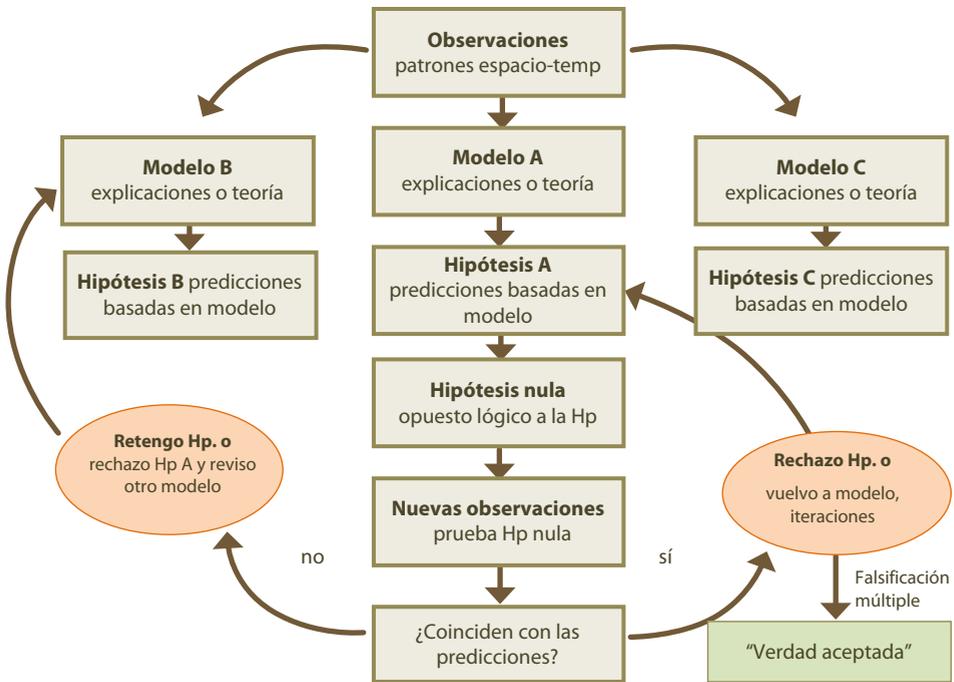


Figura 1. Modelo Hipotético-Deductivo, basado en el método deductivo de Isaac Newton y la falsificación de las hipótesis incorrectas, propuesta por Karl Popper en el siglo XX. Modificado de Gotelli & Ellison (2004) y Underwood (1997).

Colecta de datos

Planificación del estudio

Esta sección se basa fuertemente en el libro de Sutherland (2006), que recomendamos para todos aquellos investigadores que colectan datos en terreno. Un investigador experimentado usualmente considera todos los pasos de la Tabla 1 en forma simultánea, y explora diferentes combinaciones de preguntas y análisis. Sin embargo, en la mayoría de los casos puede ser útil aplicar la planificación inversa sugerida por Sutherland: comenzar por el final.

Tabla 1. Planificación inversa de la colecta de datos, tomado de Sutherland (2006)

1. ¿Cuál es la pregunta específica?
2. ¿Qué resultados son necesarios para contestar esas preguntas?
3. ¿Qué datos se necesitan para completar esos resultados?
4. ¿Qué protocolo se requiere para obtener esos datos?
5. ¿Es posible colectar esos datos con el tiempo y recursos disponibles?
6. Modificación del plan según el tiempo y los recursos disponibles.
7. Creación de las planillas de datos.
8. Comenzar y enfrentarse a la realidad.

¿Cuál es la pregunta específica?

La o las preguntas a contestar con la investigación deben ser claras y practicables en el tiempo disponible y los recursos humanos y materiales existentes. Las mejores preguntas son aquellas para las cuales hay una respuesta específica, y no aquellas excesivamente amplias o abiertas (salvo que el objetivo del proyecto sea describir patrones para los cuales se carece totalmente de antecedentes). Esta pregunta específica puede desglosarse en el “quién”, el “qué”, el “cómo”, el “dónde” y el “cuándo” asociados. Para definir y luego contestar adecuadamente estas preguntas es fundamental conocer la biología de la o las especies de interés. La identidad de las especies determina aspectos como su tamaño corporal (lo que determina el tamaño de las unidades de muestreo o de las unidades experimentales y los métodos necesarios), su forma de distribución espacial (e. g. agregada o en parches versus homogénea, los hábitats donde es esperable encontrarla, etc., lo que determina el esfuerzo y la localización de las unidades

muestreales), su período de actividad a distintas escalas temporales (e. g. diaria versus intraanual, lo que determina el momento ideal del día y del año para la realización del muestreo o del experimento), su densidad posible (lo que determina el esfuerzo de muestreo y la unidad apropiada de superficie o volumen e. g. cm^2 , m^2 , km^2), y la variabilidad temporal interanual si el nivel de interés es la población o la comunidad (lo que determina la duración deseable del estudio). En la sección 5 analizamos cómo traducir estos aspectos cualitativos en definiciones concretas mediante la estadística.

¿Qué resultados se necesitan para contestar esa pregunta?

Este paso implica planificar los análisis que pueden contestar esa pregunta en forma efectiva. Sutherland sugiere el criterio de definir y esquematizar una cierta cantidad de gráficos y tablas que se precisan para responder esa pregunta y que potencialmente van a usarse en el producto escrito de la investigación (tesis, artículo, etc.). Este ejercicio puede contribuir a pensar en lo que se está tratando de alcanzar, ayudando a discriminar entre la información esencial, la interesante pero no imprescindible, y la directamente accesoria. Los análisis estadísticos subyacentes al diseño de muestreo o del experimento muchas veces se desprenden de esa presentación esquemática de los resultados a obtener. Puede ser útil discutir esa presentación con otros colegas. A modo de ejemplo, figuras del tipo puntos y líneas que involucran dos variables generalmente reflejan análisis de correlación o regresiones; los histogramas suelen asociarse a tests de Student (test de T), Análisis de Varianza o Covarianza (ANOVA y ANCOVA), mientras que las tablas pueden estar vinculadas a análisis de datos de frecuencia como el χ^2 . Este tipo de ejercicio ayuda a definir cómo se analizarán los datos, lo que ayudará a mejorar el diseño de la colecta si fuera necesario, aprovechando la oportunidad para maximizar los resultados minimizando el esfuerzo e impacto de la investigación. Dentro de las representaciones gráficas hay muchas posibilidades para los mismos datos, pero no todas las posibilidades tienen el mismo impacto o transmiten la misma cantidad de información. Para facilitar la elección es fundamental tener en cuenta a quién va dirigido el mensaje. En cualquier caso, puede ser útil discutir esa presentación con otros colegas y evaluar si coinciden con el abordaje estadístico asociado.

¿Qué datos se necesitan para completar esos resultados?

De acuerdo a esta guía sugerida de actividades, una forma sencilla y práctica de contestar esta pregunta es que los datos que se requieren son aquellos necesarios para realizar adecuadamente las figuras esquematizadas en el paso anterior, además de aquellos datos que ayudan a interpretar o contextualizar los resultados principales. Las características de los datos incluyen la cantidad de da-

tos mínima necesaria para que los análisis estadísticos tengan sentido, incluyendo el número de individuos que deben monitorearse/muestrearse, la superficie del área a muestrear, el número de réplicas, etc. Además de las características biológicas de las especies de interés que fueron mencionadas más arriba, estas definiciones también dependen de qué tan fuertes sean las relaciones entre las variables de interés o la magnitud esperable de las diferencias entre los tratamientos o factores de un experimento, así como la variabilidad esperable dentro y entre las unidades muestrales y/o experimentales (ver sección "Guía..." sobre el final del capítulo). Evidentemente, la información y el conocimiento previo son fundamentales para adecuar el esfuerzo de muestreo o de los experimentos. En ausencia de información previa, la realización de muestreos o experimentos piloto es fundamental para estimar la magnitud de los efectos a detectar y ajustar el diseño de forma consecuente, como se desarrolla más adelante (Underwood, 1997). En aquellos (pocos) casos en los cuales no es factible realizar pilotos, y se carece totalmente de información, varios autores recomiendan que se tomen al menos 20 muestras para estudios del tipo correlacional o regresional, o que usarán histogramas. Si bien este número es arbitrario, suele ser útil (Sutherland, 2006). Si lo más probable es que las diferencias o los efectos a analizar sean leves, o la variación entre muestras se supone que será alta, seguramente este número resultará insuficiente. Por el contrario, si lo más probable es que los patrones sean fuertes y consistentes, y la magnitud de los efectos sea alta, un menor número de muestras puede ser suficiente. Los cálculos necesarios para determinar el número de muestras para obtener la precisión deseada se presentan más adelante.

¿Es posible coleccionar esos datos con el tiempo y recursos disponibles?

La determinación real del tiempo necesario para coleccionar los datos es un paso fundamental y, en muchos casos, también es un requisito en los proyectos o tesis que concursan por financiación. Es extremadamente frecuente que prime el optimismo y la ambición en las metas a la hora de definir los tiempos destinados a la investigación, por sobre el realismo y la evidencia empírica de los investigadores. Si el tiempo parece ser insuficiente, seguro lo será. En ese caso, lo mejor es modificar el proyecto y redefinir objetivos, antes que abandonar secciones de él sobre la marcha y poner en riesgo todo el proyecto. En la planificación del tiempo destinado a coleccionar muestras, Sutherland sugiere seguir los siguientes pasos:

1. Definir el tiempo disponible (*i. e.* el número de días para destinar al muestreo). Para ser realista, dentro de ese número se debe incluir margen para que ocurra alguna baja de algún miembro del equipo, traslado entre sitios de muestreo, fallas en el equipamiento técnico y necesidad de compra de insumos, mal tiempo que impida salir a terreno, entre otros "imprevistos" que deberían preverse, ya que indefectiblemente ocurren.

2. Definir las tareas en campo y cuántas veces se van a realizar. Estimar la duración real de cada tarea, en horas, días o la unidad que corresponda para cada tarea. Esto es particularmente relevante para actividades que no se han realizado antes (por todos o algunos miembros del equipo). Se debe considerar que difícilmente todos los miembros del grupo trabajen con el mismo entusiasmo y con la misma eficiencia que el investigador más experimentado o responsable.
3. Jerarquizar las actividades, priorizando realizar primero las indispensables para obtener los datos imprescindibles y solo luego, las actividades que “con un pequeño esfuerzo extra” generarían datos potencialmente interesantes pero fuera del plan original. Considerar si el tiempo disponible es realmente suficiente y armar un calendario realista, sin olvidar los “imprevistos”. Ajustar los objetivos si es necesario.

Diseño del estudio

Esta etapa implica traducir los objetivos del proyecto a metas específicas, y las hipótesis biológicas a hipótesis estadísticas. El diseño del estudio o diseño experimental puede definirse como un esquema que resume el procedimiento a seguir de principio a fin (Fig. 2). Muchas veces estas actividades son desarrolladas de manera intuitiva por parte de investigadores experimentados, quienes frecuentemente dan más foco a unas actividades sobre otras en función de sus intereses particulares o su experiencia. Si bien no siempre es posible (y en algunos casos no todos los pasos son necesarios), es conveniente considerar todas las actividades que se describen a continuación (Jongman *et al.*, 1995).

1. El planteo del problema en términos estadísticos. ¿A qué población estadística se dirige la investigación? ¿Qué hipótesis estadísticas están bajo consideración? ¿Qué parámetros se quiere estimar?
2. La descripción del objeto de estudio (definición de la unidad experimental o de muestreo).
3. La explicitación de las variables respuesta (dependiente), la variable explicatoria (independiente) y los tratamientos (en términos de factores y niveles de esos factores).
4. El diseño de un procedimiento para la asignación de tratamientos a las unidades experimentales o un procedimiento aleatorio para la selección de unidades de muestreo (*e. g.* muestreo totalmente aleatorio, muestreo aleatorio estratificado, muestreo sistemático).
5. La explicitación de las variables a observar, los métodos de observación relevantes y las escalas de medida a usar.

6. La determinación de la exactitud y precisión deseada de los métodos de observación a usar. Esto incluye la exactitud y precisión de los equipos, pero también la resolución taxonómica de los organismos a muestrear.
7. La determinación de la duración deseada y el tamaño del estudio. El uso de análisis de poder estadístico es fundamental para esto.
8. La explicitación de los métodos estadísticos que se usarán en el análisis (considerando sus supuestos y limitaciones), el planteo de un esquema de análisis y un marco para la representación de los resultados (e. g. figuras, tablas, diagramas).
9. La evaluación de los objetivos y definición de los criterios relevantes para evaluarlos, en función de todas las actividades anteriores.

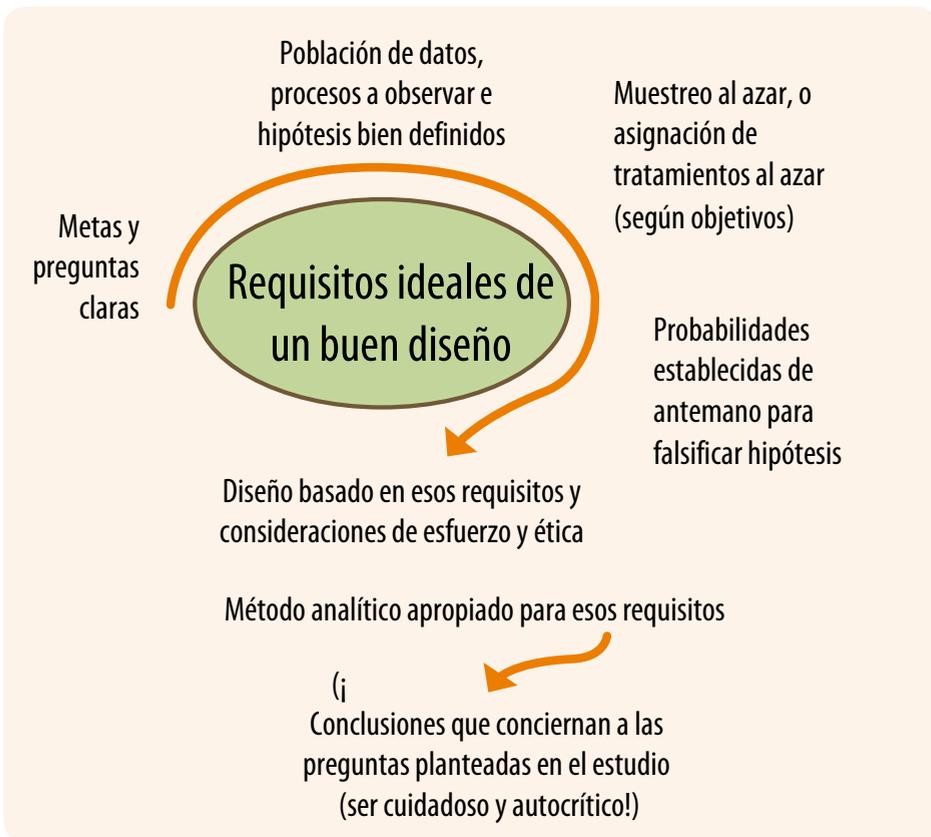


Figura 2. Secuencia de requisitos que debe tener un buen diseño de muestreo o diseño experimental, para permitir la aplicación de tests estadísticas con sentido y con el menor costo humano, económico y animal. Basado en texto de Jongman *et al.* (1995).

Tipos de estudio

Los estudios se clasifican de acuerdo a su propósito. Algunos autores separan los estudios en explicatorios *versus* pragmáticos (los primeros buscan comprender algún fenómeno, mientras que los segundos tienen una meta práctica o tecnológica), o entre estudios exploratorios *versus* confirmatorios (Jongman *et al.*, 1995). Un estudio exploratorio busca detectar relaciones que constituyan el primer paso en investigaciones siguientes destinadas a probar hipótesis científicas, mientras que uno confirmatorio busca obtener pruebas estadísticas sobre un mecanismo o proceso. Esto se logra mediante la aplicación de test de hipótesis y estimación de parámetros. Además de estas clasificaciones, el tipo de estudio involucra diferentes niveles de realismo, que varía en forma inversa a su capacidad de evaluar mecanismos o encontrar relaciones causa-efecto entre variables. Esto afecta evidentemente el alcance de las conclusiones a extraer del estudio, y por ello es fundamental conocer las ventajas y desventajas, así como los supuestos subyacentes a cada tipo de estudio.

Estudios descriptivos u observacionales

El investigador no tiene control sobre los datos, por lo cual la detección de relaciones entre variables es posible pero especulativa, y la explicación real de los patrones encontrados puede no ser evidente, ya que incluso puede estar entre el conjunto de variables que no fueron medidas. Estos estudios permiten generar hipótesis sobre los patrones observados, que serán evaluadas en futuros trabajos (Fig. 1). En general, es raro que las observaciones se realicen como si no hubiera conocimiento biológico o ecológico previo. Varios autores sostienen que los investigadores estamos sesgados a observar el mundo de cierta forma, de acuerdo a modelos, teorías o paradigmas previos, sin ser conscientes de nuestras propias limitaciones (Underwood, 1997). Las observaciones o medidas raramente se hacen como si la colecta de dichos datos fuera el único objetivo, casi siempre se hacen en relación a una teoría existente, con el objetivo (a veces no explicitado) de determinar si las mediciones encajan con preconceptos o expectativas provenientes de esa teoría, como se planteó en la sección Marco conceptual.

Muestreos

A diferencia de un censo, en el que el investigador pretende contar absolutamente todos los individuos de la población de interés, en este caso el investigador toma una muestra siguiendo criterios estadísticos establecidos de una población estadística (población de datos) bien definida. Estos estudios también permiten generar hipótesis y permiten realizar inferencia estadística, generando buenas descripciones de las poblaciones y de las diferencias entre las poblaciones de datos. Sin embargo, las relaciones entre variables siguen siendo especulativas. En este tipo de estudios, los procedimientos seguidos para obtener las muestras (e.

g. muestreos totalmente aleatorios, aleatorios estratificados, o muestreos sistemáticos, como aquellos con transectas) son fundamentales para asegurar su representatividad. Nuevamente, el conocimiento del investigador sobre la biología de las especies, sus hábitats, la variabilidad espacial y temporal en terreno, y las limitaciones o sesgos de los equipos de colecta, es pieza fundamental del éxito de los muestreos. Los muestreos estratificados, por ejemplo, toman en cuenta la heterogeneidad en la población de datos que se está muestreando (dada, a modo de ejemplo, por distintos hábitats en la zona de estudio). La población (de datos) está dividida en niveles o estratos que representan claramente grupos de unidades dentro de la población general. Este muestreo colecta una serie de datos dentro de estos grupos en forma independiente (y aleatoria) y genera estimaciones más representativas.

Modelos

Al igual que en los experimentos, el investigador selecciona y define las variables de interés. Esta aproximación también permite poner a prueba hipótesis y evaluar vínculos entre variables, así como estimar en forma teórica las respuestas del sistema frente a variación de las variables. En muchos casos, la simplificación de la realidad puede ser aun mayor que en el caso de los experimentos, siendo otra desventaja, su gran sensibilidad y dependencia respecto de los supuestos del modelo. Por otra parte, los modelos brindan gran flexibilidad al investigador y, en principio, tienen impacto ambiental nulo, ya que pueden basarse en relaciones esperadas teóricamente entre variables y/o en datos generados previamente.

Experimentos (o bioensayos)

El investigador diseña y controla el sistema bajo estudio y define los procedimientos a seguir. Los experimentos son la alternativa más indicada para poner a prueba hipótesis en un marco lógico y usar los resultados para evaluar teorías e hipótesis de manera empírica. Si el estudio está bien diseñado, permite evaluar la relación causal entre variables y comprender mecanismos detrás de las observaciones. Su desventaja principal es la simplificación de la realidad, ya que, en el mejor de los casos, unas pocas variables son incluidas. Los resultados son dependientes de las definiciones del investigador, y la extrapolación al mundo real debe hacerse con mucho cuidado. Dentro de este tipo de estudio existen variantes, con distinto nivel de complejidad: experimentos de campo semicontrolados, experimentos de campo controlados, y experimentos de laboratorio totalmente controlados. Esta secuencia de tipos de estudio experimentales va perdiendo realismo, pero generalmente ganando capacidad de comprender mecanismos. Para mantener la lógica de cualquier prueba de hipótesis y que el experimento

tenga sentido, es necesario, en todos los casos, incluir adecuadamente los criterios de aleatoriedad, independencia de los datos, existencia de controles de los procedimientos experimentales y los tratamientos de interés, y replicación (versus pseudorreplicación, ver Underwood, 1997 y varios artículos que discuten la relevancia de estos conceptos en estudios de ecología). Esto hace que el diseño de la mayoría de los experimentos sea complejo (se recomienda fuertemente seguir los puntos presentados y discutidos en Underwood, 1997; y artículos posteriores).

Fuentes de mala interpretación

Las etapas en las que potencialmente se generan errores irreversibles son las iniciales, es decir las correspondientes al diseño del estudio y la etapa de colecta de los datos, en las que es frecuente que se cometen uno o más errores o “pecados” *sensu* Sutherland (2006) (Fig. 3). Realizar muestreos sesgados o no plantear explícitamente la hipótesis científica y las hipótesis estadísticas nula y alternativa asociadas, son causas de mala interpretación de los datos, propia y por terceros. Afortunadamente, la detección de estas fallas (por parte del investigador o sus lectores) puede evitar extraer conclusiones equivocadas, en la medida que el diseño y estrategia de investigación hayan sido correctamente planteados y ejecutados. Sin embargo, una vez colectados los datos, también existen diversas fuentes de mala interpretación que pueden afectar la validez de las conclusiones.

El uso incorrecto de tests estadísticos es uno de los errores más frecuentes, incluyendo la aplicación de tests que no se ajustan al diseño del estudio, la no exploración preliminar de los datos para detectar posibles errores y/o *outliers*, el desconocer o elegir ignorar los supuestos y limitaciones de los tests, aplicación de tests con menor poder estadístico que otros posibles, y la aplicación de transformaciones a los datos sin sentido biológico o estadístico, entre otros (Jongman *et al.*, 1995).

Otro error frecuente es tomar la detección como prueba (Jongman *et al.*, 1995). Es frecuente confundir la prueba estadística (afirmación concluyente sobre la población muestreada) con la detección de efecto (afirmación sobre la población real objeto del estudio). Esto es fundamentalmente importante en estudios que hacen recomendaciones para áreas mayores a las estudiadas. Esta distinción muchas veces no es evidente cuando no se reporta claramente cuál es la población muestreada o cuando las unidades muestrales o experimentales no están definidas apropiadamente, o las hipótesis estadísticas no se explicitan. En este grupo de errores se ubica también el modificar los objetivos del estudio a la vista de los datos, es decir cuando se encuentra una relación en los datos sin que se haya planeado estudiarla. En este caso, el análisis predice lo que ya pasó, lo que cambia el carácter de las conclusiones del estudio (Jongman *et al.*, 1995).

La experiencia y conocimiento del estado del arte por parte del investigador es fundamental para interpretar este tipo de resultados en su justa medida.



Figura 3. Errores frecuentes en las distintas etapas de un proyecto de investigación que involucre muestreos de campo, o los “pecados más frecuentes en muestreos”, según Sutherland (2006). Varios de ellos son comunes a los proyectos que involucren experimentos.

Guías para minimizar los dolores de cabeza: estimación del tamaño de muestra

Conceptos generales

Una de las dudas más frecuentes a la hora de diseñar un experimento o trabajo de campo es el número de réplicas o muestras a coleccionar. Una vez tomados los datos persiste la duda sobre la capacidad que estos tienen de estimar el fenómeno biológico que nos interesa, o de detectar diferencias con estudios previos, otros sitios u otros momentos de muestreo. Afortunadamente, existe una amplia gama de herramientas que nos permiten responder estas incógnitas. Lamenta-

blemente, y sorprendentemente, rara vez se las enseña en cursos básicos o avanzados de estadística.

En esta sección presentaremos primero las bases conceptuales asociadas a la estimación del tamaño de muestra. Las definiciones clave en este contexto son las de *error estándar*, *magnitud de efecto* y *poder estadístico*. Como veremos, la combinación de estos tres valores determina el *tamaño de muestra* o número de réplicas requeridas. A continuación, nos enfocaremos explícitamente en los cálculos de tamaño de muestra asociados a la comparación de dos o más medias, regresiones lineales y tablas de contingencia. Por último, consideraremos la estimación del número de muestras en problemas biológicos clásicos, como son las estimaciones de abundancia y diversidad.

Un abordaje intuitivo

En la mayoría de los casos contamos con una idea intuitiva sobre la relación entre la cantidad de muestras necesarias y el fenómeno que estamos estudiando. Imaginemos que estamos describiendo la anatomía de una nueva especie de mamífero. Primero queremos saber cuántos riñones tienen los individuos de esta especie. En segundo lugar, nos interesa reportar la longitud promedio del asa de Henle, una estructura del riñón involucrada en la reabsorción del agua que aumenta en longitud cuando se vive en ambientes áridos. Esta longitud es variable entre especies, dentro de especies, y a su vez, la medición del largo es imperfecta. Intuitivamente, sabemos que vamos a precisar muchas más muestras para estimar el largo de las asas de Henle que el número de riñones. De la misma forma, consideremos una estimación de diversidad de especies en dos ambientes, uno muy diverso y espacialmente heterogéneo y otro homogéneo y poco diverso. Nuevamente, intuitivamente precisaríamos más muestras en el primer ambiente que en el segundo. De hecho, estos ejemplos capturan un principio básico del muestreo: *cuanto más variable es el fenómeno en estudio, más muestras se precisan para estimarlo con igual confianza*.

Imaginemos ahora que queremos analizar si el estado de un ecosistema difiere del estado de otro. Esto puede involucrar, por ejemplo, la concentración de contaminantes en el agua entre dos ríos, la biomasa vegetal en ecosistemas con y sin pastoreo, o determinar si existen diferencias en la diversidad aguas arriba y aguas abajo de una planta de celulosa. En la figura 4 se representa la distribución de la variable en ambos sitios de muestreo. Las curvas acampanadas de las figuras representan la variabilidad y valor promedio de la variable en ambos ambientes. Estas distribuciones pueden representar con qué frecuencia se observan distintos números de individuos o riqueza de especies en cuadrantes tomados en uno y otro sitio. En los tres casos planteados en la Figura 4 la intención es detectar en cada uno la diferencia (d) entre el ambiente 1 y el ambiente 2. Tomemos el primer caso como referencia. Si comparamos el caso 1 con el caso 2, en este

último la distribución de frecuencia entre valores observados es más amplia que en el caso anterior. En términos estadísticos, en el caso 2 los ambientes tienen más *varianza* en sus valores que en el caso 1. Como consecuencia de esta mayor varianza, a pesar de que la diferencia d entre ambientes es la misma, la capacidad de detectar la diferencia va a ser menor en el caso 1 que en el caso 2. Esto nos lleva a una extensión del principio básico que planteamos más arriba: *cuanto más variable es el fenómeno en estudio, más muestras se precisan para estimarlo con igual confianza o para detectar diferencias entre tiempos o entre ambientes.*

Por último, consideremos la comparación entre el caso 1 y el 3. Las varianzas en ambos casos son iguales, pero la distancia d entre los valores promedio de ambos es menor en el caso 3, lo que dificulta nuestra capacidad de detectar la diferencia en el último caso. Esta distancia d es lo que definimos en estadística como *magnitud de efecto*. Esto visualiza un segundo principio del muestreo: *cuanto más chica es la diferencia que se quiere detectar, más muestras se precisan para detectarla.*

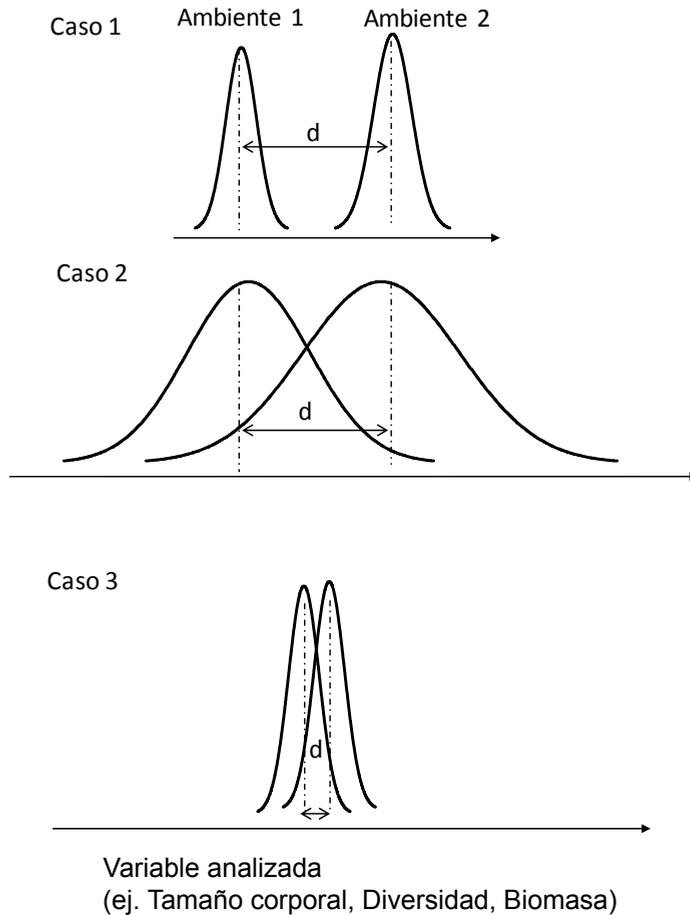


Figura 4. Relación entre la dispersión de los datos y la capacidad de detectar diferencias. d es la diferencia que se quiere detectar. Cuanto más chico el valor de d o más dispersos sean los datos, más difícil va a ser detectar la diferencia y/o más muestras serán necesarias para hacerlo.

De las consideraciones anteriores se desprende un tercer mensaje: *no hay una respuesta universal al número de muestras o réplicas a utilizar*, sino que la naturaleza del fenómeno en estudio determina este valor caso a caso. No obstante, los determinantes del tamaño de muestra son siempre los mismos: la variabilidad del fenómeno (*varianza*), la diferencia que deseamos detectar (d) y la seguridad con la cual queremos detectar la diferencia, lo que es conocido como el *poder* de una prueba estadística. Afortunadamente, fijando estos parámetros siempre es posible estimar el número de muestras a tomar para cumplir con los objetivos planteados.

Sesgo y precisión

En todo muestreo intentamos estimar algo de una población estadística a partir de observar una parte de esta, que es la fracción que observamos en nuestro muestreo. Esta población estadística puede ser el número medio de individuos por cuadrantes, la diversidad de especies, o el tamaño de los individuos. Como se mencionó previamente, es fundamental no confundir una población biológica (*i. e.* individuos de una misma especie habitando un ambiente) de una población estadística, que es simplemente un conjunto de elementos o valores de los cuales queremos inferir propiedades.

Una conceptualización útil del proceso de muestreo es pensarlo como un tiro al blanco (Fig. 5). Cada tiro al blanco representa un muestreo donde observamos una cantidad de individuos o áreas del sistema. En este conjunto de individuos estimamos, por ejemplo, su tamaño promedio o la densidad de individuos por unidad de área. Cada tiro es así una estimación del peso promedio de los individuos en una población. Cuando el tirador es inexperto, cambiará mucho la posición de la flecha en el blanco entre disparos y seguramente, en promedio, las flechas estarán corridas del centro. Lo mismo ocurre con un mal diseño de muestreo. Si repetimos varias veces el muestreo, en cada evento de muestreo se van a estimar valores muy distintos de la densidad de individuos, y en promedio las estimaciones no van a estar ubicadas sobre el valor real. Esto es lo que definimos como un muestreo *sesgado e impreciso* (Fig. 5A).

A modo de ejemplo, pensemos un muestreo en que el método es adecuado para el sistema de estudio y los organismos de interés, de acuerdo a los puntos tratados en ítems anteriores. Por ejemplo, utilizamos un set de redes para colectar peces en un lago. No obstante, la lluvia, el volumen del agua, la hora del día, el tipo de fondo, la temperatura y la combinación de variables en cada evento de muestreo afectan la captura de individuos, determinando gran variabilidad entre las estimaciones de la densidad. En promedio la técnica funciona bien, pero es imprecisa, tendiendo a alejarse del valor real (Fig. 5B). En otro caso, pensemos en un muestreo de ratones con trampas Sherman que tienen distintos tamaños. Si son muy chicas en relación al tamaño de los individuos de una especie, esta tenderá a estar sistemáticamente subrepresentada en el muestreo. De igual forma, si la trampa es muy grande, los ratones pueden no activarla estando también subrepresentadas las especies o individuos pequeños. Algunos ratones aprenden que la trampa tiene comida, pasan la noche sin riesgo de depredación, acostumbrándose a comer en las trampas; estando sobrerrepresentados en las muestras. En estos casos, las estimaciones de abundancia dan valores muy consistentes entre muestreos, pero sistemáticamente alejados del valor real. Esto genera una estimación precisa pero sesgada (Fig. 5C). Por último, está la fantasía o ideal de todo trabajo de campo de que existe un método que es preciso y no sesgado (Fig. 5D). En este caso, los distintos muestreos tienden a dar valores muy parecidos entre sí y centrados en el valor real de la población.

Las curvas al costado de cada diana en la Figura 5 representan la relación entre el grado de sesgo y precisión de las estimaciones y su distribución entorno al valor real que queremos estimar. El desvío estándar de estas distribuciones nos dice el grado de precisión que tienen las estimaciones. De hecho, el desvío estándar de las estimaciones de un parámetro es lo que conocemos como “*error estándar*”. Cuando el error estándar es chico las estimaciones son muy precisas y lo opuesto ocurre cuando el error estándar es grande.

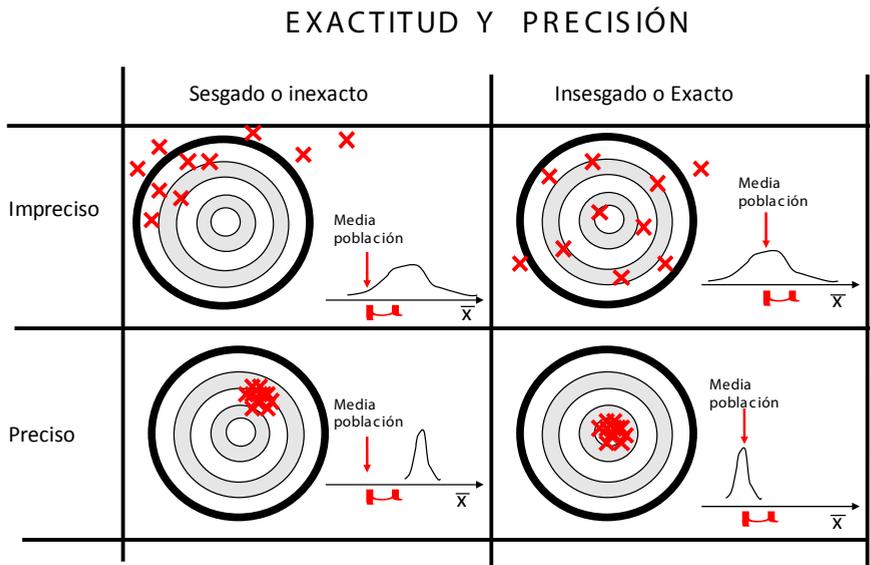


Figura 5. Conceptos de exactitud, precisión y error estándar. El tiro al blanco representa los resultados posibles de un muestreo. El centro de la diana es el valor real de la población que se desea estimar con el muestreo. Cada cruz representa la estimación de un parámetro de la población en base al muestreo (e. g. peso promedio). Si los valores de las distintas estimaciones son consistentes, tendremos un muestreo preciso. Pero se puede ser preciso y siempre errarle al valor real. La diferencia promedio entre las estimaciones y el valor real es denominada *sesgo*. El desvío estándar de las estimaciones de un parámetro es denominado *error estándar*.

Error estándar

Para calcular este error estándar en el ejemplo anterior precisaríamos repetir un muestreo muchísimas veces, lo cual excede nuestras capacidades e intereses. Afortunadamente, si conocemos el desvío estándar de una población, por ejemplo, en la densidad de individuos entre muestras, podemos estimar fácilmente el error estándar. Específicamente, *el error estándar se calcula dividiendo el desvío estándar estimado de nuestras muestras por la raíz del número de muestras que hemos tomado* ($\text{error estándar} = s/\sqrt{n}$; siendo n el número de muestras y s el desvío estándar estimado con estas muestras).

Esta fórmula es importante, ya que implica que la precisión de nuestra estimación aumenta con el inverso de la raíz del número de muestras (Fig. 6).

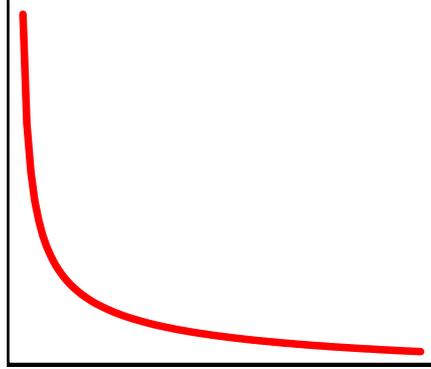


Figura 6. Relación entre error estándar y número de muestras. Esta relación es fuertemente no lineal, indicando que se aumenta mucho la precisión con las primeras muestras, pero que se debe aumentar mucho el esfuerzo de muestreo para seguir aumentando la precisión de la estimación.

Considerar la forma de esta curva es clave para un buen diseño de muestreo. Claramente, el aumento en la precisión de la estimación (al disminuir el error estándar) es fuertemente no lineal. En este caso, cuando pasamos de 1 a 20 muestras la precisión aumenta muchísimo, pero luego aumenta suavemente. Esto implica que duplicar el número de muestras cuando hemos tomado pocas impacta mucho en la calidad del muestreo, pero que duplicarlas cuando ya hemos tomado un número importante de observaciones, no aumenta tanto la precisión. En términos generales, debemos aumentar al cuadrado el número de muestras para duplicar la precisión. Debido a esto, lograr estimaciones muy precisas es algo muy caro en número de muestras, lo que aumenta costos, esfuerzos y daño animal.

Intervalo de confianza

Una propiedad del muestreo que es de gran ayuda en la planificación del diseño, es que la distribución de las estimaciones (*i. e.* las flechas en la Fig. 5) tiende a ser Normal, a pesar de que la distribución original, de la cual tomamos muestras, no lo sea. Esto nos permite, entre otras cosas, construir *intervalos de confianza* a las estimaciones. Un intervalo de confianza nos dice los límites entre los cuales puede estar un valor de la población con una probabilidad dada. En un ejemplo hipotético, nos permite decir que la diversidad en un sitio impactado está con un 0,95 de probabilidad entre 3 y 10 especies, mientras que en un sitio no impactado está entre 23 y 34.

Dado que las estimaciones de un parámetro poblacional se distribuyen normalmente, podemos utilizar esta distribución para estimar el intervalo de confianza. Para esto trabajaremos con la distribución Normal estandarizada, la cual tiene forma de campana con media 0 y desvío estándar 1. Los valores de esta distribución se denominan Z y están determinados por $Z = (\bar{y} - \mu) / (\vartheta / \sqrt{n})$, donde μ y ϑ son la media y el desvío de la población de la cual tomamos muestras.

El 95% de los valores que puede tomar Z están entre -1,96 y 1,96; lo que podemos expresar como:

$$p \left\{ -1,96 \leq \frac{(\bar{Y} - \mu)}{\vartheta / \sqrt{n}} \leq 1,96 \right\} = 0,95$$

En esta fórmula aparecen los componentes a considerar en todo diseño de muestreo: la heterogeneidad de la población (ϑ), el parámetro que queremos estimar (μ en este caso), la precisión que deseamos: 0,95, que es la probabilidad de que el valor real esté dentro de nuestro intervalo de confianza y, por último, cuántas muestras tomamos (n). El valor de 0,95 es algo que fijamos nosotros en base a la confianza que deseamos tener y que determina que la división del centro esté acotada entre . Estos valores de 1,96 son los valores de la distribución Z que dejan el 95% de los valores posibles entre ellos. Es decir, de todas las estimaciones posibles del parámetro poblacional, el 95% está entre estos valores.

Podemos entonces despejar el número de muestras requeridas n para estimar un parámetro poblacional con una confianza dada, o el número de muestras para detectar con una probabilidad dada (e. g. 0,95) si la media de la población difiere de un valor referencia d . Para esto, definimos d como la distancia entre la media estimada y la de media de la población real ($d = \bar{Y} - \mu_d = \bar{Y} - \mu$). De donde:

$$n = \left(\frac{1,96 \cdot \vartheta}{d} \right)^2$$

Lo que nos indica que cuanto menor sea la precisión de la estimación (mayor distancia d entre la estimación y el valor real), o más variable sea el fenómeno (σ), el número de muestras necesarias aumentará al cuadrado.

Recién dijimos que la distribución de las estimaciones de un parámetro sigue una distribución Normal que podemos estimar con $Z = (\bar{y} - \mu) / (\vartheta / \sqrt{n})$. No obstante, en esta fórmula aparece el valor del desvío estándar de la población σ , el cual solemos estimar a partir de nuestro muestreo y denominamos s . Debido a esta estimación del desvío, la distribución se parece a la Normal, pero es un poco distinta, no es tan alta en la media y sus colas son más anchas. Por suerte esta distribución es bien conocida y es denominada *distribución t de Student*. Lo inte-

resante es que la forma de esta distribución cambia con el número de muestras, lo que se representa en los grados de libertad asociados. Por eso, cuando trabajamos con esta distribución siempre consideramos sus grados de libertad, los que expresamos como un subíndice: $t_{\text{grados de libertad}}$. Si tenemos muchas muestras, la distribución "t" es casi idéntica a la Normal. Con números de muestra bajos (lo que es más habitual), la diferencia es importante. En la práctica, en nuestro cálculo de intervalo de confianza o número de réplicas, lo único que cambiamos es la Z (1,96 en el ejemplo) por una t , que va a ir cambiando con el número de muestras.

$$n = \left(\frac{t_{gl[n-1]} \cdot S}{d} \right)^2$$

Cálculo de tamaño de muestra para la detección de ocurrencia de una especie

En muchos contextos deseamos saber si una especie está presente en un sistema. Por ejemplo, una especie invasora está presente en la región y queremos evaluar si ha llegado a un ambiente en particular. Otros ejemplos serían la ocurrencia de liberación de contaminantes en campos donde hay especies vulnerables o posteriormente al uso de insecticidas en donde se quiere erradicar un determinado vector biológico. La misma situación involucra la detección de una enfermedad en un vector biológico o en una población. En estos casos debemos estimar el número de muestras a coleccionar para tener una confianza razonable de detectar si la especie se encuentra presente o no.

Para estimar este número de muestras, n , debemos definir: α , la probabilidad de detectar a la especie y O , la ocurrencia de la especie en el sistema particular. Este valor de ocurrencia es la proporción del espacio en que la especie ocurre, o el número de individuos en los cuales la enfermedad está presente. Este valor lo fijaremos nosotros para estimar el número de muestras que se debe tomar para detectar con probabilidad p a una especie que presenta esta ocurrencia en el ambiente. De hecho, la detección de una especie o enfermedad suele no ser perfecta. Debemos considerar entonces la Probabilidad de una Falsa Ausencia (PFA, Arim & Naya, 2003). El cálculo del número de muestras en este contexto es dado por:

$$n = \log(1 - \alpha) / \log(1 - O \cdot (1 - PFA))$$

Estimación del tamaño de muestra en diversas pruebas estadísticas, usando R

Para la mayoría de las pruebas estadísticas se han desarrollado fórmulas de cálculo para el tamaño de muestra (Cohen, 1988). Estas fórmulas siempre involucran las mismas consideraciones: la magnitud de efecto, la probabilidad de detectar una diferencia cuando existe, y la probabilidad de cometer un error detectando una diferencia que en realidad no existe. La *magnitud del efecto* suele expresarse como el cociente entre la diferencia que quiero detectar, d (e. g. riqueza de especies entre dos ambientes o éxito de cría entre poblaciones) y el desvío del fenómeno. La probabilidad de detectar una diferencia se denomina “*poder*” de una prueba. Cuando existe una diferencia y fallamos en detectarla, hemos cometido un *Error tipo 2*. El poder de una prueba es 1 menos la probabilidad de cometer un error tipo 2, es decir, la probabilidad de no cometerlo. Como contrapartida, podemos inferir que existe una diferencia entre dos poblaciones cuando en realidad no la había. Esto es lo que se define como *Error tipo 1*. La probabilidad de cometer un error tipo 1 es lo que denominamos significancia de una prueba, y que, solo por convención, solemos fijar en el valor de 0,05. A partir de estas definiciones consideraremos la estimación de número de muestras para diversas pruebas estadísticas.

Considerando el uso generalizado del programa R en el análisis de datos, a continuación, introduciremos las fórmulas y los argumentos requeridos para su uso, con ejemplos caso a caso. Para esto nos basaremos en el paquete de R “*pwr2*”. En la Tabla 2 se resumen las pruebas estadísticas, las funciones para la estimación de tamaño de muestra y sus variantes.

Comparación de dos medias

La comparación entre medias es una de las pruebas más básicas y frecuentemente utilizadas. Suelen existir tres tipos de comparaciones entre pares de medias: el promedio de una muestra contra un valor de referencia, la comparación entre los valores promedio de dos muestras y la comparación del valor promedio en los mismos individuos en dos momentos o espacios distintos. Esta última comparación se denomina test pareado.

La magnitud de efecto, d , será la razón o cociente de la diferencia entre las medias que deseáramos detectar y el desvío de la población: $d = (\text{media 1} - \text{media 2})/\vartheta$. En términos generales, es útil pensar en la magnitud de efecto como una diferencia entre medias, expresada en unidades de desvío. Por ejemplo, una magnitud de efecto de 0,5 implica una diferencia entre la media de dos poblaciones igual a la mitad del desvío estándar.

También deberemos definir la probabilidad del *error tipo 1* y el *poder* de la prueba. La función *pwr.t.test* de R permite la estimación de número de muestras requeridas para satisfacer estas condiciones en todas las pruebas de t .

Por ejemplo, si escribimos en la consola de R:

pwr.t.test (d = .5, n = NULL, sig.level = 0.05, type = "one.sample", alternative = "two.sided", power = 0.8)

nos devuelve el siguiente resultado:

One-sample t test power calculation

n = 33.36713

d = 0.5

sig.level = 0.05

power = 0.8

alternative = two.sided

Lo que nos indica que para tener una probabilidad de detectar una magnitud de efecto de 0,5 con una probabilidad de 0,8 y un riesgo de error tipo 1 de 0,05, debemos coleccionar al menos 34 muestras.

Muchas veces el costo o esfuerzo de muestreo es diferente en distintos tiempos o espacios. También suele ocurrir que el número de individuos observados no puede ser fijado al resultar de dos eventos de colecta o trampeo. En estos casos utilizaremos la fórmula: *pwr.t2n.test*, debiendo definir el número de muestras a tomar en una de las poblaciones, y estimar el número de muestras a coleccionar en la segunda población. Es importante destacar que pueden explorarse varios valores de número de muestras o expectativas de error tipos 1 y 2 para encontrar la estrategia de muestreo que satisfaga los requerimientos del problema y nuestra capacidad de trabajo. Afortunadamente, estas fórmulas también pueden andar el camino opuesto, es decir, permiten estimar, dado un muestreo con n individuos, el poder de detección de diferencias, la probabilidad de error tipo 1, o la magnitud de efecto que podría detectarse.

Comparación de varias medias

El análisis de varianza o ANOVA es la prueba estadística que permite evaluar si un grupo de poblaciones, k , tienen las mismas medias (o que no difieren estadísticamente). El principal cambio con respecto al caso anterior, es que la diferencia que se quiere detectar ya no involucra dos poblaciones, sino un grupo de poblaciones en donde al menos una debe diferir. El tamaño de efecto se define en este caso como f y representa el desvío estándar de los valores de las medias en los distintos grupos estandarizados por el desvío estándar (Cohen, 1988). En esencia, f , representa qué tan distintas son las medias de las poblaciones que se quiere detectar, expresando esa diferencia en unidades de desvío.

Por ejemplo, consideremos que tenemos un experimento realizado en las cuatro estaciones del año. En cada estación estimamos la riqueza de especies en un arroyo con unidades muestrales apropiadas a cada organismo objetivo (e. g. pulsos de pesca eléctrica para coleccionar peces, trampas *pit-fall* en la zona litoral para coleccionar invertebrados terrestres, cuadrantes de vegetación, etc.). Considerando la variabilidad natural entre estaciones del año en la diversidad, fijamos un desvío de la riqueza media de 0,33, como un valor con sentido biológico. En la consola de R se escribe:

```
pwr.anova.test (k = 4, n = NULL, f = 0.33, sig.level = 0.05, power = 0.8)
```

Lo que nos devuelve el siguiente resultado:

```
Balanced one-way analysis of variance power calculation
```

```
k = 4
```

```
n = 26.02669
```

```
f = 0.33
```

```
sig.level = 0.05
```

```
power = 0.8
```

```
NOTE: n is number in each group
```

Esto nos dice que, trabajando con una probabilidad de error tipo 1 de 0,05 y una probabilidad de 0,8 de detectar diferencias de esa magnitud en la diversidad entre estaciones, deberíamos tomar al menos 26 muestras por estación. Cuando el número de observaciones difiere entre grupos (en este caso las estaciones) se debe considerar el valor de n del grupo con menos observaciones.

Correlación entre variables

Uno de los objetivos más básicos de muchos proyectos que involucran trabajo de campo suele ser detectar la existencia de asociaciones entre variables. Por ejemplo, la asociación entre la concentración de un contaminante y la diversidad y abundancias de una comunidad, o entre la diversidad de depredadores y la diversidad de presas. Más allá de que la gama de abordajes estadísticos puede ser más sofisticada que los análisis de correlación (Shipley, 2016), tener una seguridad aceptable de poder detectar asociaciones está en la base de un buen muestreo. Los parámetros que están en juego son los mismos que en los casos anteriores, lo que cambia es qué entendemos por magnitud de efecto. Esta magnitud será el nivel de correlación, r , que queremos detectar.

En R, la función *pwr.r.test* permite estimar el número de muestras necesario para detectar esta correlación. Nuevamente, dado un muestreo, también nos permite estimar qué nivel de correlación estaríamos siendo capaces de detectar con el número de muestras colectado.

En la consola de R:

```
pwr.r.test (n = NULL, r = .3, sig.level = 0,05, power = 0.8, alternative = "two.
side")
n = 84.07364
r = 0.3
sig.level = 0.05
power = 0.8
alternative = two.sided
```

Este resultado indica que necesitaríamos 85 muestras para detectar correlaciones de 0,3 con una probabilidad de 0,8. Este resultado debería llamar la atención de muchos biólogos de campo. Rara vez logramos trabajar con tantas unidades muestrales, además de las implicancias éticas en caso de que el objeto de estudio y el método de colecta impliquen daño animal irreversible.

Tablas de contingencia

Las tablas de contingencia se utilizan para explorar diferencias en la distribución de observaciones. Bajo este paraguas entran una gama muy amplia de comparaciones. Las tablas de contingencia tienen dos o más criterios de clasificación de individuos en categorías discretas. Por ejemplo, involucra individuos categorizados en especies y en lugares o fechas de colecta (tabla especie por ambiente). En ese caso, nos puede interesar detectar diferencias en la distribución de individuos entre especies a lo largo de los muestreos. También se usan estas tablas para comparar la distribución de frecuencias con distribuciones teóricas, como la Normal, log-Normal o beta (Marquet *et al.*, 2017). Por otro lado, varios importantes análisis de ordenación basados en observaciones de individuos son representaciones gráficas de tablas de contingencia, tales como los Análisis de Correspondencia (Borcard *et al.*, 2011).

El test clásico para tablas de contingencia se basa en la distribución χ^2 . Esta distribución cambia de forma con los grados de libertad. Típicamente, los grados de libertad están determinados por el número de filas de la tabla menos uno, multiplicado por el número de columnas menos uno. El cálculo del número de

muestras requiere de estos grados de libertad y también de una magnitud de efecto denominada w . La magnitud de efecto puede tomarse, a modo de guía, como chica ($w = 0,1$) mediana ($w = 0,3$) o grande ($w = 0,5$). Estas magnitudes deben tomarse como un criterio de partida, porque en distintos contextos biológicos un efecto chico puede ser muy importante o uno grande definir la variabilidad natural del fenómeno. Lo ideal es explorar distintos tipos de datos y llegar a un abordaje biológico sobre qué sería una magnitud de efecto chica o grande. No obstante, dado que esto no siempre es posible, tener algunos valores de referencia es útil. Manteniendo la nota de cautela recién mencionada, las funciones $ES.w1$ y $ES.w2$ pueden ayudar a definir las magnitudes de efecto, w , para tablas de contingencia de distinto tamaño (número de filas y columnas). Habiendo definido w y los grados de libertad, el número total de individuos, N , que debería utilizarse para construir la tabla puede estimarse en R mediante:

```
pwr.chisq.test (w = .25, df = 4, N = NULL, sig.level = 0.05, power = 0,8)
```

Chi squared power calculation

$w = 0.25$

$N = 190.9646$

$df = 4$

$sig.level = 0.05$

$power = 0.8$

Utilizando los abordajes mencionados en los puntos anteriores y buen sentido biológico es posible presentar un diseño robusto para la mayoría de los estudios de campo y experimentales. Como criterio general, ante la duda siempre se es más conservador en la estimación del número de muestras si asumimos magnitudes de efecto más grandes y probabilidades de detección mayores. No obstante, ser demasiado conservador nos puede llevar a pensar erróneamente que nuestro muestreo no es posible.

La siguiente sección es un poco más avanzada, introduciendo las estimaciones de tamaño de muestra y análisis de poder en modelos lineales generales. En estudios costosos desde un punto de vista logístico, económico y/o ético, una estimación precisa y bien conectada con los objetivos y análisis estadístico es particularmente necesaria. Si su estudio cumple alguna de estas condiciones, les recomendamos especial atención a la siguiente sección.

Modelo Lineal General

En algunas ocasiones podemos requerir estimar el tamaño de muestra para diseños más complejos, como regresiones múltiples, o pruebas similares basadas en la distribución F. Esta familia de pruebas se conoce como modelos lineales generales. Esta distribución se origina en el cociente entre dos proporciones de variación, PV (Cohen, 1988): una proporción PV_S explicada por las fuentes analizadas (tratamientos y variables independientes) y otra PV_E que representa la proporción de Error o varianza residual; y ambas proporciones divididas por sus respectivos grados de libertad (llamémosles u y v respectivamente).

$$F_{u,v} = \frac{PV_S/u}{PV_E/v}$$

De esta forma, F representa un cociente o una razón de cuadrados medios, cada uno basado en sus grados de libertad. Es útil reescribir esta fórmula como (Cohen, 1988):

$$F_{u,v} = \frac{PV_S}{PV_E} \cdot \frac{v}{u}$$

La primera razón es una medida de la *magnitud de efecto*, es decir la proporción de variación en la variable de respuesta explicada por las fuentes incluidas en el modelo. La segunda razón captura la información de los tamaños de muestra y el número de variables requeridas para representar a las fuentes de variación (Cohen, 1988). El índice de magnitud de efecto en este caso se denomina f^2 y se estima entonces como $f^2 = PV_S/PV_E$ (Cohen, 1988). En términos generales, representa la razón entre explicación/ruido, más allá de las diferencias en la estimación entre modelos.

No obstante, se pueden distinguir tres escenarios en los modelos lineales generales para el cálculo de f^2 (Cohen, 1988). *Primero*, un conjunto B de variables es utilizado para explicar la variación en Y (variable independiente), estimando un valor de $R_{Y \cdot B}^2$ su complemento $1 - R_{Y \cdot B}^2$ es la proporción de error residual, evaluándose la hipótesis nula de $R_{Y \cdot B}^2 = 0$. Consecuentemente,

$$f^2 = \frac{R_{Y \cdot B}^2}{1 - R_{Y \cdot B}^2}$$

Un *segundo* grupo de análisis es cuando el efecto del conjunto B de variables se analiza sobre el efecto de otro grupo de variables A, es decir $R_{Y \cdot A, B}^2 - R_{Y \cdot A}^2$. La proporción de varianza de Error en este caso es $1 - R_{Y \cdot A, B}^2$. La hipótesis nula es

que el conjunto de variables B y A no explican más que el conjunto A. La magnitud de efecto se estima como:

$$f^2 = \frac{R_{Y \cdot A, B}^2 - R_{Y \cdot A}^2}{1 - R_{Y \cdot A, B}^2}$$

El tercer escenario es como el anterior, pero considerando que hay un tercer grupo de variables C utilizado para explicar la variación en Y. Consecuentemente, la proporción de variación residual será $1 - R_{Y \cdot A, B, C}^2$.

$$f^2 = \frac{R_{Y \cdot A, B}^2 - R_{Y \cdot A}^2}{1 - R_{Y \cdot A, B, C}^2}$$

En el paquete *pwr* los cálculos anteriores son sencillos, el desafío biológico es fijar magnitudes de efectos chicas, medianas o grandes, a la luz del sistema en que se esté trabajando.

Consideremos dos ejemplos:

pwr.f2.test ($u = 4, v = 20, f2 = .3, sig.level = .05, power = NULL$)

Multiple regression power calculation

$$u = 4$$

$$v = 20$$

$$f2 = 0.3$$

$$\text{sig.level} = 0.05$$

$$\text{power} = 0.47$$

Este análisis indica que, en una regresión múltiple con cuatro variables independientes y 25 observaciones, el poder para detectar el efecto del conjunto de variables es 0,47, es decir, más de la mitad de las veces estaremos fallando, no detectando una relación que, de hecho, existe (*i. e.* Error tipo 2). Consideremos ahora el cálculo del número de muestras cuando queremos evaluar el efecto de cuatro variables sobre una variable independiente (*e. g.* efecto sobre la diversidad de peces del caudal, la productividad, el suelo y la concentración de agroquímicos en un río):

$$\text{pwr.f2.test}(u = 4, v = , f2 = .3, \text{sig.level} = .05, \text{power} = 0.8)$$

Multiple regression power calculation

$$u = 4$$

$$v = 39.8$$

$$f2 = 0.3$$

$$\text{sig.level} = 0.05$$

$$\text{power} = 0.8$$

Para alcanzar un poder de 0,8 deberíamos tener unas 45 unidades muestrales para trabajar con 40 grados de libertad.

Tabla 2. Resumen de cálculos de tamaños muestrales usando R, paquete pwr.

Prueba	Uso	Fórmula	Argumentos
--------	-----	---------	------------

test-t n iguales entre poblaciones	Comparación de media entre dos poblaciones con igual número de observaciones n . Variantes: una población contra un valor de referencia (argumento type = "one.sample"), comparación de dos poblaciones (argumento type = "two.sample"), o dos poblaciones pareadas (argumento type = "paired"),	pwr.t.test (n , sig. level, power, type, alternative)	n : número de observaciones; d : tamaño de efecto; sig.level : probabilidad de error tipo 1; power : probabilidad de no cometer error tipo 2. Uno de los argumentos previos debe definirse como nulo (ej. Power = NULL). La función estimará este parámetro a partir de los anteriores. También deben definirse: type : es el tipo de prueba t a realizar. Debemos definir una de las siguientes opciones: "two.sample", "one.sample", "paired". Para comparaciones entre dos muestras, una muestra o muestreo pareado respectivamente. alternative : "two.sided", "less", "greater" según el tipo de comparación estadística a realizar, prueba de dos colas, menor que, o mayor que respectivamente.
test-t n diferentes entre poblaciones	Comparación de media entre dos poblaciones con diferente n	pwr.t2n.test (n1, n2, d, sig. level, power, alternative)	n1 y n2 : número de observaciones en la primera y segunda población respectivamente. El resto de los argumentos como en el caso anterior.
ANOVA	Comparación de k medias con igual número de observaciones	pwr.anova.test (k, n, f, sig. level, power)	k : número de poblaciones entre las que se comparan las medias, n : número de observaciones en cada población (es igual en todas). f : magnitud de efecto entre medias, es el desvío de las medias entre poblaciones, estandarizado por el desvío interno de cada población (es igual en todas las poblaciones). Resto de los argumentos igual que en las funciones anteriores.
Correlación lineal entre variables	Asociación lineal entre un par de variables	pwr.r.test(n, r, sig.level, power, alternative)	r : coeficiente de correlación lineal. Resto de los argumentos igual que en las funciones anteriores.
Prueba	Uso	Fórmula	Argumentos

Tabla de contingencia	Asociación entre criterios de clasificación o entre distribución de frecuencias	pwr.chisq.test(w, df, N, sig.level, power)	<p>w: magnitud de efecto (puede estimarse con la función ES.w1 o ES.w2).</p> <p>N: número total de individuos que deben utilizarse para construir la tabla de contingencia.</p> <p>df: Grados de libertad (n filas-1)-(n columnas-1).</p> <p>Resto de los argumentos igual que en las funciones anteriores.</p>
Modelo Lineal General	Pruebas basadas en la distribución F	pwr.f2.test(u, v, f2, sig.level, power)	<p>u: grados de libertad asociados a las fuentes de variación (ej. Variables independientes).</p> <p>v: grados de libertad asociados a los datos (n de observaciones - parámetros estimados).</p> <p>f2: magnitud de efecto. Es la proporción de la variación en Y explicada por las fuentes.</p>

Comentarios finales

El uso y abuso de los términos “estadísticamente significativo (o no)” en la literatura científica y técnica, en muchas ocasiones refleja la confusión con la significancia biológica de los resultados obtenidos en una investigación. Como se ha planteado en las últimas secciones, la significancia estadística debe interpretarse conjuntamente con una medida del tamaño del efecto y un intervalo de confianza. Sin embargo, el tamaño del efecto por sí mismo no brinda las bases epistemológicas para tomar decisiones sobre las hipótesis científicas (Queen & Keough, 2002). El uso correcto de la estadística es una herramienta muy poderosa en la investigación de campo y experimental, en particular la que usa animales, pero no es el fin ni el último paso de una investigación. Los resultados siempre deben evaluarse críticamente en función de los objetivos originales y el estado del arte del conocimiento en ese tema.

Dedicar tiempo a pensar todos los pasos de una investigación (e. g. sus requisitos materiales, temporales, de recursos humanos), y a estimar *a priori* los tamaños de muestra necesarios para los objetivos específicos y ajustados a la realidad material, temporal y de recursos humanos de cada investigación, es fundamental para potenciar el impacto científico y disminuir los impactos ambientales y animales.

Referencias

- Arim M, Naya DE. 2003. Pinniped diets inferred from scats: analysis of biases in prey occurrence. *Canadian Journal of Zoology* 81: 67-73.
- Bart J, Fligner M A, Notz W L. 1998. *Sampling and statistical methods for behavioural ecologists*. Cambridge University Press.
- Borcard D, Gillet F, Legendre P. 2011. *Numerical ecology with R*. Springer Science & Business Media.
- Box GEP. 1976. Science and statistics. *Journal of the American Statistical Association* 71: 791-799.
- Cohen J. 1988. *Statistical analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale: Lawrence Erlbaum.
- Gotelli N J, Ellison AM. 2004. *A primer of Ecological Statistics*. Sinauer Associates Inc.
- Hilborn R, Mangel M. 1997. *The ecological detective confronting models with data*. Princeton University Press.
- Jongman R H G, Ter Braak C J F, Van Tongeren O F R. 1995. *Data analysis in community and landscape ecology*. Cambridge University Press.
- Marquet P A, Espinoza G, Abades S R, Ganz A, Rebolledo R. 2017. On the proportional abundance of species: Integrating population genetics and community ecology. *Scientific Reports* 7: 16815.
- Quinn G P, Keough M J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press.
- Shipley B. 2016. *Cause and correlation in biology: a user's guide to path analysis, structural equations and causal inference with R*. Cambridge University Press.
- Sutherland W J. 2006. *Ecological Census techniques*. Cambridge University Press.
- Underwood A J. 1997. *Experiments in Ecology. Their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press.