



Manual de técnicas y  
protocolos para el  
relevamiento y estudio de  
anfibios de Argentina

Laura Pereyra  
Eduardo Etchepare  
Marcos Vaira  
Editores

Manual de técnicas y  
protocolos para el  
relevamiento y estudio de  
anfibios de Argentina  
Parte I

Manual de técnicas y  
protocolos para el  
relevamiento y estudio de  
anfibios de Argentina  
Parte I

Laura C. Pereyra  
Eduardo Etchepare  
Marcos Vaira  
Editores

Universidad Nacional de Jujuy  
2021

Prohibida la reproducción total o parcial del material contenido en esta publicación por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, sin permiso expreso del Editor.

Pereyra, Laura

Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina / Laura Pereyra ; Marcos Vaira ; Eduardo Etchepare ; compilación de Laura Pereyra ; Marcos Vaira ; Eduardo Etchepare. - 1a ed. - San Salvador de Jujuy : Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy - EDIUNJU, 2021.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-721-587-2

I. Manual Técnico. I. Vaira, Marcos. II. Etchepare, Eduardo. III. Título.  
CDD 597.802

Ilustración de Tapa: *Ceratophrys ornata* - Marisel Morales (basada en una fotografía de Gabriela Agostini)



© 2021 Laura Cecilia Pereyra - Eduardo Etchepare - Marcos Vaira

© 2021 Editorial de la Universidad Nacional de Jujuy

Avda. Bolivia 1685 - CP 4600

San Salvador de Jujuy - Pcia. de Jujuy - Argentina

Tel. (0388) 4221511 e-mail: [editorial@unju.edu.ar](mailto:editorial@unju.edu.ar)

2021 1ra Edición

Queda hecho el depósito que previene la Ley 11.723

Impreso en Argentina - Printed in Argentina

ISBN: ISBN 978-950-721-587-2

## CONTENIDOS

<b>Prólogo</b>	<b>9</b>
<b>Presentación del Manual</b>	<b>12</b>
<b>Parte I</b>	
<b>1. Introducción general</b>	<b>17</b>
<b>2. Diseño de muestreo</b>	<b>23</b>
2.1 La pregunta y los objetivos del estudio	24
2.2 ¿Dónde y cuándo? Definiendo la escala espacial y temporal del estudio	25
2.3 ¿Cuánto? Definiendo el tamaño de la muestra	26
2.4 ¿Cómo? Diseños de muestreo estandarizados	27
<b>3. Técnicas de relevamiento de la diversidad de anuros</b>	<b>33</b>
3.1 Relevamiento de oviposturas y embriones	34
3.2 Relevamiento de renacuajos	42
3.3 Relevamiento de postmetamórficos	55
3.4 Monitoreo acústico pasivo (MAP)	72
<b>4. Técnicas de relevamiento y estudios específicos</b>	<b>87</b>
4.1 Identificación y marcado de individuos	88
4.2 Esqueletocronología	112
4.3 Estudios anatómicos	132
4.4 Estudios bioacústicos	142
4.5 Estudios tróficos	164
4.6 Estudios experimentales	185
4.7 Técnicas para la determinación de parámetros termo-fisiológicos	222
4.8 Registro de anomalías macroscópicas y microscópicas en adultos y larvas de anfibios anuros	250

4.9 Registro de parásitos. Protocolos en campo y laboratorio	266
4.10 Registro de hongos. Protocolos en campo y laboratorio	304
4.11 Técnicas para el relevamiento de anfibios en ambientes contaminados	326
4.12 Áreas prioritarias para la conservación	348
4.13 Ciencia ciudadana: más que una herramienta para la recolección de datos	363
<b>5. Procedimientos y preparación de material para incorporar a una colección biológica</b>	<b>374</b>
<b>6. Casos de estudio</b>	<b>403</b>
6.1 Monitoreo de anfibios en los Parques Nacionales Patagónicos: Protocolos <i>ad hoc</i> para especies de vertebrados de valor especial	404
6.2 Especies poco frecuentes, elusivas o desaparecidas: caso de estudio de las ranas marsupiales del género <i>Gastrotheca</i> de Argentina	409
6.3 Gigante de las Pampas. Un programa de Ciencia Ciudadana aplicado a la conservación del Escuerzo ( <i>Ceratophrys ornata</i> )	414

## INDICE DE AUTORES

**Gabriela Agostini.** CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires. Grupo de Estudios sobre Biodiversidad en Agroecosistemas. Ciudad Universitaria, Pabellón II. Güiraldes 2160, C1428EGA, CABA, Argentina y COANA, Conservación de Anfibios en Agroecosistemas, La Plata, Argentina.

**Mauricio S. Akmentins.** Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

**María Luz Arellano.** Sección Herpetología, División Zoología de Vertebrados, CONICET - Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Avenida 122 y 60 s/n, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

**Andrés M. Attademo.** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina y Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.

**Carolina E. Antoniazzi.** Instituto Nacional de Limnología (INAL-CONICET-UNL), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina y Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Santa Fe, Echagüe 7151, Ciudad de Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

**Agustín Bassó.** Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.

**Lidwina Bertrand.** Dpto. de Bioquímica Clínica - CIBICI - CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Lab. 6 - Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina.

**Marcelo F. Bonino.** Laboratorio de Ecología, Biología Evolutiva y Comportamiento de Herpetozoos, INIBIOMA (CONICET—UNComa), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Centro Regional Universitario Bariloche- Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

**Martín Boullhesen.** Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

**Carlina Colussi.** Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.

**Valeria Corbalán.** Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (IADIZA), CCT Mendoza-CONICET, Mendoza, Argentina.

**Lucila M. Curi.** Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (FCV, UNNE), Sargento Cabral 2139, (CP: 3400) Corrientes, Argentina.

**Ana P. Cuzziol Boccioni.** Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Guillermo Debandi.** Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (IADIZA), CCT Mendoza-CONICET, Mendoza, Argentina.

**Camila Deutsch.** CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires. Grupo de Estudios sobre Biodiversidad en Agroecosistemas. Ciudad Universitaria, Pabellón II. Güiraldes 2160, C1428EGA, CABA, Argentina y COANA, Conservación de Anfibios en Agroecosistemas, La Plata, Argentina.

**Judit Dopazo.** Instituto Multidisciplinario sobre Ecosistemas y Desarrollo Sustentable. UNCPBA y Cátedra de Histología, Embriología y Teratología. Departamento de Cs. Biológicas, FCV, UNCPBA, Buenos Aires, Argentina.

**Regina Draghi.** División Zoología Invertebrados, Museo de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Paseo del Bosque, s/n, C.P. 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina. y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Godoy Cruz 2290, C1425FQB, CABA, Argentina.

**Marta I. Duré.** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina y Centro de Ecología Aplicada del Litoral CECOAL-CONICET-UNNE, Ruta 5, km 2.5, W 3400 AMD, Corrientes, Argentina.

**Eduardo Etchepare.** CONICET. Facultad Regional Concordia. Universidad Tecnológica Nacional. Salta 277. Concordia, Entre Ríos, Argentina.

**Elena Gangenova.** Instituto de Biología Subtropical (IBS) (UNaM-CONICET). Centro de Investigaciones del Bosque Atlántico (CEiBA). Misiones, Argentina.

**Romina Ghirardi.** Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo s/n, Santa Fe / Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Santa Fe, Echagüe 7151, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

**Pablo Grenat.** Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional N° 36 - km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina; Instituto de Ciencias de la Tierra, Biodiversidad y Sustentabilidad Ambiental (ICBIA), UNRC-CONICET, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Cynthia Elizabeth González.** Centro de Ecología Aplicada del Litoral (CECOAL), Ruta Provincial Número 5, km 2,5, C.P. 3400, Corrientes, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Godoy Cruz 2290, C1425FQB, CABA, Argentina.

**Luciana Gordillo.** Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía Humanidades y Artes, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Jimena Grosso.** Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

**Atilio Guzmán.** Centro de Investigaciones Ecológicas Subtropicales (CIES), Administración de Parques Nacionales, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina.

**Fabián G. Jara.** Grupo de Ecología de Macroinvertebrados Acuáticos, INIBIOMA (CONICET—UNComa), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Centro Regional Universitario Bariloche- Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

**Rafael C. Lajmanovich.** Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Evelina J. León.** Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Julián Lescano.** Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA), CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

**Javier A. López.** Instituto Nacional de Limnología (INALI: CONICET-UNL). Ciudad Universitaria, Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina y Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina.

**Federico Marangoni.** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste (FACENA: UNNE-CONICET). Avenida Libertad 5460 — CP 3400 Corrientes, Argentina.

**F. Martínez.** Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (IADIZA), CCT Mendoza-CONICET, Mendoza, Argentina.

**Candela Martinuzzi.** Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Claudia E. Moreno.** Centro de Investigaciones Biológicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, Col. Carboneras, 42184, Mineral de la Reforma, Hgo., México.

**Javier Nori.** Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA-CONICET) and Centro de Zoología Aplicada, FCEfyN, Universidad Nacional de Córdoba, Rondeau 798, Córdoba, Argentina.

**Soledad Palomas.** Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

**Hernán Pastore.** Dirección Regional Patagonia Norte, Administración de Parques Nacionales, Bariloche, Argentina.

**Paola M. Peltzer.** Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.



**M. Gabriela Perotti.** Laboratorio de Ecología, Biología Evolutiva y Comportamiento de Herpetozoos, INIBIOMA (CONICET—UNComa), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Centro Regional Universitario Bariloche- Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

**Eduardo Pineda.** Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera Antigua a Coatepec No. 351, El Haya, 91073, Xalapa, Ver., México.

**Laura Cecilia Pereyra.** Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

**María Laura Ponssa.** Unidad Ejecutora Lillo (CONICET-FML). San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.

**Mariana Pueta.** Laboratorio de Ecología, Biología Evolutiva y Comportamiento de Herpetozoos, INIBIOMA (CONICET—UNComa), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Centro Regional Universitario Bariloche- Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina y Departamento de Biología General, (CRUB-UNComa), Centro Regional Universitario Bariloche-Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

**Lorena Quiroga.** Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía Humanidades y Artes, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**María Fernanda Quiroga.** Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

**María José Salica.** Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

**Eduardo Sanabria.** Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía Humanidades y Artes, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, San Juan, Argentina y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Eduardo F. Schaefer.** Instituto de Investigaciones Geohistóricas - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IIGHI, CONICET- UNNE). Av. Castelli 930 (H3504AAO) Resistencia - Chaco - Argentina.

**Carmen Úbeda.** Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Río Negro, Argentina.

**Marcos Vaira.** Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

**Florencia Vera Candiotti.** Unidad Ejecutora Lillo (CONICET-FML). San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.

**Víctor H. Zaracho.** Laboratorio de Herpetología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. Av. Castelli 930 (H3504AAO) Resistencia - Chaco - Argentina.

# Prólogo

Luchar por la conservación de la naturaleza siempre fue una tarea ardua. Hoy es una obra titánica.

Lo que hasta hace unos años podía tomarse como una actividad romántica, casi *hippie*, hoy se ha convertido en la verdadera lucha por la existencia, en un sentido que trasciende al que el Neo-darwinismo diera a esa frase. Ya no es un concepto abstracto para lograr explicar los equilibrios dinámicos que se observaban en una naturaleza primigenia, sino que se trata de lograr la supervivencia de una especie, la nuestra, en las condiciones menos peores que podamos...

Lo que agrava la situación es que, tal como está planteada, la lucha es fratricida, injusta y asimétrica. Con una sociedad globalizada, encuadrada en el paradigma neoliberal de generación de ganancias, todo se ha convertido en mercancía y el afán de generación de lucro impacta sobre un planeta que ya ha superado su capacidad de recuperación. Hoy somos testigos de las señales claras del deterioro, y solo la obstinación en la estupidez hace que quienes tienen la capacidad de decidir miren hacia el lado equivocado.

La lucha es fratricida, porque las mujeres y los hombres que quieren contribuir al mantenimiento de una calidad de vida digna deben batallar contra hombres y mujeres que solo piensan en lucros personales o corporativos. Es injusta, porque los daños producidos al ambiente por la generación de las ganancias para unos pocos los pagamos entre muchos, muchísimos (ellas y ellos incluidos). Y es asimétrica, porque un David, manco y sin honda, debe luchar ante un Goliath en anabólicos.

Siendo irreverente, planteo la imagen del David tullido porque, aunque imprescindibles, esforzarse en llevar a cabo acciones de conservación es tarea poco redituable desde todo punto de vista. Desde la naturaleza, porque el problema de extinción de especies, con la consecuente pérdida de diversidad genética, es tan viejo como la vida misma, y por lo tanto, es un hecho que a la "biota", tomada como abstracción, no la afecta: Nuevas formas de vida, con nueva diversidad genética, reemplazarán a las precedentes, aunque claramente nuestra especie no será testigo de ese reflorecimiento. Desde lo económico, porque conservar implica inversión y lucro cesante (inversión en educación, investigación y políticas públicas, por lo menos, y lucro cesante

porque áreas medianamente prístinas no producen *commodities* exportables). Desde la academia, porque es un tema que mucho se declama pero que en realidad le interesa a pocos; la toma de datos es agobiante y larga, las publicaciones no son adecuadamente valoradas, las revistas donde es posible hacerlo tienen un índice de impacto mucho más bajo que aquellas en las que publicamos nuestros estudios moleculares, más rápidos y menos sacrificados, y por esta razón no es “redituable” para los que comienzan su carrera...

¿Entonces?

Recapitulemos por un instante. Por fijar un comienzo arbitrario, las acciones de conservación como las conocemos hoy se iniciaron en la década de 1960, luego de la publicación de *La Primavera Silenciosa* de Rachel Carlson en el '62. Desde entonces hemos generado un caudal de conocimientos como pocas veces se vio en biología, y sin embargo no hemos logrado los resultados esperados. ¿Es que estábamos tan errados en nuestra tarea, que todo lo que propusimos en los últimos 60 años estaba mal?

No... Creo que nosotros no somos los responsables del fracaso. Sí somos responsables de habernos mantenido en nuestra zona de confort. Los que trabajamos en conservación podemos dilucidar las causas primeras y últimas del problema que estudiamos, y ofrecer soluciones teóricas y prácticas de un valor incalculable, pero nosotros no tenemos ninguna capacidad fáctica para aplicar y hacer cumplir esas soluciones. Quienes deben hacerlo son los funcionarios públicos que se ocupan en legislar y aplicar las leyes, pertenecientes a diversas entidades gubernamentales que, con frecuencia, cambian de políticas con cada cambio de ministro, o como coyunturalmente lo mande el mercado. Nuestro país carece de políticas de estado en este sentido y, como sabemos, la conservación de la naturaleza es una variable inversamente relacionada a la necesidad de lucro. Pero entre nosotros que alertamos y quienes deben aplicar las leyes hay un amplio abismo de ignorancia compartida.

Veamos:

- Generalmente, entre “nosotros” tenemos puntos de vista científicos y filosóficos coincidentes, hablamos utilizando el mismo lenguaje y estamos convencidos de que el problema que analizamos tiene prioridad sobre todo lo demás.

- Por vocación, deformación profesional o simple ignorancia, frecuentemente aislamos los problemas de conservación del complejo contexto social, cultural, político y económico en el que está inmerso nuestro país.
- Generalmente no nos ponemos en lugar de “ellos”, los políticos y economistas, quienes deberían ser nuestros interlocutores válidos, ignoramos sus razones y empleamos códigos de comunicación diferentes. Es más, hasta algo tan básico como el lenguaje con frecuencia es mutuamente incomprensible.
- Por último, partimos de escalas temporales y de necesidades inmediatas diferentes: mientras los biólogos hablamos a escalas generacionales o multigeneracionales, el tiempo de los economistas se termina en el próximo balance, el de los políticos en la siguiente elección y el de muchísima gente de a pie, donde deberíamos encontrar aliados, a fin de mes.

Estoy convencido que este *Manual de técnicas y protocolos para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina* será una *herramienta* invaluable para tender puentes entre las partes en conflicto y, quizás, borrar esa grieta. Tengo la esperanza que será el instrumento adecuado para promover la valorización de las tareas de investigación por parte de los responsables de fijar las políticas académicas. Que servirá a los funcionarios encargados del desarrollo y aplicación de políticas ambientales para dictar mejores normas. Que promoverá la tarea de jóvenes naturalistas, quienes con este texto se verán libres de cometer los errores que alguna vez cometimos por nuestra inexperiencia. Y que, como resultado de todo esto, promueva la conservación de nuestras cecílias, ranas, sapos y escuerzos...

**Esteban O. Lavilla**

UEL/CONICET — SSG, Argentina

Octubre de 2021

# Presentación del Manual

En septiembre del 2005, la Comisión de Supervivencia de las Especies (SSC) de la UICN llevó a cabo una Cumbre para la Conservación de los Anfibios donde especialistas de todo el mundo acordaron que no sólo era necesario documentar las declinaciones y extinciones que estaban ocurriendo, sino que además se debían diseñar y promover respuestas a la crisis global de biodiversidad. El resultado de esta Cumbre derivó en la redacción de un Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios y la recomendación para que los gobiernos, la sociedad civil y la comunidad académica lo adopten e implementen<sup>(1)</sup>. El documento delinea y propone acciones en el campo de la investigación, evaluación y conservación de anfibios sugiriendo que estas acciones sean acompañadas con los consecuentes cambios en las políticas ambientales a nivel internacional y local. Consecuentes con estas acciones, resultaba necesario diseñar una estrategia nacional para la conservación de los anfibios que no sólo evaluara el estado de conservación de la batracofauna de Argentina, sino que también advirtiera y abordara los problemas que actúan negativamente sobre las especies y las líneas de acción que deberían tomarse.

Uno de los problemas que enfrentamos es que el cambio en la biodiversidad puede detectarse o revelarse cuando las respuestas efectivas ya no son factibles o el daño al ecosistema ya es considerable o incluso irreversible hasta provocar la extinción de las especies. Los procesos actuales que permiten las evaluaciones del estado de conservación de las especies a nivel global pueden tomar hasta 10 años o más. Durante este período, muchas especies pueden pasar de ser relativamente abundantes a estar al borde de la extinción o al menos mostrar serias amenazas de una extirpación regional o local. Por lo tanto, resulta crucial que nuestra capacidad para detectar signos tempranos de cambios críticos en la biodiversidad mejore para que las soluciones efectivas se puedan implementar cuando sea necesarias y rápidamente.

A partir del aporte de una red local de especialistas en diversas temáticas se propuso generar un documento base que sirva como guía para el desarrollo de iniciativas de conservación de los anfibios de Argentina, recomendando acciones prioritarias que pudieran servir como lineamientos para el diseño de una estrategia nacional para la conservación de los anfibios de nuestro país. Producto de este proceso, se concretó el Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina<sup>(2)</sup> que reseña un conjunto de 47 acciones que responden a 18 problemáticas identificadas agrupadas en 6 componentes que pueden acometerse a corto y mediano plazo. Una de las acciones propuestas incluyó conformar un grupo de especialistas que por medio de talleres y trabajos en colabo-

ración generen el documento base para la redacción de un manual de técnicas y protocolos estándares para el inventario y monitoreo de poblaciones de anfibios, actualizado con los procedimientos, herramientas y técnicas de análisis más recientes y que se adapte a las condiciones y realidades nacionales.

La comunidad científica dedicada al estudio de los anfibios nucleada en distintos centros de investigación y universidades del país indiscutiblemente ha realizado los mayores aportes al conocimiento de la diversidad y estado de conservación de los anfibios de nuestro país. La experiencia desarrollada a lo largo de varias décadas de estudios le ha permitido conducir la más reciente evaluación del estado de conservación de las especies de anfibios de Argentina<sup>(3)</sup> y realizar numerosos aportes referidos al conocimiento de la biología de las especies y las amenazas que enfrentan para sobrevivir en sus ambientes naturales. Esta extensa trayectoria de investigación en anfibios en Argentina, ha permitido llevar a cabo experimentos y estudios observacionales en una amplia gama de hábitats y regiones diseñados para documentar patrones temporales y espaciales o para desentrañar relaciones causales, interacciones y mecanismos vinculados con la diversidad de especies. Por ende, gran parte de los relevamientos o monitoreos de poblaciones de anfibios en Argentina constituyen parte de estudios desarrollados en uno a varios sitios diseñados para abordar preguntas específicas de investigación que no siempre han estado específicamente vinculadas con la conservación de las especies.

Muchos proyectos individuales o redes colaborativas de investigación invierten considerables recursos en la recolección de datos que incluyen el desarrollo de protocolos específicos para mediciones de campo y el registro de variables ambientales y bióticas relacionadas. Esto conlleva a una diversidad de diseños y protocolos similares, pero no del todo idénticos, y por lo tanto a una diversidad de formas de registrar, medir y cuantificar resultados. Si bien parte de estas diferencias pueden ser motivadas por buenas razones científicas, la selección de protocolos a menudo se basa en tradiciones, costumbres u oportunidades.

Una alternativa a esta situación sería facilitar la coordinación y estandarización de diseños y métodos de muestreo, estimulando el uso de protocolos estandarizados que al mismo tiempo consideren la experiencia de investigadores locales con amplias trayectorias y especializaciones en el estudio de los anfibios de Argentina, transformándose en un recurso disponible para nuevos investigadores que aborden estudios de poblaciones y especies de anfibios.

El objetivo principal de este Manual es el desarrollo de un compendio de técnicas y protocolos estándares para el inventario y monitoreo de poblaciones de anfibios, actualizado con los procedimientos, herramientas y técnicas de análisis más

recientes y adaptado a las condiciones y realidades nacionales. Su contenido está destinado a ayudar a superar algunas de las dificultades que se pueden enfrentar al configurar un programa de inventario y monitoreo para anfibios. Pretendemos brindar una orientación práctica sobre cómo diseñar y llevar a cabo estudios que puedan servir para múltiples aplicaciones más allá de las necesidades de un proyecto particular. Es decir, en este manual tratamos de reunir no solo los aspectos teóricos, sino que compilamos las experiencias y consejos de numerosos especialistas sobre diferentes temáticas vinculadas con estudios de la diversidad, ecología y comportamiento de anfibios que pudieran permitir a los lectores y usuarios de este manual obtener la mayor cantidad y calidad de datos durante la realización de futuros proyectos de investigación relacionados con estas temáticas.

Para ello, nos propusimos proporcionar bases teórico-prácticas sólidas -desde la experiencia de los autores- sobre las técnicas y procedimientos habituales utilizados en estudios que implican el relevamiento y monitoreo de la diversidad de anfibios incluyendo la detección, registro y captura de individuos, la colecta, preservación de especímenes y su correcta incorporación en colecciones biológicas, hasta su uso en experimentos de campo o laboratorio. En una Parte II de este Manual, se incluirán los procedimientos básicos para aplicar las herramientas estadísticas e índices más usuales y recientes para la exploración, descripción y análisis de este tipo de datos. De este modo, a lo largo del manual se pretende ofrecer recomendaciones, procedimientos e instrumentos que permitan recabar la mayor cantidad de información posible en estudios sobre este grupo taxonómico desde sus inicios con la elección de un diseño de muestreo adecuado.

Somos conscientes que todos los protocolos de muestreo, técnicas y métodos de análisis de datos que pueden ser requeridos para un programa de inventario y monitoreo de anfibios o para estudios de campo y laboratorio sobre las especies no pueden ser suficientemente abarcados ni discutidos dentro de un único Manual. Con esta propuesta simplemente intentamos volcar la experiencia recolectada durante años de trabajo, incorporando el suficiente detalle para garantizar el desarrollo de estudios reproducibles y comparables y proporcionando una referencia para futuros proyectos, relevamientos y/o monitoreos enfocados a la conservación de las especies de anfibios de nuestro país. Nuestra intención es que este manual sea ampliamente utilizado y estimule la recopilación de datos estandarizados y la colaboración entre proyectos dentro y entre disciplinas vinculadas al estudio de los anfibios en Argentina. Reconocemos que cada proyecto o investigador puede tener diferentes necesidades específicas y recursos disponibles y por lo tanto, proponemos un conjunto de recomendaciones y prácticas que, de aplicarse más ampliamente, podrían aumentar significativamente la contribución potencial de cada estudio individual a la conservación de los anfibios en Argentina.

Los objetivos principales de este Manual pueden resumirse en:

-Lograr recopilar un conjunto de herramientas estándares para estudios dispersas en diversas fuentes bibliográficas, adaptadas a las características y particularidades de las especies de anfibios presentes en Argentina.

-Ofrecer una visión general de los procedimientos y herramientas asociadas a estos estudios en anfibios y desde la experiencia proponer aquellas mejor soportadas.

-Plantear las posibles adaptaciones y/o mejoras en los procedimientos y técnicas que permitan un mejor desempeño en nuestra región.

-Proponer consejos y experiencias que resulten en mejoras en la aplicación de procedimientos y el uso de las técnicas y por ende sean beneficiosas para la calidad de los estudios en la temática.

-En los casos de estudios donde los especímenes requieran ser sacrificados, resaltar los procedimientos y las técnicas que permitan maximizar el trabajo de campo y de laboratorio para estudios futuros, y de esta forma sacar el mayor provecho del material y/o el dato colectado.

Buena parte de la información contenida en este Manual se refiere centralmente a anfibios de Argentina, pero consideramos que mucha de la información puede tener aplicaciones en muchos países de la región con los que compartimos muchas especies y ambientes. La estructura y el esquema para el Manual fue desarrollado por 53 autores en base a la experiencia; su conocimiento experto y los protocolos existentes en la literatura. Gran parte de las recomendaciones e indicaciones surgen de la práctica habitual en cada disciplina, pero obviamente gran parte de las técnicas y métodos han sido extraídas o adaptadas de numerosas fuentes de consulta por parte de todos los autores. Por esta razón, muchas técnicas especializadas no se discuten en detalle y, en cambio, se proporcionan las referencias específicas que pueden ser consultadas para los detalles más precisos.

1. Gascon, C.; Collins, J.P.; Moore, R.D.; Church, D.R.; McKay, J. & Mendelson III, J. 2007. Amphibian conservation action plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group, Gland, Switzerland and Cambridge.
2. Vaira, M.; Akmentins, M.S. & Lavilla, E.O. 2018. Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 32 (supl. 1): 1-56.
3. Vaira, M.; Akmentins, M.; Attademo, A.; Baldo, D.; Barrasso, D.; Barrionuevo, S.; Basso, N.; Blotto, B.; Cairo, S.; Cajade, R.; Céspedes, J.; Corbalán, V.; Chilote, P.; Duré, M.; Falcione, C.; Ferraro, D.; Gutiérrez, F.; Ingaramo, M.R.; Junges, C.; Lajmanovich, R.; Lescano, J.N.; Marangoni, F.; Martinazzo, L.; Marti, R.; Moreno, L.; Natale, G.S.; Pérez Iglesias, J.; Peltzer, P.; Quiroga, L.; Rosset, S.; Sanabria, E.; Sánchez, L.; Schaefer, E.; Úbeda, C. & Zaracho, V. 2012. Categorización del estado de conservación de los Anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26: 131-159.



Parte

I



## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

**Claudia E. Moreno<sup>1</sup> & Eduardo Pineda<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Centro de Investigaciones Biológicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5, Col. Carboneras, 42184, Mineral de la Reforma, Hgo., México.*

<sup>2</sup> *Red de Biología y Conservación de Vertebrados, Instituto de Ecología, A.C., Carretera Antigua a Coatepec No. 351, El Haya, 91073, Xalapa, Ver., México.*

Una de las grandes incógnitas que prevalecen en la ciencia desde hace al menos dos siglos es ¿cuántas especies hay en la Tierra? Incluso en las últimas décadas, los biólogos continúan perseverando en el objetivo de esclarecer no solo cuántas especies conocemos, sino también cuántas desconocemos<sup>(1,2)</sup>. Más allá de la curiosidad científica detrás de esta incógnita, la crisis actual de la biodiversidad hace que la generación de conocimiento se vuelva más urgente que nunca. Ante la acelerada extinción de especies por los grandes cambios ambientales, resulta de vital importancia generar información básica sobre la diversidad biológica para apuntalar decisiones de manejo y de conservación adecuadas. A la fecha, las estimaciones sobre el número total de especies en el planeta aún no convergen, y se mantienen en un amplio intervalo que va desde 2 millones hasta 50 millones de especies<sup>(2)</sup>. Esta gran incertidumbre debe reducirse mediante aproximaciones novedosas, como la incorporación de métodos de aprendizaje adaptativo para guiar los procesos de investigación de los distintos grupos biológicos<sup>(3)</sup>.

Los anfibios fueron el primer grupo de vertebrados que habitaron los ecosistemas terrestres y los taxa modernos de este grupo tuvieron sus orígenes en el Mesozoico Temprano, hace aproximadamente 250 millones de años<sup>(4)</sup>. Actualmente se conocen poco más de 8.300 especies<sup>(5,6)</sup> y nuevas especies se descubren constantemente, no solo en regiones remotas del planeta, también en áreas urbanas de países como China, Estados Unidos o India. Se ha llegado a plantear que podrían existir entre 10.000 y 15.000 especies de anfibios en el planeta<sup>(7)</sup>, por lo que el conocimiento básico sobre la diversidad de este grupo aún está lejos de completarse.

El papel de los anfibios en un ecosistema es fundamental, ya que formando parte de hábitats terrestres y hábitats acuáticos, pueden actuar como enlace entre ambos tipos de hábitats. Además, en algunos ambientes pueden ser los vertebrados terrestres más abundantes. En el ecosistema son componentes importantes en el flujo de energía, ya que, como ectotermos, la energía incorporada es convertida eficientemente en biomasa, que después se vuelve disponible para niveles tróficos superiores<sup>(8,9)</sup>. En su etapa larval se alimentan de algas, detritos y de otros animales, y a su vez son presa de diversos animales carnívoros. En su etapa adulta son depredadores principalmente de invertebrados, por lo que actúan como controladores de insectos nocivos para el ser humano, incluyendo aquellos transmisores de enfermedades, y de plagas de cultivos agrícolas. El control biológico, así como la dispersión de algunas semillas, el reciclaje de nutrientes y la bioturbación, son algunos de los servicios ecosistémicos de regulación y soporte que proveen los anfibios<sup>(10)</sup>. Varias especies de anfibios son usadas como modelo de laboratorio para explorar temas sobre la regeneración de extremidades y tejidos, el

transplante de órganos, la biología del desarrollo, el tratamiento de úlceras gástricas y en toxicología, por citar algunos<sup>(11)</sup>. Un dato que ilustra la relevancia de los anfibios en la medicina es que alrededor del 10% de todos los Premios Nobel en la disciplina han resultado de estudios con especies de este grupo biológico<sup>(12)</sup>.

A finales de la década de 1980, la noticia sobre la declinación de poblaciones de diversas especies anfibios alrededor del mundo<sup>(13,14)</sup> puso de manifiesto la necesidad urgente de incrementar los estudios sobre la diversidad de este grupo biológico, mediante el uso de métodos estandarizados que nos permitieran comparar espacial y temporalmente lo que le ocurre a una amplia diversidad de especies y en diferentes contextos ambientales. Hoy se considera a la declinación de los anfibios como una evidencia de la sexta extinción masiva<sup>(15)</sup>, que ejemplifica la crisis ambiental global que enfrentamos y es una muestra de lo que está ocurriendo en el Antropoceno. Actualmente el 41% de las especies de anfibios están en riesgo de extinción alto, y se ha declarado la extinción de 35 especies<sup>(16)</sup>, aunque se estima que este último número podría alcanzar las 200 especies. Dada la tendencia en las tasas de extinción, se considera que al menos el 7% de las especies de anfibios podrían perderse en los siguientes 100 años<sup>(17)</sup>. La principal amenaza para este grupo es la destrucción de su hábitat. La pérdida de bosques y selvas, a consecuencia de la expansión de tierras para el ganado, la agricultura, la producción de madera y la urbanización, amenaza al 60% de las especies de anfibios, especialmente a las especies con distribución restringida y con desarrollo directo, o cuyas larvas se desarrollan en hábitats lóticos<sup>(18)</sup>. Otros factores como las especies invasoras, la contaminación, el aumento en la temperatura atmosférica y la reducción en la precipitación por efecto del cambio global, así como enfermedades infecciosas como la quitridiomycosis, causada por los hongos *Batrachochytrium dendrobatidis* y *B. salamandrivorans*, representan serias amenazas para la existencia de los anfibios<sup>(4,15,17,19)</sup>.

Uno de los retos más grandes para contrarrestar los efectos del Antropoceno y detener la pérdida de biodiversidad, consiste en definir cómo deben distribuirse los limitados recursos disponibles para sufragar los esfuerzos de conservación, pues es evidente que el financiamiento actual destinado a la conservación biológica dista mucho de ser suficiente<sup>(20)</sup>. Sin embargo, cualquiera que sea el esquema de metas, prioridades y objetivos de conservación que se planteen, es innegable el papel crítico de la ciencia en la conservación de la biodiversidad, tanto por ser fuente de conocimiento, como por constituir la metodología necesaria para generar nuevo conocimiento. La actividad científica puede integrar conocimientos, objetivos y valores para definir los caminos a seguir a favor de la conservación biológica<sup>(21)</sup>. Indudablemente,

existe una clara necesidad de incrementar el conocimiento científico para definir cuáles son los factores que provocan la pérdida de la biodiversidad, particularmente la diversidad de anfibios, y de qué manera actúan estos factores bajo distintos contextos y escalas, así como para formular respuestas adecuadas de manejo para el aprovechamiento, restauración y protección de los ambientes naturales.

El presente manual de técnicas y protocolos estándares para el relevamiento y estudio de anfibios de Argentina, al igual que otras obras que compilan métodos para el estudio de los anfibios en diferentes contextos<sup>(22, 23)</sup>, representa una gran herramienta para acelerar y fortalecer la investigación científica sobre este grupo. La presente obra constituye un compendio de las bases teóricas necesarias para iniciar estudios de campo sobre anfibios, sintetiza procedimientos prácticos aplicables a diferentes objetivos de investigación y presenta ejemplos recientes de trabajos realizados en Argentina. Entre sus grandes ventajas destaca la participación de un nutrido grupo de especialistas que participan como autores, brindando no solo su conocimiento, sino quizá más importante, su experiencia directa. Otra ventaja es que no solamente describe los métodos para estudiar anfibios, sino que incluye temas de amplio interés, más allá del grupo biológico. Por ejemplo, la inclusión de capítulos sobre diseño de muestreo, registro y análisis de variables ambientales asociadas, podrán ser de gran ayuda, incluso para quienes trabajen con otros grupos biológicos. Una ventaja más es la inclusión de técnicas novedosas tanto para el registro de información como para el análisis de datos, tales como los estudios sobre ecología térmica, bioacústicos y de ciencia ciudadana, o el registro de rasgos funcionales. Estas características hacen que el manual sea una fuente de referencia actualizada y aplicable a distintos contextos.

Aunque la génesis misma de esta obra ocurrió en Argentina, y se concibió como una herramienta para el estudio de los anfibios en este país, sin duda será una fuente de consulta general para cualquier hispanoparlante interesado en estudiar anfibios. Constituye una obra de interés para estudiantes tanto de pregrado como de posgrado, técnicos, guardaparques, profesores, investigadores y ciudadanos aficionados a la observación y registro de datos de anfibios. Se espera que este manual inspire, motive y promueva la investigación científica sobre la diversidad de anfibios, por un lado, y por otro que apoye el desarrollo de estudios que contribuyan a identificar o definir métodos agrícolas, ganaderos o prácticas urbanas que permitan el mantenimiento de la biodiversidad en paisajes modificados por el humano.

## Bibliografía

1. Mora, C.; Tittensor, D.P.; Adl, S.; Simpson, A.G.B. & Worm, B. 2011. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biology* 9: e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>.
2. Scheffers, B.R.; Joppa, L.N.; Pimm, S.L. & Laurance, W.F. 2012. What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.008>.
3. Caley, M.J.; Fisher, R. & Mengersen, K. 2014. Global species richness estimates have not converged. *Trends in Ecology & Evolution* 29: 187-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.02.002>.
4. Wake, D.B. & Koo, M. S. 2018. Primer Amphibians. *Current Biology* 28: R1237-R1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.028>.
5. Frost, D.R. 2021. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.1. American Museum of Natural History, New York, USA. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>. Disponible en: <https://amphibiaworld.amnh.org/index.php>. Consultado el 26 de abril de 2021.
6. AmphibiaWeb. 2021. AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California. Disponible en: <http://www.amphibiaweb.org/>. Consultado el 26 de abril de 2021.
7. Ohler, A. & Dubois, A. 2009. Threatened amphibians. *Alytes* 27: 25-37.
8. Whiles, M.R.; Lips, K.R.; Pringle, C.M.; Kilham, S.S.; Bixby, R.J.; Brenes, R.; Connelly, S.; Colon-Gaud, J.C.; Hunte-Brown, M.; Huryn, A.C.; Montgomery, C. & Peterson, S. 2006. The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4: 27-34. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2006\)004\[0027:TEOAPD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2006)004[0027:TEOAPD]2.0.CO;2).
9. Wells, K.D. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press. Chicago, IL.
10. Valencia-Aguilar, A.; Cortés-Gómez, A.M. & Ruiz-Agudelo, C.A. 2013. Ecosystem services provided by amphibians and reptiles in Neotropical ecosystems, *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management* 9: 257-272. <https://doi.org/10.1080/21513732.2013.821168>.
11. Stebbins, R.C. & Cohen, N.W. 1995. *A natural history of amphibians*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
12. Pettward, J. 2018. Why conserve amphibians? An interview with Phil Bishop. Synchronicity Earth. <https://www.synchronicityearth.org/why-conserve-amphibians-an-interview-with-phil-bishop/>
13. Wyman, R.L. 1990. What's happening to the amphibians? *Conservation Biology* 4: 350-352.
14. Wake, D.B. 1991. Declining amphibian populations. *Science* 253: 860.
15. Wake, D.B. & Vredenburg, V.T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (Supplement 1): 11466-11473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801921105>.
16. IUCN, 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. <<https://www.iucnredlist.org>>
17. Alroy, J. 2015. Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 13003-13008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508681112>.
18. Nowakowski, A.J.; Thompson, M.E.; Donnelly, M.A. & Todd, B.D. 2017. Amphibian sensitivity to habitat modification is associated with population trends and species traits. *Global Ecology and Biogeography* 26: 700-712. <https://doi.org/10.1111/geb.12571>.
19. Pabijan, M.; Palomar, G.; Antunes, B.; Antoľ, W.; Zieliński, P. & Babik, W. 2020. Evolutionary principles guiding amphibian conservation. *Evolutionary Applications* 13: 857-878. <https://doi.org/10.1111/eva.12940>.
20. Lovejoy, T.E. 2020. Biodiversity conservation targets: how to allocate resources. *One Earth* 2: 415-416. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.05.003>.
21. Evans, M.C. 2021. Re-conceptualizing the role (s) of science in biodiversity conservation. *Environmental Conservation*, en prensa. <https://doi.org/10.1017/S0376892921000114>.
22. Heyer, W.R.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, L.A.C. & Foster, M.S. (eds.). 1994.

Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard methods for amphibians. Smithsonian Institute Press, Washington, D.C.

23. Angulo A.; Rueda-Almonacid, J.V.; Rodríguez-Mahecha, J.V. & La Marca, E. (eds.). 2006. Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N° 2. Panamericana Formas e Impresos S.A., Bogotá D.C.

## 2. EL DISEÑO DE MUESTREO

**Laura C. Pereyra & Marcos Vaira**

*Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy,  
CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.*



El diseño de investigación es una guía que ayuda a organizar una investigación utilizando una metodología particular. Tanto en los estudios de campo como de laboratorio representa una parte fundamental, pudiendo ser esta etapa la que determine el éxito de un estudio. Cuando se presenta de manera adecuada, el estudio aumentará las chances de desarrollarse apropiadamente, obteniendo la información para la que fue diseñado. Por el contrario, si su elaboración no tiene la atención necesaria por parte del investigador, los resultados obtenidos pueden ser incompletos o erróneos, no logrando responder la pregunta que dio origen a la investigación.

Toda investigación científica comienza con una observación y el posterior planteo de una pregunta. De esta manera, las preguntas de investigación se traducen en modelos que describen de manera adecuada la observación y en diseños metodológicos específicos que permiten responderlas. El diseño del muestreo es el vínculo entre la pregunta de investigación y los resultados obtenidos. Si se toma en cuenta que cualquier observación es siempre incompleta y que la objetividad de la misma puede llegar a depender de la experiencia del observador y del proceso que se utilice para registrarla, se puede decir que el diseño de investigación elegido determina la confiabilidad de la respuesta obtenida y, en otros términos, su validez.

La realización de un censo de los individuos de una comunidad o de las variables de interés dentro de toda la población en estudio puede ser una tarea imposible para la mayoría de los sistemas biológicos, volviéndolo algo inviable. Es por esto que generalmente se utiliza una muestra representativa, es decir se selecciona parte de la población para observar y estimar algún parámetro de la misma, por ejemplo: la ocurrencia de una especie, la diversidad de especies en un área, sus abundancias relativas, entre otros.

El diseño de muestreo comprende tres preguntas frecuentes: dónde y cuándo tomar la muestra, cuántas muestras registrar y cómo se deben recolectar los datos en tiempo y espacio. Si bien se enfatiza la necesidad de consultar manuales específicos de diseño de investigación para planificar adecuadamente un estudio y algunas publicaciones muy recomendadas sobre el diseño de investigación en biología (ej:<sup>1-13</sup>), se indican a continuación algunas sugerencias elementales a tener en cuenta al abordar estos tres puntos cuando se afrontan estudios de relevamiento de la diversidad, relevamientos específicos y/o monitoreo de poblaciones de anfibios.

## 2.1 La pregunta y los objetivos del estudio

Tanto el planteo de la pregunta de investigación, como de los objetivos derivados de la misma, es un comienzo obligado en cualquier investigación. Su

importancia radica en que ambos permitirán organizar el estudio, definiendo el enfoque y la escala (espacial y/o temporal) en la que se desarrollará el mismo, delimitándolo para ser abordado de manera realista, así como los límites y alcances de sus resultados.

Resulta importante enfatizar que previo al planteo de la pregunta, es necesario familiarizarse con la bibliografía disponible sobre el tema de estudio, no sólo para contar con un cuerpo de información básico, sino también para evitar redundar en estudios ya realizados, evaluar posibles problemas con el diseño y maximizar el alcance y aplicación de los resultados obtenidos.

En base a la pregunta se podrá generar la hipótesis de trabajo que representa una explicación tentativa a esa pregunta, basada generalmente en información previa. Las hipótesis deben ser planteadas de forma clara y concisa como afirmaciones con algún grado de generalidad.

Junto con la hipótesis es aconsejable plantear una o varias predicciones, las cuales son consecuencias “directamente observables”. La ausencia de predicciones puede impedir comprender, apoyar o criticar las deducciones que se desprendan de los resultados. Mientras que las hipótesis no pueden medirse directamente, las predicciones pueden ser cuantificables y enunciarse en las variables que se van a medir<sup>(4)</sup>. Aunque resulta importante recomendar el enunciado de hipótesis y sus predicciones asociadas cuando se decide aplicar el método hipotético deductivo, es necesario mencionar que existen posiciones que cuestionan el uso de hipótesis en estudios de ecología (ver<sup>14</sup>).

Los objetivos deben ser mensurables e inequívocos y no deben dejar margen para concluir si al finalizar el estudio se han logrado cumplir. La condición de “objetivos mensurables” implica que, además de descriptivos, deberán ser cuantificables y susceptibles de evaluarse estadísticamente.

## 2.2 ¿Dónde y cuándo? Definiendo la escala espacial y temporal del estudio

La percepción del sistema biológico bajo estudio está inevitablemente sesgada o incompleta, determinada principalmente por la escala, tanto espacial como temporal a la que se ha decidido realizar la observación. Es por esto que definir el tamaño del área y la duración del período en el que se desarrollará el estudio, permitirá obtener evidencia suficiente para cumplir con los objetivos propuestos y por ende discutir de manera adecuada el significado de los resultados.

Entonces, como primer paso, se debe definir la población en estudio considerando el área geográfica y/o poblaciones o subpoblaciones específicas a

las que aplica el estudio. Por ejemplo, un estudio de la abundancia de una especie a gran escala (en todo su rango de distribución) puede indicar un aumento poblacional, pero el mismo estudio a escalas más pequeñas (en poblaciones localizadas) puede indicar poblaciones estables o en disminución. Se debe además definir la duración del estudio (meses, estaciones, años o generaciones). Los parámetros de una población (como tamaño o tasa de crecimiento) varían con el tiempo como resultado de factores intrínsecos y extrínsecos, por lo tanto, los resultados de parámetros de una población obtenidos en un sólo momento en el tiempo generalmente resultan evidencia insuficiente para determinar el estado de una o varias poblaciones de la especie. El período de tiempo elegido debe adecuarse, en lo posible, a la biología y fenología de la especie.

### 2.3 ¿Cuánto? Definiendo el tamaño de la muestra

Una muestra representativa de la población necesita incluir un número adecuado de réplicas de las unidades experimentales (individuos, poblaciones, especies, parches de hábitat, entre otros) para así asegurar que la información obtenida a partir de la misma permita una estimación razonable. Como parte de un diseño adecuado, el tamaño de la muestra requerida para el estudio resulta esencial. Por lo tanto, incluir el procedimiento de muestreo y el tamaño de muestra necesarios para medir adecuadamente la/s variable/s de interés garantizará que se recopilen el tipo, la calidad y la cantidad de datos apropiados para estimar si los parámetros que se van a medir cumplen las condiciones de objetivos mensurables que reducen la ambigüedad y subjetividad en la interpretación de los resultados.

Por un lado, es necesario que el tamaño de la muestra sea lo suficientemente grande como para ser representativa de la población en estudio, pero no tan grande como para sacrificar demasiados individuos o desperdiciar tiempo y recursos al tomar o seleccionar la muestra. ¿Cuál debería ser entonces el tamaño de la muestra para que sea adecuada? Una respuesta concreta es que va a depender principalmente de la variabilidad que presentan los elementos de interés que componen la población en estudio, mientras más alta sea esta variabilidad más grande deberá ser la muestra elegida. Aquí aparecen dos conceptos que deberán ser tomados en cuenta al momento de definir el tamaño muestral: el error tolerable y el nivel de confianza que se espera de las estimaciones. El error puede provenir de varias fuentes, pudiendo estar relacionados directamente con el diseño de muestreo o ser errores aleatorios generados por variaciones impredecibles e inevitables, errores de medición, problemas de detectabilidad y/o errores debido a una variabilidad sistemá-

tica y no planificada de los datos (el error sistemático). Ambos tipos de error, tanto los relacionados con el diseño como aquellos no relacionados al diseño, pueden llevar a un registro sesgado de la variable respuesta, resultando en conclusiones erróneas. Una ejecución exitosa del estudio requerirá que el investigador evite introducir errores sistemáticos y minimice los errores aleatorios.

Pueden surgir distintos inconvenientes al momento de definir el tamaño óptimo de una muestra. Por un lado, la necesidad de conocer la varianza poblacional previo a la toma de datos puede sortearse realizando un estudio piloto previo o utilizando información de investigaciones previas sobre la varianza presente en los elementos de interés. Existen varias formas de estimar el tamaño óptimo de la muestra. Existen numerosos materiales de consulta que explican de manera clara la estimación de tamaño muestral, entre ellos se pueden mencionar los trabajos de Rao<sup>(15)</sup>, Thompson<sup>(16)</sup> y Krebs<sup>(17)</sup>.

## 2.4 ¿Cómo? Diseños de muestreo estandarizados

Como los sistemas generalmente no son homogéneos, ya sea en el espacio o en el tiempo, es necesario no sólo contar con un número grande de unidades experimentales, sino también planificar cómo se van a ubicar las mismas. Los tipos de muestreo permiten definir cómo se van a asignar las unidades experimentales en el espacio bajo las distintas condiciones del estudio, cuántas réplicas de estas unidades se van a tomar en cuenta y la secuencia espacial y temporal en la que se realizarán las mediciones.

### Muestreo no probabilístico

En la práctica, es común que los investigadores elijan las ubicaciones de las unidades de muestreo de forma arbitraria u oportunista al momento en que se realiza el muestreo, socavando la validez de la inferencia estadística. En este tipo de muestreo, las unidades experimentales se seleccionan en base a un criterio que no es al azar por lo que los individuos no presentan la misma posibilidad de ser incluidos en el estudio.

Este tipo de relevamiento puede ser más fácil y económico, pero presenta altos riesgos de sesgo en los datos registrados, y no se debe pretender hacer inferencias que se extiendan a todas las poblaciones de una especie.

La selección de muestras de forma oportunista o por conveniencia no necesariamente debe considerarse un procedimiento erróneo. Se pueden elegir

deliberadamente ubicaciones específicas de muestreo debido a características particulares donde el sesgo de muestreo es explícito y deliberado. Este tipo de métodos pueden ser útiles para estudios exploratorios, en los cuales no se pretende poner a prueba una hipótesis sino, por ejemplo, generar conocimiento detallado de un fenómeno específico. Existen otras situaciones donde puede ser realmente difícil obtener muestras aleatorias donde la distribución espacial del hábitat objetivo es desconocida, que suele ser el caso de estudios en sitios remotos o poco conocidos. Así, el marco espacial del sitio de muestreo no puede definirse específicamente y las ubicaciones de las unidades de muestreo no pueden seleccionarse antes del evento de muestreo.

Es aconsejable evitar en lo posible este tipo de muestreo. Actualmente existen numerosas herramientas y rutinas en paquetes estadísticos que, combinando la manipulación de datos espaciales con herramientas SIG (en forma de líneas o polígonos), permiten seleccionar las ubicaciones de las unidades de muestreo mediante una rutina que aplica un proceso aleatorio a elección del investigador (al azar, sistemático o en bloque) y repetible. Estos métodos se describen en forma general más abajo pero serán desarrollados con más detalle en la **Parte II** del Manual.

## Muestreo probabilístico

**Muestreo aleatorio simple (Figura 2.4.1A).** Es el tipo de muestreo más simple, y consiste en considerar que todos los elementos de la población tienen la misma probabilidad de ser registrados. De esta manera se genera una aleatorización de todos los factores no controlados por el investigador y que pueden influir en los resultados. Se evita además introducir sesgo en el estudio y la dependencia entre observaciones.

Esta técnica es apropiada en el caso de que el área o la población relevada sean homogéneas o no se tenga información que indique lo contrario. Una dificultad en aplicar este tipo de muestreo a estudios de relevamiento de especies se relaciona con la dificultad que puede existir en llegar a los sitios designados de manera aleatoria para el estudio, ya sea porque no son accesibles o a su topografía, lo cual limita la elección de los mismos a aquellos que son fácilmente accesibles, siendo la presencia de caminos o senderos en el área lo que generalmente determina qué unidades espaciales pueden seleccionarse. Esto genera un sesgo en la selección de los sitios de relevamiento.

**Muestreo aleatorio en bloques o estratificado (Figura 2.4.1B).** Se recomienda emplear este método cuando el área o la población relevada no son homogéneas, lo que podría generar distintas condiciones entre sectores o elementos

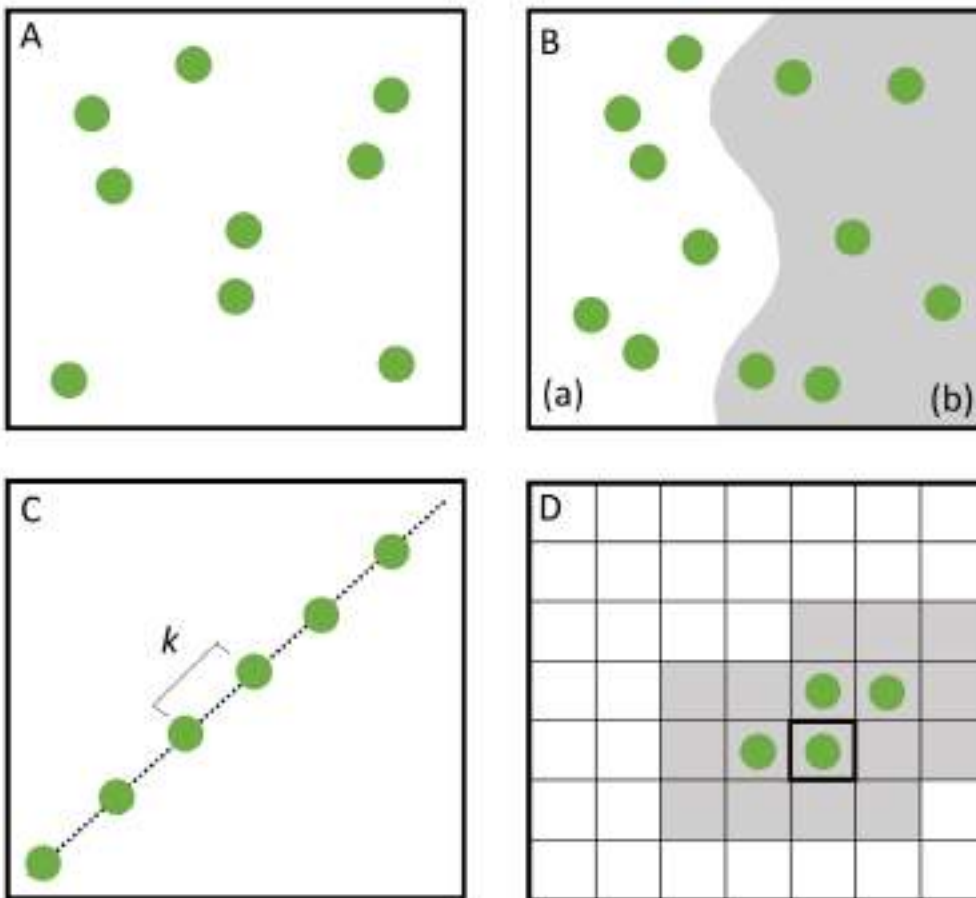
que pueden afectar a nuestras unidades experimentales. La heterogeneidad en las condiciones a las que estarán expuestas las réplicas puede controlarse dividiéndolas en estratos (bloques), los cuales presentarán características lo más parecidas posibles, y dentro de los cuales se realizará la selección aleatoria de las unidades experimentales. Por ejemplo, si pretendemos relevar y comparar la diversidad de anfibios (nuestra variable respuesta) en dos sitios con distinta altitud (nuestro factor de interés) donde ambos sitios presentan zonas de bosque primario y zonas de bosque secundario con áreas abiertas. Si bien estas posibles diferencias en la estructura de los bosques pueden no ser de interés en el estudio, es probable asumir que presenten un efecto sobre la diversidad de especies registradas en las réplicas presentes en una u otra zona, por lo que resulta recomendable definir cada zona como bloques. Dentro de cada bloque (bosque primario o bosque secundario con áreas abiertas) se elegirá al azar a las unidades experimentales. De esta manera, este tipo de diseño convierte a la variabilidad sistemática no planificada en variabilidad sistemática planificada.

Estos métodos de dos etapas, implica dividir el marco de muestreo en estratos más pequeños dentro de los cuales se toman luego muestras aleatorias simples.

**Muestreo sistemático (Figura 2.4.1C).** Se recomienda emplear este método cuando se sospecha que la presencia de una réplica afecta alguna propiedad de las réplicas más cercanas o cuando la población es bastante irregular respecto al carácter que estamos estudiando, por lo que se establece un criterio previo para la selección de las réplicas de la muestra. De esta manera, se parte de un punto al azar y se plantea una distancia mínima  $k$ , la cual puede ser espacial o temporal, para seleccionar los siguientes sitios de muestreo. Por ejemplo, seleccionamos un cuerpo de agua al azar y planteamos una distancia mínima entre los cuerpos de agua a relevar considerando que la distancia de dispersión de los individuos podría permitir que se muevan desde un cuerpo de agua a otro.

Este muestreo puede aplicarse también en casos donde la variable independiente de interés varía de forma gradual a lo largo del espacio. De esta manera, se fija la medición de las variables de interés (tanto de respuesta como independientes) a intervalos regulares a lo largo de una transecta que recorra este gradiente de condiciones. Es necesario identificar si existe algún patrón regular del ambiente o de los organismos en las unidades experimentales para evitar sesgo.

**Muestreo adaptativo (Figura 2.4.1D).** Se plantea adaptar el criterio de selección de unidades experimentales a medida que se va realizando el relevamiento, basado en los resultados preliminares que se vayan obteniendo. De



**Figura 2.4.1.** Ejemplos de diseño de muestreo probabilístico que indican cómo se asignarían las unidades experimentales (círculos verdes) en el espacio. **A. Muestreo aleatorio simple.** **B. Muestreo aleatorio en bloques o estratificado.** Las letras (a) y (b) indican distintos tipos de usos o situaciones (bloques) como bosque primario y secundario. **C. Muestreo sistemático.** La letra  $k$  corresponde a la distancia mínima definida desde el primer punto elegido al azar hasta el siguiente punto seleccionado. **D. Muestreo adaptativo.** El recuadro más grueso corresponde a la unidad experimental inicial. Gráficos: L. Pereyra.

esta manera, la selección de los sitios a relevar va a depender de los valores de la variable respuesta observados durante el estudio, lo que puede llevar en muchos casos a resultados más efectivos. Por ejemplo, para una especie rara con una distribución agrupada en su abundancia, el uso de un método de muestreo aleatorio puede resultar en la selección de sitios para realizar los relevamientos que resulten vacíos. En estos casos, es aconsejable utilizar un muestreo adaptativo donde se considera una unidad experimental inicial; cuando se logra detectar individuos en una de estas unidades, se comienza a incluir en el estudio áreas cercanas a ésta unidad, proceso que se repetirá hasta que se obtenga una muestra representativa de ésta población agrupada.

Este tipo de muestreo reduce el tiempo y costo de los relevamientos y puede ayudar a aumentar la efectividad del muestreo al aumentar el número de observaciones mejorando la precisión de los resultados para un tamaño muestral dado. Es posible que se destine mucho esfuerzo para detectar la unidad muestral que presente la ocurrencia de la especie, y una vez localizada, el

criterio para seleccionar las unidades experimentales vecinas a aquella que presenta registros debe ser evaluado dado que un criterio erróneo afectará la efectividad del esfuerzo de muestreo.

### **Caja 2.1 - Detectabilidad**

*La detectabilidad se refiere a la probabilidad de registrar individuos cuando éstos se encuentran dentro de la unidad experimental analizada, y es una fuente importante de variación necesaria de incluir en todo protocolo de relevamiento. La detectabilidad de cada especie varía tanto entre ambientes con distintas características como en distintos momentos de la temporada reproductiva. Esta diferencia puede estar asociada también a la abundancia de individuos presentes en la unidad experimental, individuos de especies abundantes tienen una probabilidad de detección mayor que los individuos de especies raras.*

*La detectabilidad de las especies de anfibios puede variar además entre observadores con distinta experiencia y debido a cambios en las condiciones climáticas. Una de las posibles soluciones más recomendadas es adaptar el protocolo de muestreo tomando en cuenta la detectabilidad de las distintas especies y planificar así el diseño en el tiempo y el espacio adecuado. Otra forma de controlar la detectabilidad imperfecta de ciertas especies es mediante repeticiones espaciales o temporales de los relevamientos. Se pueden diseñar varias visitas a un mismo sitio, o definir varios puntos de relevamiento dentro de una misma unidad experimental. Debe tenerse especial precaución que estas repeticiones son consideradas pseudoréplicas<sup>(18)</sup>. Se espera entonces que al aumentar las visitas a los sitios relevados (o el número de sitios relevados dentro de la misma unidad experimental) aumente la probabilidad de registro de las especies más elusivas.*

*La variación temporal de la detectabilidad de las especies puede relacionarse a la fenología de actividad que presenta cada especie, tanto referida al patrón del comportamiento estacional como a la hora del día en la que cada especie se encuentra más activa. De esta manera, es recomendable que el investigador tenga un conocimiento previo del ensamble de anuros que potencialmente va a encontrar en los sitios y ajustar los relevamientos para abarcar la temporada de actividad de todas las especies, así como los horarios del día en los que se realizarán estos relevamientos. Del mismo modo es recomendable tener información sobre el tipo de hábitat que frecuentan o utilizan las especies, a fin de incluir todos los ambientes posibles o existentes en la unidad experimental.*



## Bibliografía

1. Balzarini, M.; Di Rienzo, J.; Tablada, M.; Gonzalez, L.; Bruno, C.; Córdoba, M.; Robledo, W. & Casanoves, F. 2015. Estadística y Biometría: Ilustraciones del Uso de Infostat en Problemas de Agronomía. - 2a ed. - Brujas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba .
2. Boitani, L. & Fuller, T. (eds.). 2000. Research Techniques in Animal Ecology: Controversies and Consequences. Columbia University Press, Nueva York.
3. Dutilleul, P. 1993. Spatial heterogeneity and the design of ecological field experiments. *Ecology* 74: 1646-1658.
4. Farji-Brener, A.G. 2003. Uso correcto, parcial e incorrecto de los términos “hipótesis” y “predicciones” en ecología. *Ecología Austral* 13: 223-227.
5. Gallego, R.S. 2003. Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos (Vol. 4). Publicacions de la Universitat Jaume I, España.
6. 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.
7. Hinkelmann, K. & Kempthorne, O. 1994. Design and Analysis of Experiments (Vol. 1). Wiley, New York.
8. Kuehl, R.O. & Kuehl, R.O. 2000. Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis. Duxbury Press, California.
9. Krebs, C.J. 2010. Case Studies and Ecological Understanding. *En*: Billick, I. & Brice M. (eds.). The Ecology of Place: Contributions of Place-based Research to Ecological Understanding. University of Chicago Press. Chicago.
10. Li, Z. & Berger, V.W. 2005. Adaptive Sampling. Encyclopedia of Statistics in Behavioral Science. Wiley Online Library, Londres.
11. Magurran, A.E. & McGill, B.J. (eds.). 2011. Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment. Oxford University Press, Oxford.
12. Martínez Abraín, A.; Conesa, D. & Oro, D. 2008. Herramientas estadísticas para resolver contrastes de hipótesis con contenido biológico: su uso en ecología del siglo XXI. *Acta Zoológica* 24: 201-220.
13. Smith, A.N.; Anderson, M.J. & Pawley, M.D. 2017. Could ecologists be more random? Straightforward alternatives to haphazard spatial sampling. *Ecography* 40: 1251-1255.
14. Feinsinger, P. 2013. Metodologías de investigación en ecología aplicada y básica: ¿Cuál estoy siguiendo, y por qué? *Revista Chilena de Historia Natural* 86: 385-402.
15. Rao, P.S. 2000. Sampling Methodologies with Applications. Chapman and Hall/CRC, Londres.
16. Thompson, K.S. 2012. Sampling. Simon Fraser University, Third Edition John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, New Jersey.
17. Krebs, C.J. 2014. Ecological Methodology, 3rd ed. Addison-Wesley Educational Publishers, Inc., Massachusetts.
18. Hurlbert, S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* 54: 187-211.

**3. TÉCNICAS DE RELEVAMIENTO DE LA  
DIVERSIDAD DE ANUROS**

## 3.1 RELEVAMIENTO DE OVIPOSTURAS Y EMBRIONES

**Jimena Grosso<sup>1</sup>, María José Salica<sup>2</sup> & Florencia Vera Candiotti<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.*

<sup>2</sup> *Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.*

<sup>3</sup> *Unidad Ejecutora Lillo (CONICET-FML). San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.*

## Colecta de Oviposturas

Los anuros son conocidos por presentar una gran diversidad de modos reproductivos con variaciones en los sitios de oviposición, la estructura de la puesta y en el desarrollo embrionario y larval. Duellman y Trueb<sup>(1)</sup> categorizaron 29 modos reproductivos y más tarde Haddad y Prado<sup>(2)</sup> añadieron siete nuevos modos que, junto a algunas modificaciones de la clasificación original, ascendieron el número total a 39. Wells<sup>(3)</sup> discute este esquema de clasificación y revisa la diversidad de modos reproductivos. Por su parte, el esquema de Altig y McDiarmid<sup>(4)</sup> resume la diversidad morfológica y evolución de huevos y puestas en anfibios en general. Para Argentina, Lavilla y Rougés<sup>(5)</sup> realizaron una primera síntesis de los tipos de reproducción y desarrollo, reportando un total de 16 modos reproductivos. Esta diversidad es una fuente de información comparativamente poco explorada, y de ahí la importancia de estandarizar conceptos y métodos para la preservación de las oviposturas.

A grandes rasgos es posible hallar oviposturas de ranas en el agua (flotando, sumergidas, sujetas a vegetación o rocas, etc.) o fuera de ella, ya sea en la tierra (entre la hojarasca, en cuevas, en grietas entre rocas) o en hojas y troncos de la vegetación. La capacidad de localización de las puestas está estrechamente relacionada al conocimiento previo de la especie y la experiencia del colector, ya que a diferencia de los exuberantes nidos de espuma en charcos de leptodactylidos, algunas especies oviponen en sitios muy particulares, como los pequeños cuerpos de agua en las axilas de bromelias que utilizan algunos bufónidos, o bien sus oviposiciones son muy crípticas, como los huevos pigmentados que liberan los ceratophryidos en el fondo de charcas lodosas.

Las salidas de campo deben realizarse idealmente luego de precipitaciones abundantes, ya que éstas disparan la actividad reproductiva para la mayor parte de las especies y, por ende, incrementan la probabilidad de encontrar amplexos u oviposiciones recientes. La colecta de puestas dependerá de las características de éstas pero en general resulta simple: en bolsas capturando el agua circundante en oviposiciones acuáticas, con herramientas como palas para puestas terrestres o tijeras para puestas suspendidas en la vegetación. Por el contrario, la identificación en campo de la puesta es complicada—cuando no fue posible observar la oviposición— y en general sólo se puede realizar hasta cierto nivel. Por ejemplo, muchas especies de *Rhinella* depositan ristras de huevos pigmentados o especies de *Phyllomedusa* construyen “cucuruchos” en hojas. La asignación inequívoca requiere de datos de distribución geográfica, identificación de adultos presentes o cantando y preservación de huevos o embriones en alcohol 90% para posterior secuenciación

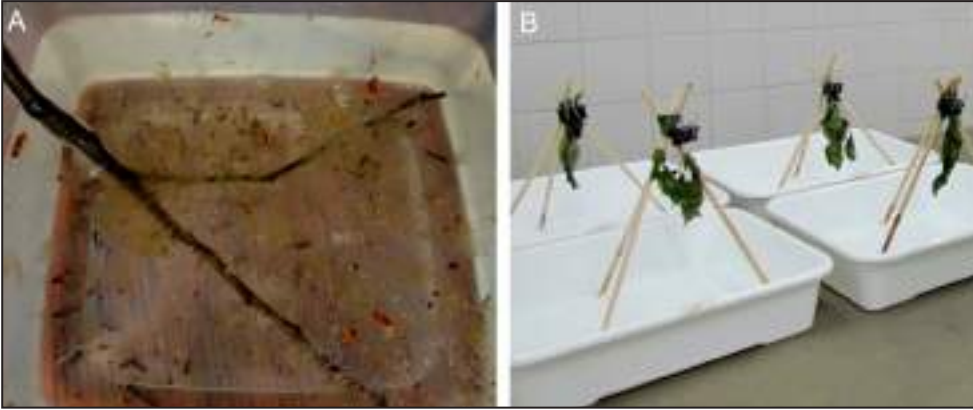
de ADN. Adicionalmente es recomendable registrar datos sobre el ambiente circundante, como temperatura, características del sustrato, altura si se trata de vegetación o presencia de depredadores, entre otros.

Otra posibilidad para la obtención de oviposturas es disponer de adultos sexualmente activos, inducidos hormonalmente en el laboratorio o bien amplexados al momento de la colecta. Los procedimientos para la inducción hormonal exceden los objetivos de esta sección, pero se encuentran detallados en guías prácticas para *Xenopus* que pueden adaptarse a otras especies<sup>(6,7)</sup>. Al encontrar un amplexo en campo la colecta manual delicada de los ejemplares puede realizarse sin que se desarme el abrazo nupcial. Idealmente se aparta la pareja en un recinto oscuro con agua del lugar durante toda la noche. La duración del amplexo puede variar pero en general durante la mañana siguiente ya es posible observar la ovipostura, la cual debe ser separada de los adultos lo más pronto posible.

### **Mantenimiento de las oviposturas**

Si bien las oviposturas de algunas especies requieren cuidados especiales, en general el mantenimiento en laboratorio puede hacerse sin demasiados inconvenientes. Se recomienda colocar las puestas en recipientes individuales y etiquetados: para oviposturas acuáticas se aconseja la utilización de peceras u otros contenedores con agua del lugar o de clorinada que debe ser renovada frecuentemente (**Figura 3.1.1A**); para oviposturas terrestres la utilización de terrarios que se mantengan húmedos (para muchas especies es eventualmente necesario inundar las puestas para inducir la eclosión); y para nidos que se suspenden en la vegetación el armado de trípodes con varillas de madera en donde se cuelguen sobre bandejas con agua<sup>(8)</sup>, o la utilización de recipientes altos con agua en el fondo en cuyas paredes se adhieran las hojas que envuelven a estas puestas (**Figura 3.1.1B**).

En este sentido, se debe intentar emular las condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo en que se encontraban las oviposturas. La temperatura de cría tiene influencia en la velocidad de desarrollo, por lo que dependiendo del tipo de estudio se podría necesitar mantenerla constante y dentro del rango vital de la especie. La humedad es un factor clave, por lo que se recomienda la aspersión suave y frecuente de agua con atomizadores manuales y la no exposición directa al sol, para evitar la desecación de la puesta. Por último, dado que durante el periodo intracapsular los embriones se desarrollan a expensas del vitelo, no es necesario el aditamento de fuentes externas de alimentación.



**Figura 3.1.1.** Mantenimiento de oviposturas. (A) Detalle de puesta acuática de *Atelognathus nitoi*. (B) Detalle de nidos de *Phyllomedusa sauvagii* dispuestos en trípodes en el interior de bandejas con agua. Fotos: D. A. Barrasso y M. J. Salica.

### Series de desarrollo para embriones

Los anuros han sido históricamente elegidos por los embriólogos dadas sus considerables ventajas para llevar a cabo estudios de desarrollo, fundamentalmente desde una aproximación experimental, bioquímica y molecular en particular en el género *Xenopus*. Sin embargo, el estudio de otras especies (excluyendo las especies modelo) y a gran escala taxonómica, implica un desafío principalmente por su escasez en colecciones herpetológicas.

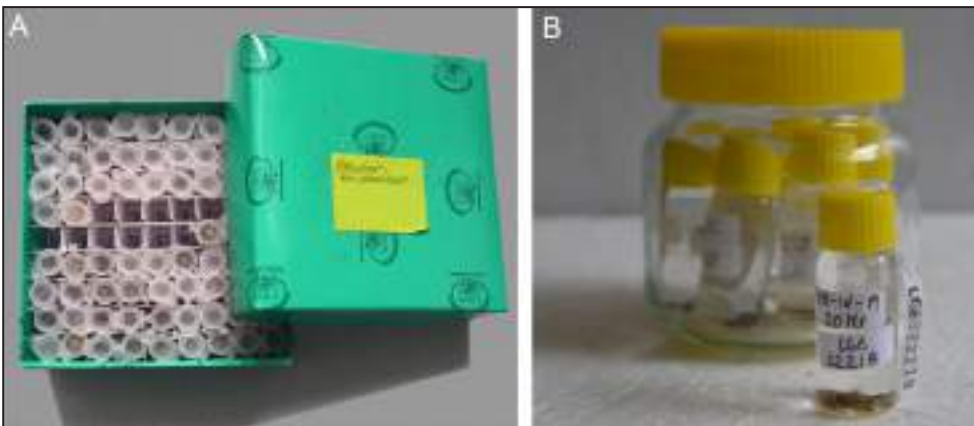
Esta etapa temprana se caracteriza por presentar grandes cambios morfológicos en un corto periodo de tiempo, por lo que la metodología más utilizada para estudios embriológicos incluye la obtención de series de desarrollo. Una serie de desarrollo es un tipo de muestreo que requiere fijar periódicamente embriones de una misma puesta, lo que implica que muchas veces deba realizarse *in situ*, en el campo y entre viajes de campaña.

Para la obtención de series de desarrollo se extraen los huevos o embriones con pipetas Pasteur y si es necesario ayudándose con pinzas o tijeras, cuando la gelatina es muy densa. Los embriones se sobreenestesian con benzocaína diluida o alternativamente colocando los embriones libres directamente sobre hielo (ver **Sección 5**) y deben preservarse cada vez en recipientes individuales en general con formol 4—10%. La frecuencia de extracción y el número de embriones varían dependiendo de la duración del desarrollo de la especie, del tamaño de la puesta y por supuesto del tipo de estudio proyectado. Cuanto más rápido se desarrollen los embriones, más frecuentemente habrá que realizar fijaciones, para asegurarse especímenes que cambien gradualmente, sin dejar de considerar la cantidad de huevos disponibles para evitar truncar tempranamente las series. Para estudios de secuencia de desarrollo de caracteres embrionarios, en general resulta adecuada la fijación cada 6—8 hs, pero para estudios de la variación de forma (que ocurre muy

rápida en especial durante el inicio del desarrollo) o que enfatizan estadios muy tempranos, el intervalo debe acortarse a 4 hs. Para estudios más puntuales (e.g., explorar el desarrollo de un carácter individual) es recomendable realizar series piloto donde primero se establezca el rango de tiempo en que ocurre el cambio de interés. Los intervalos pueden ir modificándose a medida que el desarrollo avanza, y ya en estadios larvales las fijaciones pueden ser diarias. Estudios propios en diversos clados y sus detalles particulares para cada uno, pueden consultarse en los trabajos correspondientes<sup>(9-22)</sup>.

Un punto interesante es que si bien los huevos y embriones no eclosionados suelen fijarse completos, es decir con las capas de gelatina que los envuelven, una alternativa es primero liberarlos de ellas. Esta práctica es frecuente para estudios moleculares, pero también es recomendable en el caso de embriones con desarrollos intracapsulares largos, en los cuales el aumento de tamaño del espécimen dentro del huevo redundaría en que se enrolle típicamente y una vez fijado esta característica obstaculiza la observación. La eliminación de las membranas se efectúa químicamente con cisteína 2%<sup>(6,7)</sup> o mecánicamente mediante el uso de pinzas finas, teniendo especial cuidado en no dañar al embrión.

La elección del fijador está en directa relación con el tipo de análisis proyectado y se recomienda prever esto con antelación a la colecta para evitar el desperdicio de material. El formol preserva muy bien los tejidos por lo que es el elegido para análisis morfológicos clásicos e incluso funciona muy bien para observación con microscopía electrónica de barrido. Para estudios de histología y ultraestructura (microscopía electrónica de transmisión) se recomienda fijar en glutaraldehído o solución Bouin<sup>(23)</sup>, mientras que para estudios de marcadores génicos se sugiere el fijador MEMFA<sup>(6)</sup>.



**Figura 3.1.2.** Etiquetado y preservación de series de desarrollo. (A) Caja grillada con eppendorf rotulados individualmente. (B) Tubo individual con datos asociados y frasco con serie completa. Foto: J. Grosso.

En cuanto a la preservación de los embriones, aunque es posible confeccionar series de desarrollo ordenando los embriones según su morfología, es decir colocando todos los embriones fijados periódicamente en un único recipiente, es mucho más informativo registrar el dato de tiempo en que cada lote fue fijado (**Figura 3.1.2**). Para esto, la mejor opción son los microtubos de polipropileno de 1,5 ml o recipientes similares ubicados en cajas grilladas o frascos donde se asegure que permanezcan verticales. Cada tubo debe estar completamente rotulado, incluyendo especie, día y horario de fijación y fijador utilizado, en etiquetas de papel adheridas externamente al tubo y escritas con lápiz o estilógrafo indeleble. Es recomendable no rotular directamente los tubos, porque su uso en grandes cantidades suele implicar la reutilización y en tal caso la información anterior puede provocar confusiones.

Para identificar el momento del desarrollo embrionario son útiles como referencia las tablas de desarrollo normal que delimitan estadios a partir de eventos estructurales o fisiológicos. Para especies con desarrollo exotrófico, es decir especies cuyas larvas se alimentan de manera activa, la más utilizada es la tabla de Gosner<sup>(24)</sup> y para especies con desarrollo endotrófico, es decir, que se desarrollan a expensas del vitelo (y que en general presentan una morfología modificada, con reducción o ausencia de caracteres embrionarios y larvales típicos de las especies exotróficas), la más difundida es la de Townsend y Stewart<sup>(25)</sup>. Existen tablas específicas más adecuadas para ciertos casos (e.g., una revisión en Fabrezi et al.<sup>26)</sup>, y el propósito del estudio de series embrionarias implica registrar las variaciones particulares de los grupos analizados, construyendo nuevas tablas por especie. Para la caracterización morfológica de los embriones hay disponibles numerosos trabajos donde se describen comparativamente las estructuras exclusivas de esta etapa (e.g., branquias externas, glándulas adhesivas y de eclosión y ciliación epidérmica), y de las estructuras larvales que comienzan a desarrollarse en este periodo (e.g., líneas laterales y disco oral). Los trabajos de Nokhbatol-foghahai y colaboradores<sup>(27-33)</sup> son pioneros en sintetizar las variaciones en varios caracteres y en numerosos clados de anuros. Para fauna neotropical, aportes propios añaden la utilización de estos caracteres en análisis filogenéticos<sup>(14,15, 21)</sup>.

## Bibliografía

1. Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. New York.
2. Haddad, C.F.B. & Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55: 207-217.
3. Wells, K.D. 2010. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press.
4. Altig, R. & McDiarmid R.W. 2007. Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. *Herpetological Monographs* 21: 1-32.



5. Lavilla, E.O. & Rougés, M. 1992. Reproducción y Desarrollo de Anuros Argentinos. Asociación Herpetológica Argentina. Serie Divulgación 5. La Plata, Argentina.
6. Sive, H.; Grainger, R.M. & Harland, R.M. 2000. Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
7. Wlizla, M.; McNamara, S. & Horb, M.E. 2018. Generation and care of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* embryos: 19-32. *En*: Vleminckx, K. (ed.). *Xenopus*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, NY.
8. Downie, J.R.; Nokhbatolfighahai, M.; Bruce, D.; Smith, J.M.; Orthmann-Brask, N. & MacDonald-Allan, I. 2013. Nest structure, incubation and hatching in the Trinidadian leaf-frog *Phyllomedusa trinitatis* (Anura: Hylidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 12: 13-32.
9. Catalano, S.; Segura, V. & Vera Candioti, M.F. 2019. PASOS: a method for the phylogenetic analysis of shape ontogenies. *Cladistics*: 1-17.
10. Goldberg, J. & Vera Candioti, M.F. 2015. A tale of a tail: variation during the early ontogeny of *Haddadus binotatus* (Brachycephaloidea: Craugastoridae) as compared to other direct-developers. *Journal of Herpetology* 49: 479-484.
11. Goldberg, J.; Vera Candioti, M.F. & Akmentins, M.S. 2012. Direct-developing frogs: ontogeny of *Oreobates barituensis* (Anura: Terrarana) and the development of a novel trait. *Amphibia-Reptilia* 33: 239-250.
12. Goldberg, J.; Taucce Pedro, P.P.G.; Quinzio, S.I.; Haddad C.F.B. & Vera Candioti, M.F. 2020. Increasing our knowledge on direct-developing frogs: the ontogeny of *Ischnocnema henselii* (Anura: Brachycephalidae). *Zoologischer Anzeiger* 284: 78-87.
13. Grosso, J.; Baldo, D. & Vera Candioti, M.F. 2017. Heterochronic changes during embryonic development of neotropical foam nesting frogs (genus *Leptodactylus*). *Zoologischer Anzeiger* 266: 35-49.
14. Grosso, J.; Baldo, D.; Cardozo, D.; Kolenc, F.; Borteiro, C.; Rodrigues de Oliveira, M.I.; Bonino, M.F.; Barrasso, D.A. & Vera Candioti M.F. 2019. Early ontogeny and sequence heterochronies in Leiuperinae frogs (Anura: Leptodactylidae). *PLoS ONE* 14: e0218733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218733>.
15. Grosso, J.; Baldo, D.; Salgado Costa, C.; Natale, G.S. & Vera Candioti, M.F. 2019. Embryonic ontogeny of three species of Horned Frogs, with a review of early development in Ceratophryidae. *Journal of Morphology* 281: 17-32.
16. Navarro Acosta, G. & Vera Candioti, M.F. 2017. Alometría y heterocronías durante el desarrollo temprano de cinco especies de *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología* 31: 11-22.
17. Navarro Acosta, G.; Baldo, D.; Kolenc, F.; Borteiro, C. & Vera Candioti, M.F. 2017. Embryonic morphology in five species of *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Herpetological Journal* 26: 121-132.
18. Salica, M.J.; Haad, M.B.; Vera Candioti, M.F. & Faivovich, J. 2011. Early development of two species of *Phyllomedusa* (Anura: Phyllomedusinae). *Salamandra* 47: 144-154.
19. Vera Candioti, M.F.; Haad, B.; Baldo, D.; Kolenc, F.; Borteiro, C. & Altig, R. 2011a. Different pathways are involved in the early development of the transient oral apparatus in anuran tadpoles (Anura: Leiuperidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 330-345.
20. Vera Candioti, M.F.; Nuñez, J.J. & Ubeda, C. 2011b. Development of the nidicolous tadpoles of *Eupsophus emiliopugini* (Anura: Cycloramphidae) until metamorphosis, with comments on systematic relationships of the species and its endotrophic developmental mode. *Acta Zoologica* 92: 27-45.
21. Vera Candioti M.F.; Grosso, J.; Haad, B.; Pereyra, M.O.; Bornschein, M.R.; Borteiro, C.; Costa, P.; Kolenc, F.; Pie, M.R.; Proaño, B.; Ron, S.; Stanescu, F. & Baldo, D. 2016. Structural and heterochronic variations during the early ontogeny in toads (Anura: Bufonidae). *Herpetological Monographs* 30: 79-118.
22. Vera Candioti M.F.; Taboada, C.; Salica, M.J.; Baldo, D.; Faivovich, J. & Baêta, D. 2017. The adhesive glands during embryogenesis in some species of Phyllomedusinae (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology* 51: 119-129.
23. Kiernan, J.A. 2008. Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice. 4th edition. Butterworth-Heinemann, Oxford.
24. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
25. Townsend, D.S. & Stewart, M.M. 1985. Direct development in *Eleutherodactylus coqui*

- (Anura: Leptodactylidae): a staging table. *Copeia* 1985: 423-436.
26. Fabrezi, M., Quinzio, S.I., Cruz, J.C., Chuliver Pereyra, M., Manzano, A.S., Abdala, V.S.L., Ponssa, M.L., Prieto, Y. & Goldberg, F.J. 2017. Forma, tamaño y tiempo en la ontogenia de anfibios y reptiles. *Cuadernos de Herpetologia* 31: 103-126.
  27. Nokhbatolfoghahai, M. & Downie, J.R. 2005. Larval cement gland of frogs: comparative development and morphology. *Journal of Morphology* 263: 270-283.
  28. Nokhbatolfoghahai, M. & Downie, J.R. 2007. Amphibian hatching gland cells: Pattern and distribution in anurans. *Tissue and Cell* 39: 225-240.
  29. Nokhbatolfoghahai, M. & Downie, J.R. 2008. The external gills of anuran amphibians: comparative morphology and ultrastructure. *Journal of Morphology* 269: 1197-1213.
  30. Nokhbatolfoghahai, M.; Downie, J.R. & Atherton, L. 2013. External gill motility and striated muscle presence in the embryos of anuran amphibians. *Tissue and Cell* 45: 61-67.
  31. Nokhbatolfoghahai, M.; Downie, J.R. & Ogilvy, V. 2006. Surface ciliation on anuran amphibian larvae: persistence to late stages in some species but not others. *Journal of Morphology* 267: 1248-1256.
  32. Nokhbatolfoghahai, M.; Downie, J.R.; Clelland, A.K. & Rennison, K. 2005. The surface ciliation of anuran amphibian embryos and early larvae: patterns, timing differences and functions. *Journal of Natural History* 39: 887-929.
  33. Nokhbatolfoghahai, M.; Pollock, C.J. & Downie, J.R. 2015. Oviposition and development in the glass frog *Hyalinobatrachium orientale* (Anura: Centrolenidae). *Phyllomedusa* 14: 3-17.

## 3.2 RELEVAMIENTO DE RENACUAJOS

**Carolina E. Antoniazzi<sup>1,2</sup>, María Fernanda Quiroga<sup>3</sup> & Marcos Vaira<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET-UNL), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Santa Fe, Echagüe 7151, Ciudad de Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

<sup>3</sup> Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

La etapa de renacuajo comienza luego de la etapa embrionaria, cuando el organismo es capaz de alimentarse y nadar libremente en el agua y para el caso de estudios ecológicos y de desarrollo, se los considera como tales cuando las branquias externas son reabsorbidas (estadio 25 de Gosner<sup>1</sup>), hasta la erupción de los miembros anteriores en el clímax metamórfico (estadio 41 de Gosner<sup>1</sup>)<sup>(2)</sup>.

Los renacuajos son a menudo más abundantes y detectables que los postmetamórficos en muchos ambientes acuáticos, dado que existen muchas especies elusivas con temporadas de reproducción muy cortas o esporádicas, pero que presentan períodos larvales largos y por lo tanto podrán ser detectadas a pesar de no encontrar ningún ejemplar adulto durante toda la temporada reproductiva. Por lo tanto, seleccionar métodos adecuados para su detección puede incrementar sustancialmente el número total de especies registradas en un estudio.

Sin embargo, el relevamiento de renacuajos puede enfrentar una serie de dificultades que tienen que considerarse cuidadosamente para definir la técnica adecuada de relevamiento para esta etapa del ciclo de vida de una especie.

Las técnicas de relevamiento de renacuajos seleccionadas para el estudio no estarán determinadas exclusivamente por el objetivo planteado por el investigador sino también por las características del ambiente a relevar y el conjunto de especies que se espera encontrar. Al igual que en el caso de los postmetamórficos (ver próxima sección), el ambiente en el que se encuentren los renacuajos determinará en gran parte el método de relevamiento adecuado. Se debe tener en cuenta que la etapa larval de algunas especies puede extenderse por pocos días (entre 7 a 15 días, por ejemplo) y en muchos casos la duración de esta etapa depende de las condiciones del ambiente donde esté inserto el cuerpo de agua. Una especie en un cuerpo de agua puede estar temporalmente ausente en un año o período de muestreo debido a condiciones climáticas, temporadas de reproducción muy variables o comportamiento de reproducción poco frecuente e impredecible. Por otra parte, la especie puede estar presente y no ser detectada con la técnica de registro elegida. Es posible que las larvas no sean visibles o no se capturen fácilmente en cuerpos de agua muy turbios por el exceso de partículas en suspensión, mucha velocidad de la corriente de agua; vegetación muy densa o sustratos que permiten que los renacuajos se camuflen o escondan (rocas, sedimento fino, arena, hojas, detritos, etc.). Estas características influirán tanto en la probabilidad de captura de individuos como en la tasa de detección de cada especie presente<sup>(3,4)</sup>.

Por lo tanto, un régimen de muestreo eficaz requiere una comprensión básica del conjunto de especies esperadas, las características de sus historia de

vida y las condiciones de los cuerpos de agua requeridas para la reproducción. Si no se cuenta con esta información, resulta recomendable utilizar una combinación de métodos y técnicas de registro que consideren todas estas posibles fuentes de variación en la probabilidad de detección y captura.

Las tasas de detección de las larvas en general disminuyen al aumentar el volumen y la superficie de un cuerpo de agua y se relaciona claramente con el comportamiento de cada especie o tipo de renacuajo<sup>(3)</sup>. Generalmente, los cuerpos de agua grandes tienen una mayor complejidad estructural, lo que permite alojar poblaciones más grandes de renacuajos y que pueden refugiarse mejor, creando un sesgo que disminuye la probabilidad de detección o la afecta de forma diferente según la especie en estudio. Por lo tanto, considerar este sesgo (es decir, calcular las tasas de detección para cada especie) resulta recomendable cuando se pretende evaluar la abundancia de renacuajos de un cuerpo de agua, además de registrar la riqueza de especies locales. Este vínculo entre abundancia y tasa de detección es relativamente obvio, pero con frecuencia se ignora y puede potencialmente confundir los resultados de programas de monitoreo destinados a comparar el estado poblacional de una o varias especies en diferentes sitios o en diferentes tiempos<sup>(5)</sup>.

El ciclo de duración de un cuerpo de agua (hidroperíodo) depende fuertemente del tipo de ambiente y el tipo de uso del suelo. Por ejemplo, los cuerpos de agua formados en campos de uso agrícola, en ambientes urbanos o periurbanos generalmente son efímeros, ya que están más expuestos a condiciones de alto tránsito y sin cobertura arbórea. En ambientes agrícolas, la presencia de renacuajos de muchas de las especies generalmente coincide con la época de mayor laboreo de los cultivos, lo que genera una gran cantidad de charcos producto del tránsito de maquinarias, vehículos pesados o apertura de canales de riego o caminos (**Figura 3.2.1**). En ambientes de uso ganadero, se deben tener en cuenta los “potreros” que se llenan de agua por un corto tiempo, y son ampliamente usados por muchas especies de desarrollo rápido como *Pleurodema* spp. o *Physalaemus* spp. (M. F. Quiroga, obs. personal). Por esto resulta importante realizar muestreos reiterados a intervalos cortos de tiempo y relevar la mayor cantidad posible de cuerpos de agua detectados. Realizar un registro previo de la ubicación de sitios con la potencialidad de acumular agua antes de la temporada reproductiva para relevarlos luego de las primeras precipitaciones de la temporada incrementa, sobre todo, la posibilidad de detección de especies de reproducción explosiva y con períodos larvales muy cortos.

En todos los casos, los muestreos de los cuerpos de agua realizados en forma infrecuente o en una baja cantidad de réplicas pueden no resultar suficientes ni siquiera para detectar la riqueza local de anfibios, ya que la presencia



**Figura 3.2.1.** Charcos efímeros en un ambiente rural de la Selva de las Yungas producto del tránsito de maquinaria pesada. Foto: M. Vaira.

de muchas especies es espacial y temporalmente variable. Se ha demostrado que la distribución de las larvas en un mismo cuerpo de agua está fuertemente relacionada con la profundidad del agua, la presencia o ausencia de depredadores, la presencia de vegetación acuática, el tipo de sustrato, el contenido de oxígeno disuelto y la temperatura<sup>(6)</sup>. Asimismo, los renacuajos de muchas especies raramente se encuentran simultáneamente en todos los cuerpos de agua disponibles aún en áreas muy pequeñas.

Las técnicas de relevamiento de renacuajos pueden clasificarse por la forma de detección o captura de los individuos que requiere o no la presencia física del investigador. La mayoría de las técnicas de muestreo enumeradas a continuación son adecuadas principalmente para ambientes acuáticos (cuerpos de agua lóticos y lénticos de tamaños diversos) y unas pocas se aplican a hábitats terrestres donde algunas especies desarrollan buena parte o la totalidad de sus estadios larvales (especies cuyas larvas se desarrollan en hojas o ramas de árboles y en cuevas o depresiones en el suelo)<sup>(4)</sup>.

Estas técnicas de detección y/o captura pueden ser utilizadas complementariamente en caso que el objetivo sea conocer la riqueza de especies, pero sus métodos deben ser considerados de manera diferente en caso de pretender estimar la abundancia de las especies, ya que cada uno tiene sus supuestos y limitaciones particulares (ver métodos de estandarización más abajo).

## Técnicas de Muestreo Activo

### a) Redes

Las redes para capturas activas se utilizan para perseguir o dirigir a los renacuajos para que caigan o ingresen a la misma donde quedan atrapados. Una alternativa es la red de cerco, tiro o arrastre. Con ella se pueden efectuar recorridas o pases en diferentes sectores del cuerpo de agua y constan de un paño de altura y largo variable que en la parte central posee una prolongación conocida como copo o calderín, que sirve para retener a los renacuajos que quedan enredados en el interior de este apéndice. Las dimensiones de estas redes dependerán del cuerpo de agua que se requiere relevar. Una dificultad general con estas redes es la imposibilidad de recorrer o “barrer” la mayor parte del cuerpo de agua si existe mucha vegetación enraizada o piedras de grandes dimensiones que pueden impedir transitar con la red<sup>(7)</sup>.

Para cuerpos de agua de dimensiones y profundidades medianas a pequeñas que no pueden ser recorridos con redes de arrastre o para aquellos difíciles de “barrer” con una red de grandes dimensiones pueden utilizarse redes de inmersión de diferentes formas y tamaños.

Las más comunes son las redes de mano o copo. Se recomienda que tengan forma de estribo, rectangulares o en forma de letra D a fin de que su parte recta sirva para ajustarse bien al fondo, donde suelen ubicarse muchas especies. El diseño del copo puede variar de tamaño según las dimensiones del cuerpo de agua a estudiar. Por ejemplo, el diseño del copo podría ser un marco metálico (hierro o aluminio) de 60 x 40 cm, con malla de 3 mm de apertura, manipulado mediante un mango de 1,20 m de longitud (**Figura 3.2.2**)<sup>(8-10)</sup>.

El muestreo con redes de inmersión puede complicarse por factores como el tamaño del cuerpo de agua, la profundidad del agua, la cantidad y tipos de sustratos o vegetación y la distribución de especies por microhábitat<sup>(7)</sup>. Las diferencias en las técnicas de barrido aplicadas por diferentes investigadores para un mismo sitio o en diferentes momentos también podrían influir en los registros de diversidad y abundancia.

Para ambientes lénticos de llanura aluvial que comúnmente habitan los renacuajos (**Figura 3.2.3**)<sup>(10)</sup>, la técnica de barrido presenta una buena eficacia en sitios vegetados de mediano tamaño, con menos de 1 m de profundidad, alta complejidad estructural y difícil acceso<sup>(11)</sup>. En ambientes de 30 cm a 1 m de profundidad, se recomienda muestrear dos microhábitats que difieran en profundidad y distancia a la costa a modo de cubrir la mayor diversidad de renacuajos. Este diseño se corresponde con un muestreo aleatorio estratificado por profundidad y tipo de microhábitat recomendado para lagunas



**Figura 3.2.2.** Diseño de red de mano o copo de marco metálico en forma de letra D para captura de renacuajos. Foto: C. Antoniazzi.

y grandes cuerpos de agua permanentes. Por ejemplo, se recomienda seleccionar microhábitats someros, que incluyan los sitios de menos de 30 cm de profundidad a distancias de 0 a 2 m de la costa y microhábitats profundos representados por sitios a más de 2 m de la costa con profundidades entre 30 cm a 1 m<sup>(9)</sup>. Esto permite detectar especies como *Boana punctata* que utilizan microhábitat profundos (1 m o más) y especies tales como *Physalaemus albonotatus* y *Elachistocleis bicolor*, que prefieren microhábitats someros (C. Antoniazzi, obs. personal). En ambientes lóticos asociados a río de llanura, es recomendable muestrear debajo de los camalotes (macrófitas flotantes) donde se alimentan y refugian los renacuajos (C. Antoniazzi, obs. personal).

Los muestreos en estos tipos de ambientes se pueden realizar mediante una técnica de barrido con el empleo de la red de mano o copo. Esta técnica controla la superficie o el volumen barrido en cada redada y permite realizar





**Figura 3.2.3.** Muestreo de renacuajos en ambientes lénticos de llanura aluvial (río Paraná). Foto: C. Antoniazzi.

estimaciones cuantitativas del tamaño de la población de renacuajos<sup>(11,12)</sup> (ver estandarizaciones de los muestreos más abajo). Las redadas se pueden llevar a cabo a lo largo de transectas perimetrales iniciadas en puntos seleccionados al azar. Por ejemplo, cada muestra puede ser obtenida avanzando con el copo por una distancia de 2 metros, si el cuerpo de agua lo permite. Se pueden realizar copadas en cada cuerpo de agua, barriendo desde el centro de la laguna hacia el margen, hasta alcanzar el número de muestras necesarias<sup>(9,10)</sup>.

Para el caso de arroyos de montaña con mucha corriente o con sustratos de piedra que impida hacer pasadas de redes de mano, puede utilizarse la técnica de red de patada. Para esto se usan redes D o de tipo Surber colocadas aguas abajo del sitio de muestreo y uno o varios investigadores alteran o mueven el sustrato pedregoso con los pies. Los renacuajos escapan de sus refugios entre las piedras y son arrastrados por la corriente hasta ingresar a la red colocada más abajo. Una alternativa es colocar una red de cerco atravesando el cauce del arroyo aguas abajo y perturbar el mismo cauce río arriba removiendo el sustrato, volteando piedras y sacudiendo la vegetación acuática.

#### **b) Cajas trampa**

Las cajas trampa consiste en una caja con su parte superior e inferior abiertas y sus cuatro paredes laterales construidas con diferentes materiales livianos (plástico, madera, malla plástica, aluminio). La altura y dimensiones dependen de la profundidad y tamaño del cuerpo de agua a muestrear. Para cada muestra, la trampa se deposita suavemente en el fondo del cuerpo de agua y se presiona firmemente contra el sustrato evitando que queden espacios libres que permitan a los renacuajos escaparse de su interior. Todos los individuos encerrados en la trampa se extraen mediante barridos con una red de inmersión<sup>(15)</sup>. Es recomendable que el marco de la red tenga el mismo

ancho que el de las paredes de la caja y realizar varias pasadas en su interior si el agua estuviera muy turbia y no permitiera corroborar que ya no quedan ejemplares por capturar. Un inconveniente para el uso de esta técnica es la presencia de vegetación densa que puede impedir colocar correctamente la caja en el fondo del cuerpo de agua y por ello se recomienda para cuerpos de agua escasamente vegetados<sup>(7)</sup>.

Para cuerpos de agua que poseen un sustrato irregular (como arroyos con piedras de diferentes tamaños) que impediría ajustar adecuadamente una caja a ese tipo de fondo, pueden utilizarse tubos de diferentes diámetros con aletas externas de goma en su base, que ayudan a sellar el fondo de la trampa cuando se apoya en sectores irregulares<sup>(14)</sup>.

### c) Encuentro visual

Esta técnica consiste en registrar el número de ejemplares (y si fuere posible la identidad de la especie) mientras se camina lentamente por el borde de los cuerpos de agua. Una alternativa a esta técnica que permite calcular además la probabilidad de detección, es el método de doble observador<sup>(15)</sup> donde un primer observador registra todos los renacuajos avistados y posteriormente un segundo observador, confirma y registra por separado los recuentos que el observador principal ha realizado y cualquier otro que el observador principal se perdió. Ambos métodos visuales solo se pueden aplicar en cuerpos de agua claras o transparentes<sup>(17)</sup>. El éxito de registro dependerá de la experiencia y habilidad del investigador para detectar renacuajos en el cuerpo de agua e identificar correctamente la especie a la que corresponde.

## Técnicas de muestreo pasivo

### a) Redes simples

Las redes simples son aquellas que aprovechan los comportamientos natatorios de los renacuajos para que queden atrapados en la red que se coloca fija en un sitio específico. Generalmente constan de un paño de red que cuelga verticalmente en el agua con flotadores en la parte superior y pesas en el borde inferior. Estas redes pueden colgar desde la superficie hasta el fondo del cuerpo de agua, o solamente cubrir hasta cierta profundidad de la columna de agua. La eficacia de captura estará determinada por la apertura de la malla (o el diámetro de los orificios de la red) que puede dejar pasar a los ejemplares o especies más pequeñas. Las dimensiones de estas redes pueden adecuarse al tamaño y profundidad del cuerpo de agua, aunque los modelos comerciales suelen ser excesivamente grandes o con mallas muy abiertas

dado que se utilizan habitualmente para la captura de peces. Estas redes suelen combinarse con la colocación de trampas de embudo para mejorar la eficacia en la captura de los renacuajos<sup>(18)</sup>.

#### **b) Trampas de embudo**

Las trampas de embudo consisten en un cubo o cilindro con una o dos entradas en sus extremos en forma de embudo que guían a los renacuajos hacia una cámara de retención más grande. Una vez dentro de la cámara, los renacuajos no pueden volver a salir por los pequeños orificios de entrada quedando atrapados en el interior. Pueden construirse en forma muy económica con botellas plásticas a las cuales se les corta la parte superior y se invierte como un embudo hacia el interior de la parte cilíndrica de la botella<sup>(19)</sup>.

Las trampas de embudo se pueden utilizar en cuerpos de agua con abundante vegetación acuática, aguas profundas o sustrato muy irregular donde las redes de cerco o las redes de mano son ineficaces. Estas trampas también permiten muestrear un sitio por un tiempo más prolongado, aumentando la probabilidad de capturar especies elusivas o nocturnas<sup>(20)</sup>. Existen versiones comerciales, pero en muchos casos, el diámetro de la malla no es el adecuado para capturar renacuajos pequeños y deben ser adaptados<sup>(20)</sup>.

No se conocen estudios en Argentina que analicen la eficacia de estas trampas para capturar renacuajos. Estas trampas podrían conducir a estimaciones de diversidad o abundancia sesgadas, ya sea porque los renacuajos no ingresan en las trampas por sus comportamientos de desplazamiento o uso del microhábitat (ej.: especies que yacen en el sustrato) o por que evitan entrar en las trampas que contienen depredadores o los depredadores se comen a las larvas capturadas en la trampa<sup>(20)</sup>.

Una ventaja de este método por sobre los métodos de captura por red u observación directa, es que la experiencia y habilidad del investigador tiene poco impacto sobre el éxito de captura. Por lo que los protocolos de captura pueden ser repetidos de manera consistente a lo largo del tiempo o entre sitios<sup>(21)</sup>. Una desventaja es que, dependiendo del tamaño y la cantidad de cuerpo de agua relevado, se necesitará un número mínimo de trampas que puede implicar una inversión importante de dinero y de tiempo para revisarlas.

Los recuentos de renacuajos capturados con los métodos activos y pasivos se utilizan a menudo para evaluar la riqueza de especies y el tamaño de la población<sup>(7)</sup>. Sin embargo, los recuentos pueden ser muy variables y sesga-

dos y mostrar una baja relación con el tamaño real de la población analizada. Es por ello, que pueden aplicarse índices de captura que, para ser útiles y válidos, deben detectar una proporción constante de la población total<sup>(17)</sup>. Independientemente del método utilizado, la probabilidad de detección (probabilidad de detectar la especie cuando está presente) suele ser mucho menor que 1. Por lo tanto, estimar las probabilidades de captura y detección es aconsejable para cualquier estudio que tiene como objetivo comparar la abundancia y la ocupación en el espacio y el tiempo<sup>(7,22)</sup>.

En general, todas las técnicas de captura descritas más arriba son adecuadas para estimar abundancias relativas o patrones espaciales y temporales de uso del hábitat si se aplican adecuadamente métodos de estandarización y se efectúan las réplicas suficientes. Tanto los métodos pasivos como activos de captura pueden ser estandarizados ya sea definiendo el área a relevar, la cantidad de pases de red o el período de tiempo en el que se llevará a cabo el relevamiento. A continuación, se detallan estos protocolos específicos para estandarizar los relevamientos.

Los pases con redes de inmersión en un cuerpo de agua se pueden repetir hasta lograr la remoción total de los renacuajos presentes obteniendo así la abundancia y diversidad total. Los pases de red deben continuar hasta que pase un tiempo preestablecido sin atrapar ningún renacuajo por lo que este proceso de muestreo requiere generalmente un tiempo prolongado de ejecución. Aun así, este método tiende a subestimar el número de renacuajos en los cuerpos de agua de grandes dimensiones, con gran heterogeneidad o con alta abundancia de renacuajos<sup>(17)</sup>. El esfuerzo de captura puede estandarizarse al igualar el área relevada de los cuerpos de agua para asegurar que las probabilidades de captura no resulten diferentes por diferencias en el tamaño de los cuerpos de agua comparados. Para ello, la estandarización de pasadas de red implica utilizar una mecánica de barrido similar y un número de pasadas proporcional al tamaño del cuerpo de agua. Cuando se utilizan redes de mano se sugiere realizar una barrida de un metro de longitud usando un metro flotante como referencia. Los barridos deben realizarse en la misma proporción en todos los sitios similares si se pretenden comparar diferentes cuerpos de agua (por ejemplo: en partes poco profundas donde el marco de la red se arrastra a lo largo del sustrato a través de la vegetación acuática). Puede estimarse el volumen de un barrido como el área de la red multiplicada por la longitud del barrido en sitios donde la red puede sumergirse completamente. En los casos en que la profundidad del agua es inferior a la altura del marco de la red se puede utilizar la profundidad del agua multiplicada por el ancho neto de la red multiplicado por la longitud del barrido.

La técnica de encuentro visual puede estandarizar el esfuerzo de muestreo restringiendo las distancias y el área recorrida o el tiempo de búsqueda siempre que se traten de ambientes homogéneos. Al utilizar el método de doble observador, es necesario cambiar de roles (primer y segundo observador) para calcular las probabilidades de detección para cada uno, proporcionando así estimaciones poblacionales ajustadas<sup>(3)</sup>.

El muestreo con cajas trampa es un método que puede permitir la estimación de la densidad, dado que se muestrea un área conocida de hábitat con cada trampa.

Las técnicas activas pueden utilizarse además para efectuar estimaciones del tamaño poblacional mediante un método de captura-recaptura (que permite además calcular las tasas de detección y la proporción capturada del número total de renacuajos). En este caso, se requiere una técnica de marcado de los ejemplares que permita establecer la diferencia entre nuevas capturas y recapturas luego de sucesivos muestreos en los mismos sitios. Por lo tanto, este método requiere que todas las marcas sean reconocibles, las poblaciones sean cerradas (no ocurre mortalidad de renacuajos durante el estudio) y que la marca efectuada no sea una fuente de mortalidad (ver más detalles en **Sección 4.1 Identificación y marcado de individuos**).

En todos los casos, independientemente de la técnica empleada, es importante tomar las variables fisicoquímicas de cada sitio (pH, conductividad, nutrientes, turbidez y oxígeno disuelto), para categorizar y comparar los ambientes. Idealmente resultaría conveniente que en cada visita al cuerpo de agua se registraran estas variables sumadas al perímetro, superficie, profundidad en puntos diferentes, el porcentaje de cobertura de vegetación emergente, enraizada, flotante y perimetral dado que todas estas condiciones pueden ser muy variables a lo largo de una temporada reproductiva.

Dependiendo del objetivo del trabajo, se pueden realizar muestreos puntuales o sistemáticos, a lo largo del tiempo y del espacio. Los muestreos de renacuajos se pueden realizar con una frecuencia quincenal cubriendo todo un ciclo anual<sup>(9,10)</sup>.

Para la identificación de los renacuajos se utilizan guías afines, las cuales se basan en diferentes características morfológicas para determinar la especie (e.g.<sup>23-30</sup>). Además, con la práctica, se podrían utilizar caracteres como la forma del cuerpo, posición de los ojos, la coloración y forma de las aletas de las larvas para reconocerlas a campo. Si el objetivo es preservar los ejemplares para su estudio en laboratorio, se deben procesar cuidadosamente los indivi-

duos capturados. Para ello, una vez colectados, los renacuajos son sacrificados por administración de una sobredosis de anestésico en solución acuosa (1 ml de una solución saturada de benzocaína en etanol / 1 L de agua) y luego fijados *in situ* en formol al 10%<sup>(7,31)</sup>. En el caso que los ejemplares quieran utilizarse para la obtención de tejidos para técnicas de biología molecular, pueden ser preservados en alcohol etílico al 70% o al 96%.

Debemos tener en cuenta que los renacuajos son muy frágiles a cualquier tipo de manipulación, por lo que se deben extremar los cuidados una vez capturados y cuando son trasladados. De igual manera, cada lote debe ser identificado claramente y controlado con frecuencia ya que la muerte de algún individuo pueden afectar al resto, dado la rápida descomposición de los tejidos. Se recomienda que en el caso de realizar capturas para estudios descriptivos, tomar fotografías y realizar descripciones en los cuadernos de campo teniendo en cuenta la fragilidad de las larvas y los cambios acelerados que se producen posteriores a la fijación.

## Bibliografía

1. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
2. McDiarmid, R.W. & Altig, R. (eds.). Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. University of Chicago Press. Chicago and London.
3. Gunzburger, M. S. 2007. Evaluation of seven aquatic sampling methods for amphibians and other aquatic fauna. *Applied Herpetology* 4: 47-63.
4. Alford, R.A. 1999. Ecology. Resource use, competition and predation: 240-278. *En: McDiarmid, R.W. & Altig, R. (eds.). Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae.* University of Chicago Press. Chicago and London.
5. Mazerolle, M.J.; Bailey, I.L.; Kendall, W.L.; Royle, J.A.; Converse, J. & Nichols, J.D. 2007. Making great leaps forward: accounting for detectability in herpetological field studies. *Journal of Herpetology* 41: 672-689.
6. Hoff, K.vS., A.R. Blaustein, R.W. McDiarmid, and R. Altig. 1999. Behavior: Interactions and their consequences: 215-239. *En: McDiarmid, R.W. & Altig, R. (eds.). Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae.* University of Chicago Press, Chicago and London.
7. Shaffer, H.B.; Alford, R.A.; Woodward, B.D.; Richards, S.J.; Altig, R.G. & Gascon, C. 1994. Quantitative sampling of amphibian larvae: 130-141. *En: 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).* Smithsonian Institution Press. Washington D. C.
8. Williams, J.D & Echeverría, D.D 1995. Anfibios. *En: Lopretto, E.C. & Tell, G. (eds.). Ecosistemas de aguas continentales.* Ediciones Sur.
9. Scarabotti; P. 2009. Pulso de inundación y la coexistencia de larvas de anfibios con peces en ambientes leníticos del valle aluvial del río Salado (Santa Fe). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.
10. Antoniazzi, C.E. 2018. Larvas de anuros: posición trófica y efecto en la estructuración de las comunidades acuáticas de los humedales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.
11. Lajmanovich, R.C. 2000. Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia* 25: 71-79.
12. 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 D. C.

13. Babbitt, K.J.; Baber, M.J. & Tarr, T.L. 2003. Patterns of larval amphibian distribution along a wetland hydroperiod gradient. *Canadian Journal Zoology* 81: 1539-1552.
14. Colón-Gaud, C.; Whiles, M.R.; Brenes, R.; Kilham, S.S.; Lips, K.R.; Pringle, C.M., et al. 2010. Potential functional redundancy and resource facilitation between tadpoles and insect grazers in tropical headwater streams. *Freshwater Biology* 55: 2077-2088.
15. Nichols, J.D.; Hines, J.E.; Sauer, J.R.; Fallon, F.; Fallon, J., & Heglund, P.J. 2000. A double-observer approach for estimating detection probability and abundance from avian point counts. *The Auk* 117: 393-408.
16. Jung, R.E.; Dayton, G.H.; Williamson, S.J.; Sauer, J.R. & Droege, S. 2002. An evaluation of population index and estimation techniques for tadpoles in desert pools. *Journal of Herpetology* 36: 465-472.
17. Willson, J.D. & Dorcas, M.E. 2003. Quantitative sampling of stream salamanders: comparison of dipnetting and funnel trapping techniques. *Herpetological Review* 34: 128-130.
18. Willson J.D. & Gibbons, J.W. 2010. Drift Fences, coverboards, and other traps: 227-246. *En: Dodd, K.C. (ed.), Amphibian Ecology and Conservation: a Handbook of Techniques.* Oxford University Press, Oxford, UK.
19. Skelly, D.K. & Richardson, J.L. 2010. Larval sampling: 55-70. *En: Dodd, K.C. (ed.), Amphibian Ecology and Conservation: a Handbook of Techniques.* Oxford University Press, Oxford, UK.
20. Swartz, T.M. & Miller, J.R. 2018. Trapping amphibians and their predators: Tradeoffs in trap design and performance. *Herpetological Review* 49: 238-243.
21. Adams, M.J.; Richter, K.O. & Leonard, W.P. 2010. Surveying and monitoring amphibians using aquatic funnel traps. *En: Olson, D.H.; Leonard, W.P. & Bruce Bury, R. (eds.). Sampling amphibians in lentic habitats: Methods and approaches for the Pacific Northwest.* Oxford University Press, Oxford.
22. Schmidt, B.R. & Pellet, J. 2010. Quantifying abundance: counts, detection probabilities, and estimates: 465-479 *En: Dodd, K.C. (ed.), Amphibian Ecology and Conservation: a Handbook of Techniques.* Oxford University Press, Oxford, UK.
23. Cei, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano (N. S.) Monographie* 2: 1-609.
24. Kehr, A. & Williams, J.D. 1990. Larvas de anuros de la República Argentina. Asociación Herpetológica Argentina, Tucumán.
25. Langone, J.A. & de Sá, R.O. 2006. Redescripción de la morfología larval externa de dos especies del grupo de *Leptodactylus fuscus* (Anura, Leptodactylidae). *Phyllomedusa* 4: 45-59.
26. Rossa-Feres, D.C. & Nomura, F. 2006. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropica* 6: BN00706012006.
27. Kolenc, F.; Borteiro, C.; Alcalde, L.; Baldo, D.; Cardozo, D. & Faivovich, J. 2008. Comparative larval morphology of eight species of *Hypsiboas* Wagler (Amphibia, Anura, Hylidae) from Argentina and Uruguay, with a review of the larvae of this genus. *Zootaxa* 1927: 1-66.
28. Suarez, A. & Lynch, J.D. 2011. Clave ilustrada de los renacuajos en las tierras bajas al oriente de los Andes, con énfasis en Hylidae. *Caldasia* 33: 235-270.
29. Schulze, A.; Jansen, M. & Köhler, G. 2015. Tadpole diversity of Bolivia's lowland anuran communities: molecular identification, morphological characterization, and ecological assignment. *Zootaxa* 4016: 1-111.
30. Vera Candiotti, M.F.; Grosso, J.; Pereyra, M.O.; Haad, M.B.; Lescano, J.; Siu-Ting, K.; Aguilar, C. & Baldo, D. 2020. Larval anatomy of Andean toads of the *Rhinella spinulosa* group (Anura: Bufonidae). *Herpetological Monographs* 34: 116-130.
31. Close, B.; Banister, K.; Baumans, V.; Bernoth, E.M.; Bromage, N.; Bunyan, J.; Erhardt, W.; Flecknell, P.; Gregory, N.; Hackbarth, H.; Morton, D. & Warwick, C. 1997. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals* 31: 1-32.

## 3.3 RELEVAMIENTO DE POSTMETAMÓRFICOS

**Marcos Vaira<sup>1</sup>, Mauricio S. Akmentins<sup>1</sup>, Elena Gangenova<sup>2</sup>, Atilio Guzmán<sup>3</sup>,  
Julián Lescano<sup>3</sup> & Laura C. Pereyra<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Biología Subtropical (IBS) (UNaM-CONICET). Centro de Investigaciones del Bosque Atlántico (CEiBA). Misiones, Argentina.

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Ecológicas Subtropicales (CIES), Administración de Parques Nacionales, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina.

<sup>5</sup> Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA), CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.



En esta sección se presenta una revisión de las técnicas de relevamiento más utilizadas para anuros juveniles y adultos, centrandose en los detalles de las limitaciones y recomendaciones de cada técnica, dado que existen ya numerosos libros y manuales que explican con precisión aspectos técnicos, metodológicos y de procedimiento. Al final de la sección se incluye una lista de lecturas sugeridas para los detalles específicos<sup>(1-6)</sup>.

La elección de una técnica adecuada para el relevamiento de anfibios estará determinada en gran medida por el objetivo principal del estudio, del cual se desprenden el objeto de estudio y las escalas espaciales y temporales en las que se realizará el trabajo. El objeto de estudio se refiere a las especies o ambientes de interés, pudiendo comprender una o varias poblaciones de una especie o una o varias comunidades. En lo posible se debe conocer los hábitos generales de la o las especies en estudio, sus preferencias de hábitats y microhábitat, historia de vida y comportamiento, dado que todo esto influye sobre la eficacia de las distintas técnicas de relevamiento y por ende determinarán la selección de la misma. Del mismo modo, la elección de un método de relevamiento adecuado debe realizarse en función de la escala espacial y temporal definida para el estudio. Si, por ejemplo, se pretende cubrir una extensión geográfica muy amplia y durante varios años, es posible que el uso de métodos que demanden desplegar estructuras, o que requieran pasar largos períodos de tiempo en cada sitio, resulten complejos de aplicar en una misma temporada reproductiva (en muchas ocasiones reducidas a unos pocos meses de cada año). Si los métodos de relevamiento en diferentes sitios y en diferentes años no pueden conducirse de la misma forma y en tiempos similares, es decir asegurando un esfuerzo de muestreo equiparable entre sitios o años, el estudio contendrá sesgos metodológicos difíciles de resolver. Por lo tanto, resulta importante enfatizar siempre sobre la importancia de elegir métodos de muestreo estandarizados que permitan obtener datos confiables para las especies, poblaciones, o comunidades de anfibios estudiadas, permitiendo así realizar caracterizaciones y comparaciones espaciales y/o temporales válidas.

De hecho, todas las técnicas de relevamiento presentan algún tipo de sesgo, el cual puede resultar en una eficacia en la detección muy dispar entre las distintas especies. Esto puede depender, además de lo antes mencionado, de las condiciones climáticas y la heterogeneidad ambiental. El momento y las condiciones en los que se desarrolla el muestreo también son puntos importantes a tomar en cuenta para generar datos confiables. Es necesario entonces tomar en cuenta los períodos de actividad de la/s especie/s involucrada/s en el estudio para definir la época, duración y los intervalos de muestreo, dado que éstos pueden variar no sólo por temporada, sino que también durante el día y hasta entre años. Por otro lado, dado que los anfibios son muy sus-

ceptibles a las condiciones ambientales de temperatura y humedad, es necesario tomar en cuenta estas variables al momento de planificar las salidas de campo para aumentar las probabilidades de detección y evitar generar falsas ausencias al momento de registrar una especie en un lugar (es decir no registrar la especie a pesar que ésta si se encuentra en el lugar). Esto puede ajustarse ya sea en base al conocimiento y experiencia del investigador, en base a antecedentes bibliográficos o a los datos asociados a ejemplares de colección (ver **Sección 5**).

Antes de comenzar el trabajo de campo, resulta importante evaluar los recursos disponibles para el relevamiento (humanos y económicos) y los resultados deseados para lograr un adecuado equilibrio sin invertir un esfuerzo innecesario o inconducente. Se aconseja realizar, en la medida de las posibilidades, visitas exploratorias a las zonas de estudio previas al comienzo del trabajo de campo, o al menos realizar una diagramación de las zonas a relevar a través de imágenes satelitales (por ejemplo, Google Earth™). Por otro lado, se sugiere la confección de una ficha de campo, para así organizar la información que se necesitará registrar, automatizando y ordenando los relevamientos. Por último, es necesario contar con los permisos necesarios, así como informarnos sobre el manejo de los individuos, higiene y bioseguridad. Todos estos puntos son desarrollados con más detalle en la **Sección 5**.

Existen dos grandes grupos de técnicas de relevamiento basadas en la forma de detección de los individuos: técnicas activas y pasivas. Las técnicas activas requieren de la presencia física del investigador, que es quien detecta, captura e identifica los anfibios. En tanto en las técnicas pasivas, es la propia técnica la que realiza la captura o el registro de ejemplares durante el periodo de tiempo en la cual esté activa (ej. trampas de caída), para después ser revisada por el investigador para el conteo e identificación de los ejemplares capturados. Como se mencionó previamente, cada tipo de técnica tiene sus propios supuestos, sesgos y limitaciones, por lo cual deben considerarse cuidadosamente al momento de planificar la cantidad de réplicas espaciales y temporales que propondrá el estudio.

La mayoría de las técnicas de muestreo enumeradas a continuación son adecuadas tanto para hábitats terrestres como acuáticos y no son mutuamente excluyentes.

### **Técnicas de Muestreo Activo**

Consisten en todas las técnicas que implican la presencia física de los investigadores para realizar los relevamientos mediante el registro visual y/o audi-

tivo. Generalmente insumen menos costos operativos, dado que son técnicas que no requieren construcción y montaje de estructuras o aparatos en los sitios, pero implican una alta inversión de tiempo en recursos humanos durante cada relevamiento. La principal limitante que presenta esta técnica es que la detección de individuos de distintas especies depende estrictamente de la habilidad y capacidad de cada investigador, la cual puede además variar entre sitios diferentes, aún cuando se controle el esfuerzo de muestreo. Este posible sesgo en detección puede controlarse intentando que los grupos que lleven a cabo los relevamientos cuenten siempre con al menos un investigador experimentado o que todos los integrantes tengan el mismo nivel de experiencia.

Dentro de las técnicas activas se pueden distinguir dos métodos principales de detección y determinación de la identidad taxonómica de los anfibios adultos del área de muestreo: por encuentro visual directo y por detección auditiva. Ambos métodos de detección/identificación pueden ser utilizados complementariamente en caso de que el objetivo sea simplemente conocer la riqueza de especies, pero deben ser tratadas de manera diferente en caso de necesitar estimar la abundancia de las especies, ya que cada método tiene sus supuestos y limitaciones particulares.

En caso de que no se desee o no se pueda coleccionar ejemplares de referencia, siempre conviene complementar los métodos activos y pasivos con información de respaldo que permita la identificación positiva de las especies de anfibios del área de estudio, como por ejemplo un registro fotográfico de respaldo. En el caso de la detección auditiva, es deseable que se realicen los registros bioacústicos de respaldo de las vocalizaciones detectadas, para luego contrastarlas con guías audiovisuales de anfibios o consultas directas con expertos en el grupo taxonómico particular que se desee identificar (ver **Sección 3.4 Monitoreo Acústico Pasivo**).

#### **a) Muestreo por Encuentro Visual**

Esta técnica de muestreo consiste en registrar individuos aplicando el método de búsqueda activa a lo largo de una ruta de prospección con un ancho y largo previamente preestablecido (transectas) o cubriendo un área determinada (parcelas), para estandarizar el esfuerzo de muestreo. Generalmente se aconseja además realizar la búsqueda por un tiempo delimitado previamente. Para el análisis de los resultados se tendrán en cuenta el área recorrida, el tiempo transcurrido en la búsqueda activa y el número de observadores involucrados. La eficiencia de esta técnica claramente variará mucho según el tipo de hábitat (por ejemplo, vegetación baja o alta) y la biología de la espe-

cie (por ejemplo, fosoriales o arborícolas). Los supuestos de esta técnica son:

*i)* Se considera que todos los individuos de las distintas especie tienen la misma probabilidad de ser encontrados. Este supuesto puede no cumplirse, por ejemplo, para especies donde uno de los sexos es mucho más probable de ser detectado por su tamaño o coloración (dimorfismo o dicromatismo sexual marcado); o diferencias de comportamiento (los machos cantan desde perchas en altura y las hembras se refugian en huecos o cuevas). En estos casos puede ser recomendable restringir la búsqueda a individuos de un solo sexo para evitar sesgos importantes (p.e. relevar sólo machos). Por otro lado, no todas las especies tienen la misma dificultad para ser registradas, ya sea por sus hábitos, tamaños, coloración, entre otros. Esta diferencia en probabilidad de detección de las distintas especies de anuros podría llevar a sesgos en la estimación de la presencia de la especie en el sitio de estudio o de su abundancia relativa, pudiendo generar falsas ausencias así como subestimar la abundancia de especies más crípticas, como por ejemplo, especies fosoriales. En estos casos se aconseja el uso de métodos de relevamiento complementarios, como por ejemplo registros auditivos.

*ii)* Cada individuo es detectado una única vez en la búsqueda. El cumplimiento de este supuesto debe considerarse particularmente en el caso que el estudio pretenda registrar abundancias, dado que en el registro de riqueza de especies el conteo reiterado de un mismo ejemplar no afecta el resultado. En el caso de especies que se desplazan activamente en el ambiente, puede ser necesario recurrir al marcado individual o el registro de marcas o patrones de los individuos que permitan descartar el conteo repetido de un mismo ejemplar (ver detalles en **Sección 4.1 Marcado de Individuos**). Este procedimiento implica una mayor inversión de tiempo en la aplicación de la técnica y por tanto debe considerarse al planificar las réplicas temporales y espaciales del estudio.

La búsqueda activa permite detectar a todos los estadios de desarrollo y a ambos sexos. Las contras de este método son por un lado que depende de la experiencia del investigador que realiza las observaciones y por otro lado la diferencia en probabilidad de detección de las distintas especies. Como se mencionó anteriormente, para asegurar resultados comparables, cada investigador involucrado en el muestreo por encuentro visual debe tener una experiencia similar en el reconocimiento de las especies y la misma capacidad para su detección.

Una variación de esta técnica de encuentro visual para ambientes acuáticos consiste en la utilización de redes de mano o de arrastre para capturar individuos adultos a lo largo de una ruta de prospección o cubriendo un área

determinada aplicando el método de búsqueda activa. Cuando el proceso de captura con redes está semi-estandarizado (el número de barridos o golpes de red se relaciona con la superficie del cuerpo de agua a relevar) puede considerarse un muestreo de barrido que permite comparar hábitats acuáticos bastante homogéneos. Esta técnica de encuentro visual por barrido se puede aplicar en hábitats acuáticos donde resultará más eficiente que el registro visual de los ejemplares. Es importante considerar las diferencias específicas en la profundidad de los cuerpos de agua relevados dado que la posición de los individuos adultos en la columna de agua puede resultar en diferencias en la capacidad de captura de las diferentes especies si las redes no pueden cubrir toda la columna<sup>(7)</sup>.

La misma técnica con el uso de redes de mano puede ser adecuada para relevar hábitats acuáticos de tamaño pequeño a intermedio y con corriente y lecho con grandes piedras. En este caso la técnica consiste en levantar todo el sustrato o piedras sueltas del fondo del cuerpo de agua o rastrillar el cauce con una red de mano. La forma más eficiente de relevar estos ambientes de aguas corrientes es con un equipo de dos personas, donde un investigador remueve las piedras y el sustrato, mientras que el otro sostiene la red aguas abajo a una corta distancia. Las principales limitaciones de esta variación de la técnica de encuentro visual es que requiere mayor tiempo de registro y causa alteraciones al hábitat acuático.

#### **b) Muestreo por Registros Auditivos**

Los registros auditivos son muy útiles para estimar la riqueza y/o abundancia relativa de especies de anuros cuyas vocalizaciones son fáciles de detectar y simples de identificar para un investigador relativamente entrenado sin que se requiera la detección visual del individuo que vocaliza. Consiste en registrar los individuos machos adultos que son escuchados a lo largo de una ruta de prospección (transecta) o cubriendo un área determinada (parcela), durante un tiempo determinado previamente. Por lo tanto, para el análisis de los resultados se debe tener en cuenta el área recorrida, el tiempo transcurrido en la escucha activa y el número de investigadores involucrados. Esta técnica tiene la ventaja de ser menos invasiva al no requerir la detección visual del ejemplar que puede obligar a un mayor disturbio del ambiente (cortar o pisar vegetación; mover troncos o piedras). Además, permite la detección de especies crípticas, como por ejemplo especies fosoriales.

Claramente la principal limitación es que esta técnica no permite detectar individuos juveniles, hembras o especies que no son vocalmente activas (ej. grupo *Rhinella spinulosa*). Además, es altamente efectiva sólo durante la épo-

ca reproductiva, la cual puede no ser coincidente en todas las especies del ensamble de una localidad o área determinada.

Si la identificación de las especies detectadas se realiza a campo, esta técnica depende mucho del entrenamiento y/o experiencia del observador. Además, puede ser dificultoso el reconocimiento de ciertas especies con cantos de anuncio similares, por lo que se recomienda acompañar esta técnica con el registro de vocalizaciones a fin de determinar la identidad taxonómica de las especies de las cuales se tenga duda (ver **Sección 3.4 Monitoreo Acústico Pasivo**). Los registros auditivos pueden ser eficientes para determinar la riqueza de especies, pero existen algunas limitaciones cuando se trata de monitorear cambios temporales o entre diferentes sitios porque siempre existirá un sesgo por la estrecha relación entre las condiciones ambientales y la actividad de vocalización de los machos al momento de realizar cada muestreo. La determinación de abundancia de individuos también resulta compleja en el caso de estar relevando diferentes especies con diferentes comportamientos de vocalización (machos que vocalizan aislados o espaciados regularmente vs. machos que vocalizan en grandes coros difíciles de individualizar por la superposición de sus cantos).

Con este método puede estimarse la abundancia relativa de las especies activas con cierto rango de subjetividad. Algunos autores proponen preestablecer categorías ordinales para rangos de abundancias relativas.

## Protocolos para la estandarización del relevamiento

Como se mencionó brevemente, los distintos métodos de relevamiento pueden ser estandarizados en su esfuerzo de muestreo ya sea definiendo el área a relevar, o el período de tiempo en el que se llevará a cabo el relevamiento, o ambos. A continuación, se desarrollan estos protocolos específicos para estandarizar:

**Búsquedas activas por tiempo limitado.** Propone delimitar la búsqueda activa de individuos (visual, auditiva o con red) a un período de tiempo predefinido. Usualmente el tiempo destinado a la búsqueda se suele establecer entre 15 o 30 minutos de duración, dependiendo del número de observadores y la extensión o dificultad del hábitat a ser relevado. Con este protocolo, el esfuerzo de muestreo se cuantifica fácilmente registrando la cantidad de observadores por la cantidad total de tiempo de búsqueda. Por ejemplo, si se establece un protocolo de muestreo con tres investigadores relevando durante 15 minutos el esfuerzo de muestreo sería  $3 \times 15 = 45$  minutos-persona

en cada sitio muestreado. Si durante las búsquedas se recopila información adicional de los individuos encontrados (como medidas corporales, fotografías o revisión de marcas) el tiempo invertido en estas actividades no debe considerarse como parte de la búsqueda.

Las principales limitaciones de una búsqueda por tiempo limitado es la gran cantidad de tiempo que insume incluir muchos sitios para relevar, dado que todos los sitios deberán ser revisados por el mismo intervalo de tiempo sin importar las condiciones del terreno. A su vez, en sitios con menores dificultades para ser recorridos, las búsquedas podrán ser más intensivas, logrando posiblemente un mayor número de registros en comparación con sitios con dificultades u obstáculos para recorrerlos. Nuevamente, a pesar de todos los intentos por estandarizar el muestreo en los diferentes sitios (por ejemplo, recorrer sitios con condiciones del terreno similares) o en los diferentes años (por ejemplo, muestrear a la misma hora del día y durante la misma época del año), hay que tomar en cuenta que es probable que los factores ambientales, del terreno y la experiencia de los observadores serán diferentes y por lo tanto podrían sesgar los datos de conteo alterando las comparaciones interanuales o la relación entre los recuentos de individuos y la abundancia real en diferentes sitios. Por ejemplo, es probable que investigadores expertos encuentren más individuos y más rápidamente que los investigadores sin experiencia, registrando un mayor número de individuos en el mismo período de tiempo. Por ello resulta fundamental tener en cuenta todos estos factores al diseñar un estudio que implique recorrer diferentes sitios muy heterogéneos aplicando este protocolo de estandarización. Para minimizar estos sesgos, es aconsejable repetir los muestreos en cada sitio para incluir varios días con diferentes condiciones climáticas, seleccionar sitios con características similares del terreno y seguir siempre la misma rutina de búsqueda previamente planificada. Por ejemplo, si la primera búsqueda incluyó mover troncos y piedras, esos mismos protocolos deben realizarse cuando se repiten las búsquedas o se registran sitios diferentes. Además, en caso de que se cuente con personal de formación dispar, otra medida puede ser aleatorizar el personal y los sitios a relevar en cada muestreo.

**Búsqueda activa en áreas restringidas.** Este protocolo propone centrar la búsqueda activa en un área predeterminada y no en una cantidad de tiempo. Las búsquedas con áreas restringidas proporcionan información en términos de ausencia o presencia, abundancias relativas de las distintas especies registradas en relación al área relevada y algunos datos sobre uso del hábitat por los individuos de una o varias especies. El tamaño del área de búsqueda dependerá del tipo de hábitat y/o de las características de la o las especies

que se pretenden registrar. El esfuerzo de muestreo puede medirse como la superficie total relevada por el número de investigadores (ej  $m^2$ /persona). Las principales limitaciones de este método, al igual que con las búsquedas limitadas por tiempo, residen en el efecto de las condiciones ambientales, la experiencia de los investigadores y la rutina de búsqueda. En este método, las condiciones diferentes del terreno en los diferentes sitios registrados no debería ser una condición que produzca algún sesgo en los registros dado que el tiempo que insume recorrer cada área relacionado a la dificultad que presente el terreno no es una condición limitante. Sin embargo, si el estudio requiere registrar áreas de grandes superficies es necesario considerar el tiempo que insumirá esta búsqueda para así evaluar correctamente el número de áreas que podrán ser relevadas con este método bajo condiciones climáticas similares o en horarios similares.

**Muestreo en parcelas.** Este protocolo propone distribuir aleatoriamente parcelas de muestreo de límites fijos dentro del sitio de estudio, dentro de las cuales se registra minuciosamente la presencia de individuos en el área de búsqueda. Las parcelas de muestreo suelen ser cuadradas, pero pueden disponerse áreas fijas de otras formas en función de las características del terreno (circulares, rectangulares). En todos los casos, todas las parcelas deben mantener la misma superficie dentro de cada sitio de estudio para obtener el mismo esfuerzo de muestreo por sitio y permitir las comparaciones. Dentro del muestreo en parcelas, podemos diferenciar el muestreo puntual donde se usan parcelas pequeñas y el muestreo amplio donde se usan parcelas más grandes.

El muestreo puntual se sugiere cuando se pretende registrar una sola especie donde los individuos son relativamente pequeños y están más densamente distribuidos, mientras que el muestreo amplio se aplica preferentemente a especies que están ampliamente dispersas o cuando se pretende registrar el conjunto de especies presentes en los sitios de estudio. El muestreo en parcelas se recomienda para áreas de estudio homogéneas con especies terrestres que se distribuyen ampliamente en sitios con vegetación alta, bajo piedras, construyen cuevas subterráneas o son muy crípticas con el ambiente donde habitan. Para obtener los mejores resultados en este protocolo de muestreo de parcelas, será importante aplicar la técnica de búsqueda más adecuada en su interior (por ejemplo, usando rastrillos sobre la hojarasca, palas o cucharas de jardinería para cavar, o barretas para remover piedras). El principal inconveniente del muestreo en parcelas es que su diseño, configuración y montaje puede llevar mucho tiempo, lo que limita la capacidad de realizar relevamientos de muchos sitios distantes en poco tiempo.



Una modificación de este método se denomina muestreo de parches, en el que las parcelas de muestreo son normalmente microhábitats específicos (por ejemplo, troncos, arbustos, bromelias). El muestreo de parches se aplica cuando se buscan especies que se conoce o supone que están confinadas a microhábitats específicos dentro de un hábitat más grande. En estos casos, los límites y características del parche deben definirse de forma precisa previamente.

Un caso particular lo presentan las especies de hábitos de vida estrictamente acuáticos como las ranas acuáticas andinas del género *Telmatobius*. Para estos anfibios que se guarecen en los márgenes de los cursos de agua o bajo de piedras en el fondo, la búsqueda activa se realiza “al tacto” en todos los posibles refugios.

Para todas las variantes de este método se deben cumplir algunos criterios para evitar sesgos en los registros: (i) Los individuos no pueden abandonar la parcela o el parche antes de ser registrados; (ii) las parcelas pueden distribuirse aleatoriamente en el terreno y (iii) todos los parches presentes en el sitio de estudio deben ser igualmente localizables. Si se cumplen estos criterios y las parcelas y parches se logran distribuir aleatoriamente dentro del área de estudio, cada uno podrá representar entonces una muestra independiente.

**Muestreo en transectas.** Este protocolo establece una serie de franjas lineales estrechas de ancho y largo preestablecidos (transectas) donde se efectúa el registro de individuos mientras se recorren a una velocidad constante. Los registros podrán realizarse por detección visual o auditiva (ver técnicas más arriba). La disposición de las transectas en el área a relevar puede efectuarse al azar o siguiendo un sistema ordenado que establezca una distancia constante entre transectas, evitando en todos los casos la intersección entre ellas. Es recomendable desplegar el sistema de transectas dentro de un solo tipo de unidad de paisaje o hábitat, replicando el mismo sistema (cantidad y orientación de las transectas) para cada tipo de hábitat que pretende relevarse. Generalmente, se utilizan para registros a través de gradientes ambientales o altitudinales, pero también se pueden usar para registrar especies o individuos en un hábitat homogéneo. Para poder aplicar esta técnica se requiere que se cumplan una serie de supuestos: (i) los individuos se distribuyen al azar a lo largo de las transectas; (ii) todos los individuos tienen la misma probabilidad de ser detectados en la transecta; (iii) cada individuo no se registrará dos veces dentro de una misma transecta o en las diferentes transectas del mismo sistema. Los muestreos en transectas no son recomendables

para registrar especies asociadas a microhábitats específicos (ver muestreo de parches en el subtítulo anterior), que no tengan una distribución regular o no se encuentren ampliamente dispersas. Suele ser frecuente durante las recorridas encontrar individuos que resulte difícil establecer si deben incluirse como registro para la transecta. En todos los casos, deben definirse previamente los criterios para considerar a cada individuo dentro o fuera de la transecta (fundamentalmente cuando se utilizan registros auditivos como técnica de detección).

No es recomendable establecer transectas siguiendo la traza de caminos o senderos ya que estos nunca son establecidos al azar y la presencia de muchas especies pueden estar influenciadas positiva o negativamente por su trazado o construcción. En caso de monitoreos, se aconseja marcar las transectas de manera permanente con cintas de colores o algún otro tipo de marcado que garantice ubicar la transecta en las visitas subsecuentes (meses o años). Utilizar varillas y cinta reflectivas pueden ser de gran ayuda para ubicar las transectas en la oscuridad.

En general todos estos métodos proporcionan información sobre la presencia de individuos o especies (pero no su ausencia verdadera) a excepción del muestreo en parcelas. Para maximizar la posibilidad de encontrar todas las especies presentes en el sitio de estudio, las búsquedas y muestreos deberían realizarse durante varios días con diferentes condiciones climáticas e incluso durante diferentes estaciones. La repetición de los muestreos en una misma área, transecta o cuadrante no deben considerarse necesariamente como muestras independientes y su análisis estadístico requiere evaluar cuidadosamente la posibilidad de la pseudoreplicación (ver **Sección 2. Diseño de muestreo**).

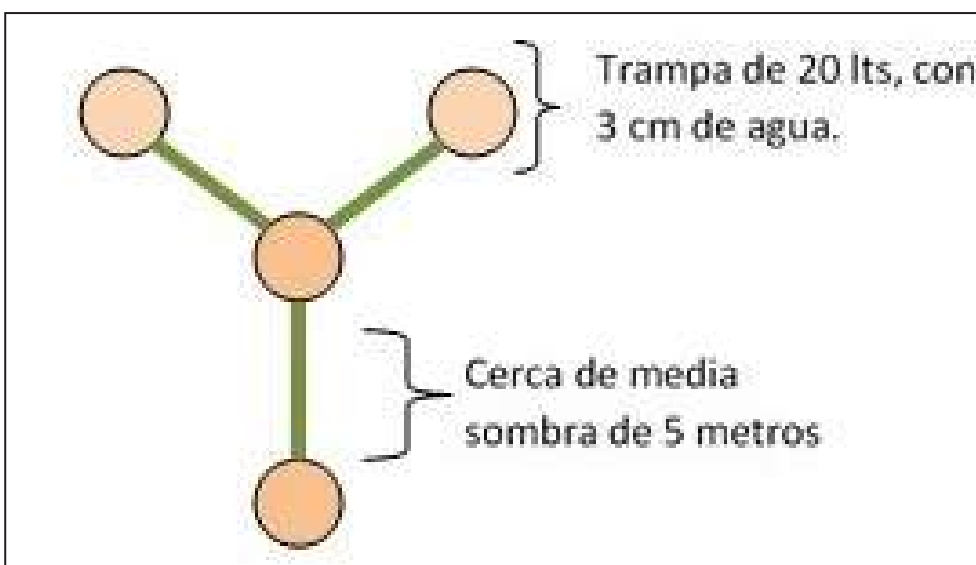
**Relevamiento en sitios reproductivos.** Este protocolo funciona muy bien en ambientes estacionales, donde se dan concentraciones reproductivas asociadas a ambientes acuáticos relativamente chicos, donde las especies tienen un período de actividad acotado a ciertos momentos (siempre y cuando se muestree en condiciones óptimas, luego de lluvias que disparan la actividad). De esta forma y en estos hábitats acuáticos relativamente pequeños (unos pocos metros cuadrados, hasta sitios con unos 300 o 400 m<sup>2</sup>) es factible individualizar todos los animales en actividad reproductiva utilizando los métodos descritos previamente (relevamientos visuales o auditivos). Sin embargo, la complejidad ambiental dada por la vegetación (en ambientes selváticos por ejemplo) dificulta esto último. Por otro lado, y de acuerdo también con la experiencia, el entrenamiento en el reconocimiento tanto visual como auditivo en los observadores es clave. En agregaciones reproductivas

donde la actividad es explosiva y responde a disparadores climáticos como las precipitaciones (como en la ecorregión Chaqueña, por ejemplo) es frecuente encontrar hasta 20 especies vocalizando en simultáneo en un único sitio reproductivo relativamente pequeño. De esta forma en ambientes estacionales y con comunidades dominadas por reproducción explosiva es un método eficiente para conocer la riqueza de especies y aproximarse a datos de abundancia relativa si y solo si se muestrea cuando las condiciones que disparan la reproducción son óptimas. Esto último entonces requiere de conocimiento previo sobre la fenología de las especies del sistema a muestrear, aunque esta información no siempre está disponible. Además, el método también resulta efectivo para monitorear poblaciones de especies puntuales a lo largo del tiempo. Asociado con métodos de marcado o reconocimiento de ejemplares es factible calcular tamaños poblacionales y fluctuaciones poblacionales a lo largo de la estación reproductiva así como entre estaciones o años. El seguimiento temporal de poblaciones o comunidades puede ser particularmente necesario para estimar abundancias y/u obtener una lista completa de especies en sitios donde la reproducción de la/las especie/s es prolongada y no está acotada a momentos puntuales (como sí ocurre en comunidades dominadas por especies con actividad explosiva).

## Técnicas de muestreo pasivo

### a) Trampas de caída

Las trampas de caída es una de las metodologías más utilizadas para la captura de anuros terrestres<sup>(8)</sup>, generalmente asociadas a cercas para aumentar



**Figura 3.3.1.** Esquema de una batería de trampas de caída dispuestas en Y. Ilustración: E. Gangenova.

su efectividad<sup>(9)</sup>. En hábitats de bosque, esta técnica captura el mayor número de especies, cuando se la analiza comparativamente con otras técnicas (*funnel traps*, búsqueda activa)<sup>10</sup>.

Las trampas pueden ser construidas a partir de recipientes o baldes plásticos de 10, 20 o 100 litros. Sin embargo, se ha demostrado que en la relación costo (material y de colocación)-beneficio, los baldes de un tamaño de 20 litros serían los más efectivos para la captura de la mayor cantidad de especies<sup>(10)</sup>. En el terrero, las trampas se pueden disponer en forma de Y distanciadas unos 5 metros, unidas por cercas de media sombra, y sostenidas mediante 3 o 4 varillas de hierro (de 6 mm) colocadas equidistantes (**Figura 3.3.1**). La instalación en sustratos blandos puede realizarse en cualquier momento del año, sin embargo, en suelos pedregosos (por ej. en la provincia de Misiones) es conveniente realizarla después de las lluvias. En ambientes de bosque, estas trampas pueden ser de captura viva sin mucho esfuerzo extra. El dosel del bosque mantiene la humedad y sombra necesaria para que los individuos no estén expuestos a la desecación. En ambientes abiertos de sabanas o pastizales, la radiación solar hace indispensable la colocación de esponjas en el fondo de los baldes para dar refugio y humedad, evitando la desecación de los individuos atrapados. De igual forma, en ecosistemas lluviosos se puede perforar la base y paredes del balde, esto permitirá que el agua de lluvia filtre hacia el sustrato circundante y no inunde el recipiente (**Figura 3.3.2**).

La cercanía a cuerpos de agua es otro factor a tomar en cuenta con esta técnica. Si las trampas son colocadas muy próximas a cuerpos de agua dos situaciones podrían ocurrir; que las trampas se inunden perdiendo funcionalidad y amenazando la supervivencia de las especies capturadas por ahogamiento; por otro lado, si los recipientes no están perforados los mismos son expulsados hacia arriba por la presión ejercida por la ascensión del agua, dejando inoperante la trampa.

Durante su activación todas las baterías de trampas deben ser revisadas diariamente. En ambientes de alta irradiación, esta actividad es preferentemente realizada en la mañana para evitar la desecación de los individuos capturados y la muerte por excesiva temperatura. Durante la revisión, todos los individuos colectados son identificados, marcados y luego liberados. Distintas variables pueden registrarse a partir de los individuos colectados (determinación de sexo, medidas morfométricas, peso o toma de muestras de tejido). Es importante inactivar las trampas cerrándolas con las tapas correspondientes una vez finalizado el muestreo. Si el objetivo es realizar un análisis poblacional o de diversidad, cada individuo capturado puede ser marcado, con el fin de evitar ser recontados y estimar así una abundancia po-



**Figura 3.3.2.** Trampas de caída dispuestas en ambientes de pastizal (arriba) y bosque nativo (abajo). Fotos: E. Gangenova.

blacional de manera confiable<sup>(11)</sup>. El marcado puede ser a través de la técnica de corte de falange o del marcado con elastómeros, por ejemplo (ver **Sección 4.1. Marcado de individuos**).

El tiempo de muestreo, la periodicidad del mismo, y tiempo de activación de las trampas dependerán de la pregunta que se quiera responder a través de esta metodología.

### b) Cubiertas y refugios artificiales

El uso de cubiertas y refugios artificiales como método de monitoreo pasivo es poco recomendable para estudios de diversidad de anfibios debido a su alta selectividad, pero podría ser efectivo para el monitoreo de ciertos grupos de anuros según el tipo de ecorregión o ambientes donde vayan a ser utilizados. Dado que en general proporcionan un microclima más estable y pueden representar un entorno más seguro para la protección contra los depredadores, no deben utilizarse para comparaciones con otras áreas relevadas o monitoreadas sin cubiertas o refugios.

El sistema más común de cubiertas artificiales es la colocación de líneas o cuadrículas de cubiertas rectangulares o cuadradas de madera contrachapada. Este material cuenta con la ventaja de retener la humedad por lo cual es utilizado por la herpetofauna como refugio. Tanto el tamaño como el número de cubiertas a desplegar en los sitios de muestreo dependerá del ambiente y del objetivo del estudio.

Una vez colocadas las cubiertas artificiales, estas deberán ser revisadas de manera periódica al igual que las trampas de caída (ver subtítulo anterior). Este tipo de cubiertas artificiales es efectiva para la detección de anuros de hábitos terrestres, siendo menos efectiva para especies de hábitos arbóricolas o fosoriales.

Existen alternativas de materiales y modelos de cubiertas artificiales. Una opción para especies terrestres, rupícolas o de hábitos de vida crípticos son los ladrillos cerámicos huecos para la construcción (**Figura 3.3.3a**). Pero este método resultó poco efectivo para el relevamientos de herpetofauna en las Selvas de las Yungas en el noroeste de Argentina (M. S. Akmentins obs. pers.), por lo que aún debe comprobarse su efectividad en otras ecorregiones y ensambles de especies.

Para especies de ranas trepadoras como las de la familia Hylidae, una opción efectiva son los refugios hechos con tubos de PVC o cañas de bambú (**Figura 3.3.3b**). Existen distintos modelos y diseños de disposición en campo de este tipo de cubiertas, que se encuentran resumidos en Glorioso & Waddle<sup>(12)</sup>. Los tubos de PVC pueden construirse de diferentes formas (e.g., en forma de T) y longitudes (e.g., 60 cm o 30 cm). Pueden estar tapados en la parte inferior, en la parte superior o sin tapa lo que les permite retener agua en el interior o no. Todas estas variaciones muestran diferencias en la eficacia de captura y el tamaño de los ejemplares según las especies<sup>(13-15)</sup>.

Este tipo de refugio demostró no ser efectivo para anuros del Bosque Montano de las Selvas de las Yungas (M. S. Akmentins, obs. pers.), pero no se



**Figura 3.3.3.** Tipos de refugios artificiales para monitoreo pasivo desplegados en el Bosque Montano de las Selvas de las Yungas en Jujuy, Argentina **a.** Ladrillos cerámicos huecos; **b.** Tubos de PVC. Fotos: M. S. Akmentins.

descarta su efectividad en otros ensambles de especies con predominancia de ranas trepadoras.

Otra cuestión a considerar es que las cubiertas y refugios artificiales pueden funcionar como refugio de animales que representan un riesgo para la integridad física o la salud del observador, animales ponzoñosos como arañas, alacranes y ofidios o vectores de enfermedades como los ratones. Por esta razón se recomienda tener en consideración los posibles riesgos a la hora de la colocación y al revisar las líneas de cubiertas artificiales.

## Variables asociadas

Dependiendo del objetivo de investigación, es importante registrar variables asociadas. En cada sitio y en cada muestreo es importante registrar, aun de manera sencilla, las variables ambientales diarias (temperatura del aire, humedad relativa, precipitación diaria (con un pluviómetro en cada sitio, por ejemplo). Asimismo, en cada sitio de muestreo, es posible evaluar la cobertura vegetal, profundidad de hojarasca o altura del pastizal, y en ambientes boscosos también puede considerarse la cobertura del dosel en el sitio a través de aplicaciones celulares y de manera sencilla (por ej. Canopeo app. <http://canopeoapp.com/>).

## Bibliografía

1. 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.
2. Lips, K.R.; Reaser, J.K. & Young, B.E. 1999. El Monitoreo de Anfibios en América Latina. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles Herpetological Circular* 30: 1-115.
3. Madalozzo, B.; Santos, T.G.; Santos, M.B.; Both, C. & Cechin, S. 2017. Biodiversity assessment: selecting sampling techniques to access anuran diversity in grassland ecosystems. *Wildlife Research* 44: 78-91.
4. Parris, K.M.; Norton, T.W. & Cunningham, R.B. 1999. A comparison of techniques for sampling amphibians in the forests of south-east Queensland, Australia. *Herpetologica* 33: 271-283.
5. Sutherland, W.J. 2006. Ecological Census Techniques. A Handbook. 2nd. Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
6. Angulo, A.; Rueda-Almonacid, J.V.; Rodríguez-Mahecha, J.V. & La Marca, E. 2006. Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N° 2. Panamericana Formas e Impresos S.A., Bogotá.
7. Dodd Jr., C.K. (ed.). 2010. Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques. Oxford University Press, UK.
8. Thompson, G.G.; Withers, P.C.; Pianka, E.R. & Thompson, S.A. 2003. Assessing biodiversity with species accumulation curves; inventories of small reptiles by pit-trapping in Western Australia. *Austral Ecology* 28: 361-383.
9. Rice, C.G.; Jorgensen, E.E. & Demarais, S. 1994. A comparison of herpetofauna detection and capture techniques in southern New México. *Texas Journal of Agriculture and Natural Resources* 7: 107-114.
10. Ribeiro-Júnior, M.A.; Gardner, T.A. & Ávila-Pires, T.C.S. 2008. Evaluating the effectiveness of herpetofaunal sampling techniques across a gradient of habitat change in a tropical forest landscape. *Journal of Herpetology* 42: 733-749.
11. Donnelly, M.A.; Guyer, C.; Juterbock, J.E. & Alford, R.A. 1994. Techniques for marking amphibians: 277-284. En: Heyer, W.R.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, L.- A.C. & Foster, M.S. (eds.), Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
12. Glorioso, B. M & Waddle, J. H. 2014. A review of pipe and bamboo artificial refugia as sampling tools in anuran studies. *Herpetological Conservation and Biology* 9: 609-625.
13. Bartareau, T.M. 2004. PVC pipe diameter influences the species and sizes of treefrogs captured in a Florida coastal oak scrub community. *Herpetological Review* 35: 150-152.
14. Boughton, R.G.; Staiger, J. & Franz, R. 2000. Use of PVC pipe refugia as a sampling technique for hylid treefrogs. *American Midland Naturalist* 144: 168-177.
15. Moulton, C.A.; Fleming, W.J.; & Nerney, B.R. 1996. The use of PVC pipes to capture hylid treefrogs. *Herpetological Review* 27: 186-187.



## 3.4 MONITOREO ACÚSTICO PASIVO (MAP)

**Martín Boullhesen<sup>1,2</sup> & Mauricio S. Akmentins<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Argentina.*

<sup>2</sup> *Instituto de Investigaciones de Biodiversidad Argentina (PIDBA), Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.*

Los recientes avances en la tecnología de grabadores digitales automatizados (GDA), han permitido que el **Monitoreo Acústico Pasivo** (MAP) gane relevancia como metodología empleada en estudios a corto y largo plazo en ecosistemas terrestres. Sin embargo, continúa existiendo un sesgo en el uso de esta tecnología hacia el Hemisferio Norte<sup>(1)</sup>. El relevamiento de la riqueza de especies de anfibios anuros mediante MAP ha mostrado ser igual o más eficiente que otros métodos estandarizados<sup>(2,3,4)</sup>, pudiendo realizar relevamientos simultáneos en múltiples localidades, cubriendo así grandes extensiones geográficas<sup>(5)</sup>. El uso de MAP puede brindar valiosa información acerca de los patrones temporales de la reproducción en distintos grupos de anuros, desde la fenología acústica diaria y estacional de una sola especie hasta los patrones reproductivos de un ensamble de especies<sup>(6-10)</sup>. Además, puede ser implementado para evaluar distintas respuestas de las especies de anuros a las condiciones climáticas donde habitan<sup>(11)</sup>, lo cual ha cobrado gran relevancia para el estudio de los posibles efectos de la crisis climática global sobre las comunidades acústicas<sup>(12)</sup>.

Quizás uno de los usos más relevantes del MAP es en programas de búsqueda y monitoreo de especies de anuros amenazadas y/o con hábitos de vida crípticos<sup>(13-15)</sup>. El cual se vuelve mucho más efectivo mediante la incorporación de software de reconocimiento automatizado de cantos<sup>(16-20)</sup>.

Una cuestión para tener en cuenta es la enorme cantidad de datos que generan los GDAs, lo cual debe considerarse a la hora del diseño experimental, debido a que se debe contar con la suficiente capacidad de almacenamiento y de procesamiento de datos, más si esto último se realiza de forma manual.

### **Programación/Horarios de los Grabadores Digitales Automatizados**

Según Shirose y colaboradores<sup>(21)</sup> la mayoría de las especies de anuros se detectan durante los primeros 3 minutos de grabación. Esta pauta ha sido empleada posteriormente en estudios de ambientes terrestres utilizando grabadores digitales automatizados o GDAs<sup>(22-24)</sup>. Otros estudios emplearon tiempos de grabaciones más extensos (5 a 15 minutos) donde aumentaron la probabilidad de detección de especies de anuros<sup>(13,18,25)</sup>. En el caso de monitoreos de comunidades de anuros o para la detección de especies que vocalizan esporádicamente se puede emplear una programación de 3 minutos por hora, ya sea continuos o bien 1 minuto cada 19 minutos, obteniendo un total de 72 minutos/día. En caso de monitoreos a largo plazo o para relevar especies que son vocalmente muy activas, con cantos cortos y/o corto periodo de inter canto, se puede utilizar programas más cortos de 1 minuto por hora durante las 24 hs del día<sup>(6-9)</sup>, a fin de optimizar la probabilidad de

detección de las especies objetivo, el consumo de baterías y la capacidad de almacenamiento.

### Tasa de Muestreo (Sampling Rate) y Almacenamiento

La tasa de muestreo o sampling rate es la cantidad de muestras que registra el conversor análogo-digital (grabador) de una señal de sonido en un período de tiempo. La tasa de muestreo se mide en Hertz (Hz) y debe ser al menos el doble de la frecuencia fundamental del sonido que se va a registrar, esto se conoce como Frecuencia de Nyquist<sup>(26)</sup>. Es muy importante conocer el sistema de estudio donde se va a grabar (por ejemplo: frecuencia de cantos de las especies de anuros) para evitar sonidos fantasmas o Aliasing<sup>(26)</sup>. Dado que las frecuencias dominantes del canto de anuncio de las especies de anuros registradas en Argentina se encuentran por debajo de los 6000 Hz<sup>(27)</sup>, con una tasa de muestreo de hasta 16000 Hz se garantiza cubrir el rango de frecuencias de las especies a registrar en un ensamble de especies en caso de un monitoreo de diversidad. Por ejemplo, si *Rhinella arenarum* canta con una frecuencia dominante de 1250 Hz<sup>(28)</sup>, la tasa de muestreo debe ser de al menos 4000 Hz con el fin de abarcar la estructura completa de canto de la especie y evitar sonidos fantasmas. A tener en cuenta que, cuanto mayor sea la tasa de muestreo que se elija, mayor será la diversidad de sonidos ambientales que registrará la grabación. Pero a su vez, los archivos de sonido serán más pesados, ocupando un mayor espacio en la tarjeta de memoria. Los formatos de almacenamiento vienen incluidos en los GDAs y por lo general son: .WAC .WAV y .mp3 son los más frecuentes. Es preferible grabar en formato descomprimido (.WAV) con el fin de obtener así una mejor calidad de sonido<sup>(29)</sup>. La desventaja de este formato descomprimido es que los archivos de audio son más pesados.

### Cuantización

Es la digitalización de las señales de sonido en el conversor análogo-digital (grabador)<sup>(26)</sup>. La señal está codificada en bits. Cuantos más bits sean empleados para la codificación de la señal mejor calidad de sonido se obtendrá. Aconsejamos grabar en 24 bits. Tener en cuenta que, cuanto más resolución se desee obtener, más pesados serán los archivos de sonido generados.

### Filtros

Las grabaciones se pueden filtrar con el objetivo de eliminar sonidos no deseados. Muchos sistemas de grabación automáticos tienen incluidas opcio-

nes de filtrado. Se las pueden encontrar como: high band pass filter= filtra sonidos por debajo de los 200 Hz o 1000 Hz; low band pass filter= filtra sonidos por encima de los 10000 Hz. Además, los distintos programas que se utilizan para analizar las grabaciones tienen herramientas de filtrado (ver apartado **Programas**).

### **Ganancia de Decibeles**

Los decibeles (dB) son la unidad de medida de la amplitud de una señal de sonido. El investigador/a puede optar por amplificar las señales de sonido que registra el grabador, para aumentar la proporción señal ruido. Esto se puede hacer mediante la herramienta dB gain (ver en las opciones de configuración de cada una de las unidades de grabación).

### **Micrófonos**

El tipo de micrófono y cantidad de micrófonos incorporado al GDA dependerá del modelo y del objetivo del estudio. Se puede optar por micrófonos direccionales del tipo supercardioide en caso de necesitar obtener grabaciones de alta calidad o utilizar micrófonos multidireccionales que permiten obtener mayor diversidad de fuentes de sonido con una menor resolución.

Cuando dos micrófonos están disponibles en el sistema de grabación (pueden ser incorporados al GDA o externos) las grabaciones se pueden realizar en formato estéreo. Para el relevamiento de la diversidad de anuros, recomendamos el formato MONO, considerando orientar el micrófono hacia donde se encuentre el sitio reproductivo de las especies objetivo. Tener en cuenta que el formato estéreo duplica el tamaño del archivo de sonido.

### **Diseño Espacial**

La instalación de los grabadores digitales automatizados estará supeditado al objetivo del estudio. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta algunos detalles antes de instalarlos. Hay que tener en cuenta el alcance efectivo de los micrófonos conectados o incluidos en el sistema, ya que en función de las características de los micrófonos se colocarán a la altura y distancia que maximicen la efectividad del registro sonoro. Otra variable a considerar es el tipo de ambiente y las especies objetivo. Se pueden colocar en grillas equidistantes (separadas entre sí por al menos la distancia efectiva de grabación de cada GDA), de manera aleatoria, o bien a lo largo de una transecta.

Los grabadores se pueden dejar instalados de manera permanente<sup>(5)</sup> o bien, cambiarlos de lugar a intervalos regulares de tiempo. Esto dependerá del objetivo del estudio, la duración de las baterías y la capacidad de almacenamiento de los GDAs utilizados. La mínima distancia entre grabadores debe ser de 250 m. Teniendo en cuenta que las señales de la mayoría de los anuros decaen a partir de los 250 m en un rango de entre 1 y 5 kHz<sup>(30)</sup>.

En caso de querer cubrir completamente la fenología vocalización de una especie o un ensamble de especies, es aconsejable dejar al menos un GDA fijo que cubra los 365 días del año. En caso de conocer las fechas aproximadas de inicio y fin de la temporada de actividad de los anfibios de una región (en particular en las regiones donde la época de lluvias está acotada a una época específica del año), se puede optar por comenzar las grabaciones con un mes de antelación y extenderlas hasta un mes después de la finalización a fin de asegurar obtener un registro completo de la actividad de vocalización de o las especies objetivo. Sugerimos que, con el fin de obtener un mínimo de información para un estudio de patrones de vocalización específico de anuros dejar instalados los GDAs durante al menos 30 días por sitio.

### Datos asociados

Por ser animales ectotermos, la temperatura es uno de los parámetros ambientales que más influye en la fisiología y el comportamiento de los anfibios<sup>(31)</sup>. Debido a que la mayoría de las especies vocalizan en un amplio rango de temperaturas, las características del canto pueden variar entre individuos<sup>(32)</sup>. Los caracteres temporales de las vocalizaciones, como ser la duración o la tasa de canto (número de cantos emitidos en un período de tiempo determinado), son los más afectados por la temperatura ambiente<sup>(33)</sup>. Es por ello que todo registro bioacústico debe estar complementado por el dato asociado de la temperatura del aire en caso de especies terrestres y/o arborícolas y de la temperatura del agua en caso de especies que vocalicen parcial o totalmente sumergidas<sup>(34)</sup>.

En caso de construir el GDA es aconsejable agregar un registrador automatizado (data logger) de la temperatura ambiente y en caso de adquirir modelos comerciales hay que tener en cuenta que algunos incluyen el registro asociado de temperatura ambiente a cada grabación (ver apartado **Grabadores Digitales Automatizados**). El registro de las variables asociadas debe ser a los mismos de tiempo al cual se haya programado el GDA para realizar los registros bioacústicos (**Figura 3.4.1**).



**Figura 3.4.1.** Descarga de datos de un registrador automatizado HOBO® MX2301 de temperatura y humedad ambiente acoplado a un grabador Wildlife Acoustics® Song Meter SM4 durante un estudio de los paisajes sonoros del Parque Nacional Calilegua. Foto: M. Boullhesen.

Dependiendo del tipo de estudio, se pueden registrar otros datos asociados de extrema utilidad a la hora del análisis de los registros bioacústicos obtenidos. Tales como el porcentaje de humedad relativa ambiente (RH%), ya que la mayoría de los registradores automáticos de variables ambientales incluyen las variables de temperatura y RH%. Los anuros que componen un ensamble acústico, responden de manera diferencial a las variables climáticas<sup>(35,36)</sup>. Por lo tanto, es aconsejable registrar todos los datos asociados que se puedan a la grabación. Entre los datos se incluyen: precipitación acumulada, presión barométrica, intensidad de luz (fotoperiodo - luz), velocidad del viento, entre otros.

En caso de no contar con un pluviómetro manual o automatizado para registrar la precipitación acumulada, una forma alternativa de detectar precipitaciones es desde las mismas grabaciones por el sonido de las gotas golpeando la cubierta del GDA o el micrófono. Cabe destacar que sólo la lluvia de moderada a fuerte puede ser detectada por este método<sup>(7)</sup>. La detección de lluvia puede hacerse en forma manual (registrando la presencia/ausencia de lluvia en las grabaciones) en caso de sets de datos bioacústicos acotados o bien utilizar herramientas informáticas de reconocimiento automatizado para el preprocesamiento de datos como el paquete *hardRain* del entorno R<sup>(37,38)</sup>.

### Protección de los GDAs y micrófonos

Debido a que los GDAs son instalados a la intemperie por largos periodos de tiempo, es necesario tomar recaudos para su protección y así garantizar su correcto funcionamiento. Los factores ambientales que pueden afectar a los GDAs y a los micrófonos pueden ser abióticos o bióticos y el nivel de amenaza dependerá del tipo de ambiente en donde equipos son colocados.

El factor ambiental abiótico que afecta en mayor medida a los equipos electrónicos es la humedad, tanto la humedad relativa ambiente como las precipitaciones (**Figura 3.4.2**). El otro factor abiótico a considerar es la temperatura ambiente y en lo particular las temperaturas elevadas producto de la insolación directa. La forma más sencilla de proteger a los GDAs es colocarles por encima una superficie que haga de cubierta para evitar que los equipos se percurdan por el efecto de la insolación o la lluvia. En caso de contar con un GDA con micrófono externo unido por un cable, se puede colocar la unidad dentro de un compartimiento estanco, lo que también los protege de la humedad ambiental. En el caso de los micrófonos externos, siempre conviene protegerlos de la lluvia directa con algún tipo de cobertura, lo que secundariamente permite detectar la caída de lluvia en las grabaciones.

El principal factor biótico para tener en cuenta a la hora de instalar un GDA, sobre todo si es por largos periodos de tiempo, son los artrópodos. Las hor-



**Figura 3.4.2.** Grabador AudioMoth v1.1.0 utilizado para el monitoreo de *Ceratophrys ornata* en una charca temporaria, colocado dentro de una bolsa plástica hermética para protegerlo de la humedad. Foto: G. Agostini, proyecto Gigante de las Pampas (Facebook e Instagram: @gigantedelaspampas)

migas y/o termitas pueden destruir los cierres herméticos de goma que mantienen estancos a los GDAs. Para evitar esto, se recomienda instalar el GDA sobre una superficie por la cual no puedan trepar o realizar inspecciones frecuentes de los equipos a fin de detectar posibles daños. Aunque menos frecuente, los GDAs pueden ser dañados por aves o por mamíferos, esto ocurre principalmente en los micrófonos y en los cables. Las coberturas pueden proteger a las pantallas de viento de los micrófonos de la destrucción causada por animales (**Figura 3.4.3**).

Debido a que los GDAs se despliegan durante largos periodos de tiempo, el continuo hecho de abrirlos para la descarga de datos o el reemplazo de baterías hace que el sistema para mantener su interior estanco falle e ingrese humedad. Se debe evitar introducir en la unidad materiales hidrófilos como silicagel, si bien son útiles para mantener secos los sistemas electrónicos en condiciones de almacenamiento, estos pueden generar la entrada de una mayor cantidad de humedad en condiciones de campo.

### Grabadores Digitales Automatizados

Existen instructivos disponibles sobre los componentes necesarios e instrucciones de cómo construir un GDA (<sup>39-41</sup>, <https://www.instructables.com/>



**Figura 3.4.3.** Protección contra los factores ambientales abióticos y bióticos de un grabador Wildlife Acoustics© Song Meter SM2 utilizado para la búsqueda acústica pasiva de *Gastrotheca cristiani*. Foto: M. Boullhesen.



ARUPi-A-Low-Cost-Automated-Recording-Unit-for-Soun/). Por otra parte, en los últimos años se han desarrollado una serie de GDAs comerciales de costos y características variables. En la **Tabla 3.4.1** se presenta una lista de grabadores disponibles con sus características.

### Programas

Con las grabaciones obtenidas es necesario utilizar un programa para poder escucharlas y para la visualización de los caracteres temporales y espectrales. Estos programas a su vez son necesarios para el análisis y toma de datos de los registros bioacústicos. La elección del programa dependerá del objetivo del estudio. A continuación se detallan una lista de los programas más utilizados:

*Adobe Audition / Cool Edit Pro:* Este programa se recomienda si se instaló un grabador automatizado para realizar un monitoreo a largo plazo y sólo se busca detectar la presencia/ausencia de determinada especie mediante sus cantos. Permite un manejo de una gran cantidad de archivos de sonido, visualizando rápidamente los espectrogramas y oscilogramas. A su vez, permite obtener fácilmente los datos de los parámetros temporales y espectrales de los sonidos registrados

Link: <https://www.adobe.com/la/products/audition/free-trial-download.html>

**Nota:** Programa pago con suscripción.

*Raven Pro:* Es un programa especialmente desarrollado para la descripción de cantos (sonido). Permite realizar mediciones precisas de los parámetros espectrales y temporales de los sonidos de interés. Sin embargo, también puede ser utilizado en grabaciones obtenidas a través del MAP. Algunas consideraciones para el uso del Raven en el MAP: que la proporción señal ruido del canto sea buena (mayor o igual al 30%), esto será determinante para los análisis de los caracteres espectrales. Las grabaciones tienen que ser lo más limpias posibles, sin ruido de fondo y cuando la especie esté vocalizando sola (en lo posible). Incluye una herramienta de detección automática de patrones de sonidos y herramientas de filtrado de sonidos no deseados (por ejemplo: ruido de fondo).

Link: <https://ravensoundsoftware.com>

**Nota:** Raven Pro Versión 1.6 actualmente se encuentra sin cargo para Argentina.

GDA	Costo en U\$D	Dimensiones (largo / alto / fondo)	Peso (en g)	Duración Baterías	Estanco	Control Remoto	Tasa de muestreo (kHz)	Micrófono	Datos Asociados	GPS	dB Gain	Software
AudioMoth v1.1.0	74	48x58x18 mm	80	25 a 30 días. Requiere 3 pilas alcalinas tipo AA	Opcional Audio-moth IPX7 Case por 40 USD	No	0 a 384	un micrófono incluido	No posee	No incluido	No incluye	AudioMoth
AudioMoth v1.2.0	84	48x58x18 mm	80	25 a 30 días. Requiere 3 pilas alcalinas tipo AA	Opcional Audio-moth IPX7 Case por 40 USD	No	0 a 384	un micrófono incluido	No posee	No incluido	No incluye	AudioMoth
SM4	850	218x186x78 mm	730	hasta 400 horas. con pilas alcalinas (14000 mAh a 1,5 V cada una). Hasta 250 horas con pilas de NiMH de baja auto-descarga (LSD) (9500 mAh a 1,2 V cada una)	Sí	No	0 a 96	dos micrófonos externos incluidos	Temperatura	No incluido	Sí	SongScope, Kaleidoscope

**Tabla 3.4.1.** Lista de grabadores disponibles con sus características.

SM4 mini	500	123x168x36 mm	290	Hasta 240 horas con 4 pilas AA (o hasta 1200 horas con 6 baterías de litio en un paquete opcional).	Sí	Sí (vía Bluetooth)	0 a 96	un micrófono externo	Temperatura	No incluido	Sí	SongScope, Kaleidoscope
SM/micro	249	101x74x28 mm	195	hasta 200 horas con 3 pilas (AA, Alcalinas) o pilas recargables.	Sí	Sí (vía Bluetooth)	8 a 96	un micrófono externo	No posee	No incluido	Sí	SongScope, Kaleidoscope
SOLO	133			5 días utilizando batería sólida USB. 40 días utilizando batería externa sólida de 12 V.	Sí	No	0 a 192	un micrófono externo	No posee	No incluido		

*SongScope*: Recomendado para analizar grabaciones en MAP prolongados. Permite una visualización rápida de los espectrogramas y es recomendado para el monitoreo de especies (presencia/ausencia de cantos).

Link: <https://wildlifeacoustics.com>

**Nota:** Este programa es sin cargo.

*Kaleidoscope*: Es un programa empleado para la detección automática de patrones de sonidos específicos. Recomendado para un MAP prolongado. En el Kaleidoscope se pueden analizar miles de grabaciones de una manera rápida, precisa y eficiente. Sus herramientas de “clusters” y “classifiers” permiten al usuario agrupar cantos de especies según sus parámetros espectrales. Asimismo, el programa permite agrupar distintas vocalizaciones de una sola especie utilizando algoritmos de machine learning.

Recomendamos su uso para la detección automática de cantos en programas de monitoreo a largo plazo. No es recomendable clasificar distintas vocalizaciones de especies (distintos sonidos de interés) a la vez. Tampoco es recomendable para emplear el programa en grabaciones con muchas vocalizaciones simultáneas, o con mucho ruido de fondo, como suelen ser los coros explosivos de anuros.

Link: <https://wildlifeacoustics.com>

**Nota:** Este programa tiene un costo de suscripción anual.

*Avisoft*: Recomendado para analizar grabaciones en MAP prolongados y para el análisis de parámetros espectrales y temporales de sonidos. Este programa le proporcionará al investigador/a una gran cantidad de herramientas para la detección de cantos, análisis de caracteres espectrales y monitoreo rápido de señales acústicas.

Link: <https://avisoft.com/>

**Nota:** Este programa tiene un costo de suscripción anual.

*ARBIMON*: Es una plataforma web desarrollada para analizar miles de grabaciones de manera intuitiva y rápida. Es recomendada para un MAP prolongado. Facilita el análisis de una gran cantidad de grabaciones, empleando algoritmos de machine learning. El usuario puede entrenar sonidos (regiones de interés en el espectro) de especies particulares y luego buscarlos automáticamente en todo un set de datos. El flujo de trabajo consiste en cuatro

pasos: 1) visualización, 2) validación de especies, 3) generación de modelos, y 4) aplicación de modelos (clasificación).

Link: <https://www.sieve-analytics.com/arbimon>

**Nota:** Este programa tiene un costo de suscripción anual.

*Entorno R:* El entorno de programación R, ofrece una serie de paquetes muy útiles para el análisis de sonidos y la detección automatizada de unidades de interés. Puede ser empleado en un MAP. Los paquetes en el entorno R no son recomendables para el reconocimiento automatizado de sonidos. Usualmente, se los emplea para el análisis de grabaciones individuales y generación de figuras (espectrogramas, poder espectral, ondas de sonido) utilizados en las publicaciones y presentaciones. Entre los más usados se pueden encontrar: *seewave*<sup>(41)</sup>, *monitoR*<sup>(43)</sup>, *tuneR*<sup>(44)</sup>, *warbleR*<sup>(45)</sup> y *Rraven*<sup>(46)</sup>.

Link: <https://cran.r-project.org/>

**Nota:** Esta plataforma no tiene costo de suscripción.

*Koe:* Es una plataforma virtual donde los usuarios pueden analizar las grabaciones. Recomendada para MAPs. Esta plataforma permite la visualización, segmentación, filtrado y exportado de unidades acústicas, y análisis de parámetros espectrales (sintaxis). Está enfocado para analizar las vocalizaciones de animales.

Link: <https://koe.io.ac.nz/>

**Nota:** Es un programa gratuito.

## Bibliografía

1. Sugai, L.S.M.; Silva, T.S.F.; Ribeiro J.W. Jr. & Llusia, D. 2019. Terrestrial passive acoustic monitoring: review and perspectives. *BioScience* 69:15-25.
2. Acevedo, M.A. & Villanueva-Rivera, L.J. 2006. From the field: Using automated digital recording systems as effective tools for the monitoring of birds and amphibians. *Wildlife Society Bulletin* 34: 211-214.
3. Madalozzo, B.; Santos, T.G.; Santos, M.B.; Both, C. & Cechin, S. 2017. Biodiversity assessment: selecting sampling techniques to access anuran diversity in grassland ecosystems. *Wildlife Research* 44: 78-91.
4. Boullhesen, M.; Vaira, M.; Barquez, R.M. & Akmentins, M.S. 2021. Evaluating the efficacy of visual encounter and automated acoustic survey methods in anuran assemblages of the Yungas Andean forests of Argentina. *Ecological Indicators* 127: 107750.
5. Aide, T.M.; Corrada-Bravo, C.; Campos-Cerqueira, M.; Milan, C.; Vega, G. & Alvarez, R. 2013. Real-time bioacoustics monitoring and automated species identification. *PeerJ* 1: 103.
6. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Acosta, J.C. 2007. Actividad temporal de *Leptodactylus*

- mystacinus* (Anura: Leptodactylidae) en el departamento Valle Fértil, San Juan, Argentina. *Multequina* 16: 65-71.
7. Akmentins, M.; Pereyra, L.; Sanabria, E. & Vaira, M. 2015. Patterns of daily and seasonal calling activity of a direct developing frog of the subtropical Andean forests of Argentina. *Bioacoustics* 24: 89-99.
  8. Pereyra, L.C.; Akmentins, M.S.; Sanabria, E.A. & Vaira, M. 2016. Diurnal? Calling activity patterns reveal nocturnal habits in the aposematic toad *Melanophryniscus rubriventris*. *Canadian Journal of Zoology* 94: 497-503.
  9. Boullhesen, M.; Salica, M.J.; Pereyra, L. C. & Akmentins, M.S. 2019. Actividad vocal diaria y su relación con claves ambientales en un ensamble de anuros en las Yungas de Jujuy, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 33: 59-70.
  10. Ulloa, J.S.; Aubin, T.; Llusia, D.; Courtois, É.A.; Fouquet, A.; Gaucher, P. & Sueur, J. 2019. Explosive breeding in tropical anurans: environmental triggers, community composition and acoustic structure. *BMC Ecology* 19: 1-17.
  11. Ospina, O.E.; Villanueva-Rivera, L.J.; Corrada-Bravo, C.J. & Aide, T.M. 2013. Variable response of anuran calling activity to daily precipitation and temperature: implications for climate change. *Ecosphere* 4: 1-12.
  12. Krause, B. & Farina, A. 2016. Using ecoacoustic methods to survey the impacts of climate change on biodiversity. *Biological Conservation* 195: 245-254.
  13. Williams, P.J.; Engbrecht, N.J.; Robb, J.R.; Terrell, V.C.K. & Lannoo, M.J. 2013. Surveying a threatened amphibian species through a narrow detection window. *Copeia* 2013: 552-56.
  14. Willacy, R.J.; Mahony, M. & Newell, D.A. 2015. If a frog calls in the forest: Bioacoustic monitoring reveals the breeding phenology of the endangered Richmond Range mountain frog (*Philoria richmondensis*). *Austral Ecology* 40: 625-633.
  15. Measey, G.J.; Stevenson, B.C.; Scott, T.; Altwegg, R. & Borchers, D.L. 2017. Counting chirps: Acoustic monitoring of cryptic frogs. *Journal of Applied Ecology* 54: 894-902.
  16. Waddle, J.H.; Thigpen, T.F. & Glorioso, B.M. 2009. Efficacy of automatic vocalization recognition software for anuran monitoring. *Herpetological Conservation and Biology* 4:384-388.
  17. Estrella, A.; Nicolalde, D.A. & Escobar, C. 2018. Detection range estimation of frog calls in Ecoacoustics long recordings. *Revista Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 106: 157-178.
  18. Pérez-Granados, C.; Schuchmann, K.-L.; Ramoni-Perazzi, P. & Marques, M.I. 2020. Calling behaviour of *Elachistocleis matogrosso* (Anura, Microhylidae) is associated with habitat temperature and rainfall. *Bioacoustics* 29: 670-683.
  19. Terneux, A.E.; Nicolalde, D.; Nicolalde, D. & Merino-Viteri, A. 2019. Presence-absence estimation in audio recordings of tropical frog communities. *arXiv* 1901.02495.
  20. Emmett, C.; Hending, D.; Davis, D.; McCabe, G. & Bray, T.C. 2020. Hearing Ghosts: Acoustic survey protocol and vocalization characterization for lemur leaf frogs. *Herpetological Review* 51: 24-29.
  21. Shirose, L.J.; Bishop, C.A.; Green, D.M.; MacDonald, C.J.; Brooks, R.J. & Helferty, N.J. 1997. Validation tests of an amphibian call count survey technique in Ontario, Canada. *Herpetologica* 53: 312-320.
  22. Llusia, D.; Márquez, R.; Beltrán, J.F.; Benítez, M. & do Amaral, J.P. 2013. Calling behaviour under climate change: Geographical and seasonal variation of calling temperatures in ectotherms. *Global Change Biology* 19: 2655-2674.
  23. Márquez, R.; Llusia, D. & Beltrán, J. F. 2014. Aplicación de la bioacústica al seguimiento de anfibios. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 25: 52-58.
  24. Plenderleith, T.L.; Stratford, D.; Lollback, G.W.; Chapple, D.G.; Reina, R.D. & Hero, J.M. 2018. Calling phenology of a diverse amphibian assemblage in response to meteorological conditions. *International Journal of Biometeorology* 62: 873-882.
  25. Sugai, L.S.M.; Desjonquères, C.; Silva, T.S.F. & Llusia, D. 2020. A roadmap for survey designs in terrestrial acoustic monitoring. *Remote Sensing in Ecology and Conservation* 6: 220-235.
  26. Angulo, A.; Rueda-Almonacid, J.V.; Rodríguez-Mahecha, J.V. & La Marca, E. 2006. Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N° 2. Panamericana Formas e Impresos S.A., Bogotá.

27. Stranek, R.; de Olmedo, E.V. & Carrizo, G.R. 1993. Catálogo de Voces de Anfibios Argentinos. Parte 1. Editorial L.O.L.A., Buenos Aires.
28. Salas, N.E.; Zavattieri, M.V.; Di Tadam, I.E.; Martino, A.L. & Bridarolli, M.E. 1998. Bioacustical and etho-ecological features in amphibian communities of southern Córdoba province (Argentina). *Cuadernos de Herpetología* 12: 37-46.
29. Steelman, C.K. & Dorcas, M.E. 2010. Anuran calling survey optimization: developing and testing predictive models of anuran calling activity. *Journal of Herpetology* 44: 61-68.
30. MacLaren, A.R., Crump, P.S., Royle, J.A., Forstner, M.R., 2018. Observer-free experimental evaluation of habitat and distance effects on the detection of anuran and bird vocalizations. *Ecology and Evolution* 8: 12991-13003.
31. Hillman, S.S. 2009. Ecological and Environmental Physiology of Amphibians. Oxford University Press, Oxford.
32. Dias, T.M.; Prado, C.P. & Bastos, R.P. 2017. Nightly calling patterns in a Neotropical gladiator frog. *Acta Ethologica* 20: 207-214.
33. Narins, P.M.; Feng, A.S.; Fay, R.R. & Popper, A.N. 2007. Hearing and Sound Communication in Amphibians. Springer, New York.
34. Köhler, J.; Jansen, M.; Rodríguez, A.; Kok, P.J.R.; Toledo, L.F.; Emmrich, M.; Glaw, F.; Haddad, C.; Liver Rödel, M. & Vences, M. 2017. The use of bioacoustics in anuran taxonomy: theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 4251: 1-124.
35. Saenz, D.; Fitzgerald, L.A.; Baum, K.A. & Conner, R.N. 2006. Abiotic correlates of anuran calling phenology: the importance of rain, temperature, and season. *Herpetological Monographs* 20: 64-82.
36. Wells, K.D. 2017. The Ecology and Behavior of Amphibians. University of Chicago Press, Chicago.
37. Metcalf, O.C.; Lees, A.C.; Barlow, J.; Marsden, S.J. & Devenish, C. 2020. hardRain: An R package for quick, automated rainfall detection in ecoacoustic datasets using a threshold-based approach. *Ecological Indicators* 109: 105793.
38. RStudio Team. 2015. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio Inc, Boston, MA.
39. Peterson, C.R. & Dorcas, M.E. 1994. Automated data acquisition: 47-57. *Err*: Heyer, W.R.; McDiarmid, R.W.; Donnelly, M. & Hayek, L. (eds.). Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
40. Barichivich, W.J. 2003. Appendix IV: Guidelines for building and operating remote field recorders: 87-96. *En*: Dodd Jr., C.K.(ed.). Monitoring Amphibians in Great Smoky Mountains National Park. U.S. Geological Survey Circular no. 1258. U.S. Geological Survey. Tallahassee.
41. Garrido Sanchis, A.; Bertolelli, L.; Hofer, A.M.; Alvarez, M.Y. & Munasinghe, K. 2020. The frogphone: a novel device for real-time frog call monitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 11: 222-228
42. Sueur, J.; Aubin T. & Simonis, C. 2008. seewave: a free modular tool for sound analysis and synthesis. *Bioacoustics* 18: 213-226.
43. Hafner, S. & Katz, J. 2018. monitoR: Acoustic template detection in R. R package version 1.0.7 <http://www.uvm.edu/rsenn/vtcfwru/R/?Page=monitoR/monitoR.htm>.
44. Ligges, U.; Krey, S.; Mersmann, O. & Schnackenberg, S. 2018. tuneR: Analysis of music and speech. <https://CRAN.R-project.org/package=tuneR>.
45. Araya-Salas, M. & Smith-Vidaurre, G. 2017. warbleR: an r package to streamline analysis of animal acoustic signals. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 184-191.
46. Araya-Salas, M. 2017. Raven: connecting R and Raven bioacoustic software. R package version 1.0.2.

**4. TÉCNICAS DE RELEVAMIENTO Y ESTUDIOS  
ESPECÍFICOS**



## 4.1 IDENTIFICACIÓN Y MERCADO DE INDIVIDUOS

**Marcos Vaira<sup>1,2</sup>, Valeria Corbalán<sup>3</sup>, Lorena Quiroga<sup>2,4,5</sup> & Eduardo Sanabria<sup>2,4,5</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425F-QB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (IADIZA), CCT Mendoza-CONICET, Mendoza, Argentina.

<sup>4</sup> Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía Humanidades y Artes, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina.

<sup>5</sup> Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, San Juan, Argentina.

Muchos estudios de laboratorio y de campo requieren técnicas efectivas para la identificación de larvas y anfibios postmetamórficos en el tiempo y el espacio, que permitan diferenciar entre individuos o grupos para estimar parámetros individuales y demográficos tales como: tasas de crecimiento y mortalidad, fecundidad, dinámica de la dispersión y movilidad, tamaño de la población, uso del hábitat, efectos de la alteración del hábitat.

Si bien no existen técnicas que satisfagan completamente las condiciones ideales, siempre resultará deseable que la aplicación de la técnica cumpla en todo lo posible con:

- someter a los ejemplares al menor dolor y estrés posible,
- que sea relativamente fácil de aplicar,
- que sea económica (si se propone para identificar gran número de ejemplares),
- que no aumente la mortalidad y/o reduzca el crecimiento o la reproducción,
- que no tenga efecto sobre el comportamiento de los individuos marcados (o de otros animales hacia los ejemplares marcados),
- que no afecte la probabilidad de captura futura en comparación con ejemplares que no han sido marcados.

Muchas técnicas estadísticas para la estimación de tamaños poblacionales y parámetros demográficos se sustentan en una serie de supuestos que deben considerarse al elegir el tipo de marca: (a) la marca no se pierde, cambia o desaparece durante el tiempo del estudio; (b) no existe posibilidad de identificación errónea de las marcas; y (c) los procedimientos de marcado no alteran las probabilidades de supervivencia o recaptura del individuo marcado<sup>(1)</sup>.

Además de las condiciones referidas al bienestar animal, evitar el doble muestreo y el cumplimiento de supuestos, minimizar el error de registro humano es una condición esperable de todas las técnicas de identificación y marcado. Por ello, la elección de la técnica más adecuada implica equilibrar el posible efecto negativo del procedimiento de marcado, el costo, la eficiencia en el tiempo que insume el procedimiento, la duración de la marca y el valor del dato que se obtendrá con el estudio. La aplicación de marcas que puedan perdurar a lo largo de las etapas ontogenéticas del complejo ciclo de vida de muchos anfibios resulta un gran desafío, ya que las transformaciones físicas inducidas por la metamorfosis y el crecimiento generalmente conllevan a la pérdida o distorsión de la marca.

Existen numerosas técnicas para la identificación y marcado individual de anfibios con sus variantes y ajustes asociados con el tipo de estudio a desarrollar. En líneas generales pueden agruparse de la siguiente manera:

- **Técnicas de identificación por manchas y patrones de la piel**
- **Técnicas de identificación por creación o colocación de marcas**

### **4.1.1 Técnicas de identificación por manchas y patrones de la piel**

Esta técnica no invasiva de identificación utiliza variaciones en los patrones de coloración y/o manchas de la piel para distinguir a los individuos de una población<sup>(2,3)</sup>. Si bien la especie o población elegida para el estudio puede presentar un patrón de color o manchas perceptibles, para que la técnica de identificación sea aceptable y no reduzca su precisión, es recomendable confirmar previamente que el patrón es conservado (dentro de un mismo individuo) y que al mismo tiempo las variaciones inter-individuales son lo suficientemente grandes como para reconocer esos ejemplares. Ha resultado confiable en estudios a corto plazo (semanas o unos pocos meses) dado que los patrones de manchas y la coloración de un individuo pueden cambiar con el tiempo<sup>(4)</sup>. Por ello, se sugiere realizar estudios piloto para asegurar que todos los individuos del estudio tienen patrones únicos y que estos patrones son permanentes a través del tiempo<sup>(5)</sup>.

En algunas especies el patrón de coloración varía a lo largo de la ontogenia o se modifica en respuesta a condiciones ambientales. En el caso de algunas especies de *Boana* del grupo *pulchella*, por ejemplo, un mismo individuo cambia por completo su patrón de coloración en cuestión de horas (en función del sustrato y la luz). Sin embargo, el patrón presente en los muslos de estos mismos ejemplares es invariable y se mantiene a lo largo de la ontogenia (J. Lescano, com. personal).

El registro de patrones o manchas puede realizarse a través de dibujos, esquemas o fotografías. Actualmente, las cámaras fotográficas con alta resolución, zoom óptico y gran capacidad de ampliación permiten que los ejemplares sean fotografiados directamente en su entorno natural, sin la necesidad de capturarlos y alterarlos. Sin embargo, si los patrones o manchas se ubican en porciones del cuerpo que suelen estar ocultas en la posición natural del individuo (región gular y ventral, cara oculta de los fémures) resulta indispensable capturar y mantener inmóvil al ejemplar para el registro de su patrón individual.

El registro a través de dibujos o esquemas implica una serie de consideraciones que deben ser evaluadas. En primer lugar, el registro de cada variación del patrón puede consumir bastante tiempo si el patrón es complejo de replicar en un esquema requiriendo que los individuos sean manipulados o retenidos por mucho tiempo. En estos casos es recomendable contar con una plantilla previa que permita hacer el registro rápido y organizar luego la base de datos de los dibujos obtenidos. En segundo lugar, la organización de los registros obtenidos requiere un procedimiento que ayude a realizar una búsqueda rápida de los esquemas o dibujos ya registrados para confirmar la recaptura de un individuo. Por lo tanto, el uso de esquemas o dibujos puede resultar más adecuado cuando se aplica a patrones simples como puntos, barras o manchas con formas simples de representar y que pueden ordenarse según su cantidad o su posición en el cuerpo para facilitar la consulta. Puede resultar una técnica recomendable cuando el estudio implica pocos ejemplares o están confinados a clausuras experimentales que no requiera volver a capturar el individuo para su identificación.

El registro fotográfico puede ayudar a reducir los tiempos de registro y minimizar la manipulación de los individuos además de facilitar la organización de la base de datos, almacenando las imágenes digitales en carpetas o permitiendo realizar copias impresas de las fotografías obtenidas para utilizarlas en campo. Ambas técnicas de identificación (dibujos o fotografías) pueden requerir mucho tiempo para la identificación y la sucesiva confirmación de recaptura de cada individuo cuando el estudio involucra un número considerable de individuos y durante varios censos a lo largo del tiempo<sup>(5,6)</sup>. Si el estudio requiere la identificación individual de ejemplares de una población relativamente pequeña o se trata de un estudio que implica reconocer individuos dentro de grupos confinados (clausuras experimentales), entonces puede ser recomendable utilizar estos métodos de reconocimiento para reducir las tasas de muestreo doble o garantizar el seguimiento preciso de cada individuo.

Los pasos habituales a seguir para aplicar estas técnicas de identificación requieren comparar cada imagen con una base de datos de imágenes de individuos que ya han sido identificados, y luego agregarlo al registro de un ejemplar previamente reconocido o crear un nuevo registro para el individuo que se suma a la base de identificaciones. Incluso para poblaciones pequeñas de menos de 100 ejemplares, estas comparaciones manuales pueden ser muy demandantes y propensas a cometer errores. Para evitar la revisión manual de gran cantidad de imágenes digitales y reducir el error humano en la identificación de los individuos, existen varias alternativas de programas de asistencia para el reconocimiento automatizado o semiautomatizado a

partir de bancos de imágenes. La comparación asistida por computadora puede limitar la cantidad de fotografías que deben examinarse visualmente para confirmar que dos fotografías tomadas en diferentes momentos corresponden a un mismo individuo. Estos programas de reconocimiento tienen buena precisión para la identificación y reducen en gran medida el tiempo necesario para buscar manualmente entre cientos de imágenes<sup>(7,8,9)</sup>. Sin embargo, estos programas a menudo no se pueden utilizar cuando es necesario identificar individuos en el campo en el mismo instante de la captura y pueden requerir volver a fotografiar cada individuo capturado bajo ciertas condiciones que garanticen su correcta identificación.

La técnica de fotoidentificación se basa esencialmente en fotografiar en condiciones estandarizadas un área de identificación referida usualmente como la región de interés (ROI, que puede ser la fotografía del individuo completo o puede seleccionarse un recuadro con una porción específica de la superficie del cuerpo en la fotografía como la cabeza, el dorso, el vientre o miembros posteriores del individuo). Estos programas comparan el nuevo patrón fotografiado con patrones anteriores almacenados en una biblioteca de imágenes y muestra las coincidencias más probables.

#### **Interactive Individual Identification System (I3S): [reijns.com/i3s/](http://reijns.com/i3s/)**

Es un programa de identificación fotográfica asistida por computadora que se basa en la cantidad, posición y forma de manchas naturales para identificar individuos<sup>(10)</sup>. Consiste en una familia de programas relacionados que varían según el tipo de marca que presentan los individuos de la especie que se pretende identificar. Cuando se manejan una cantidad importante de imágenes puede arrojar un número alto de posibles coincidencias que requieran una verificación manual de cada fotografía para confirmar la identidad o definirlo como un nuevo individuo en la muestra. Existen tres opciones de este programa dependiendo las características de los patrones que presenta la especie a estudiar:

**(i) I3S Classic.** El registro de patrones se limita a la ubicación del centro de las manchas (generalmente con forma de puntos o círculos). Para el reconocimiento asistido, no se utiliza información como la forma o el tamaño de la mancha. A partir de las relaciones espaciales entre los centros de cada mancha, se utiliza una fórmula para calcular una medida de similitud. Para poder calcular esta medida con precisión, se requiere un número suficiente de puntos, normalmente de 12 a 30. Se recomienda para especies con buena cantidad de marcas y un área de identificación estable (es decir, que la super-

ficie corporal que se fotografía no sea muy susceptible a curvarse) dado que las sucesivas fotografías de un mismo individuo pueden ser muy diferentes por la postura que adquiere el ejemplar cada vez que lo fotografiamos.

Si el número de manchas es bajo o muestran una gran variación en tamaño y forma, se sugiere utilizar las versiones I3S Spot o I3S Pattern:

**(ii) I3S Spot.** Esta versión no solamente registra la ubicación de la mancha, sino que se puede incluir la forma de la marca dibujando una elipse de ajuste a su alrededor. De esta manera, la herramienta de reconocimiento utiliza información sobre la forma y el tamaño, lo que permite excluir posibles coincidencias mediante restricciones de forma. Estas restricciones consideran el área de la elipse para eliminar individuos con similitudes en la posición de las manchas pero con diferencias en su tamaño o forma.

**(iii) I3S Pattern.** Esta versión de la herramienta se aconseja para especies con marcas difíciles de registrar utilizando puntos centrales o elipses que las envuelvan. También puede ser adecuada para especies con muchas marcas pequeñas, lo que dificulta elegir aproximadamente 30 manchas de manera consistente. Solo requiere que se identifiquen tres puntos de referencia y el área de identificación general.

**Extract—Compare** <http://conservationresearch.org.uk/Home/ExtractCompare/frogs.html>

En esta técnica de fotoidentificación el proceso consiste escanear patrones a partir de una fotografía al ajustar un modelo de superficie 3D a la imagen. El programa captura un patrón que no se ve afectado por el ángulo o la postura de la cámara.

Existen también iniciativas más recientes que si bien sus desarrollos y plataformas colaborativas no han sido puestas a prueba en anfibios pueden ser alternativas valiosas para explorar:

**Image-Based Ecological Information System (IBIES) - HotSpotter**

**WildMe** [www.wildme.org/#/](http://www.wildme.org/#/)

**Wildlife Photo-ID network** <https://archive.uef.fi/en/web/photo-id/>

### 4.1.2 Técnicas de marcado

En los casos en que los individuos de la especie o población que se pretende estudiar no posean patrones de manchas y/o características de coloración que permitan distinguir a los individuos entre sí, puede considerarse utilizar otras técnicas que implican la creación o colocación de marcas en el cuerpo de los individuos capturados que permitirán su reconocimiento en una captura posterior o dentro de un grupo de individuos que se mantienen confinados en una clausura<sup>(6)</sup>. Existen diferentes técnicas de marcado con numerosas variantes según el objetivo del estudio y el tamaño, la forma o el estadio de desarrollo de los individuos que se pretenden identificar.

Todas estas variantes pueden agruparse en las siguientes categorías:

- corte de falanges (*toe-clipping* o *toe-tipping*)
- etiquetas electrónicas pasivas internas (*Passive Integrated Transponder, PIT*)
- implantes visuales de elastómeros (*Visual Implant Elastomer, VIE*)
- implantes visuales alfanuméricos (*Visual Implant Alphanumeric, VIA*)
- tinciones y tatuajes
- cinturones y piercings
- marcado de perlas

**Corte de falanges.** Esta técnica es una de las más utilizadas para marcar anuros y salamandras<sup>(6,11,12)</sup>. Sin embargo, su utilización ha generado numerosas controversias relacionadas con la ética y el bienestar animal<sup>(13,14,15)</sup> y por haberse detectado en ciertos estudios una disminución en la probabilidad de recaptura en algunas especies de anfibios<sup>(16)</sup>. Otro inconveniente reportado con el corte de falanges en los estudios a largo plazo (varios años) es la posibilidad de regeneración tisular observado en algunas especies<sup>(17,18)</sup>. Por el contrario, la técnica ha sido bien valorada por muchos estudios por considerarla como la más simple de aplicar, de bajo costo, con impactos controlables para el bienestar de los ejemplares manipulados y operativamente como la mejor o única técnica posible de aplicar para muchas especies<sup>(13,15)</sup>. Con todas las consideraciones y medidas de higiene y salud puestas en consideración, los cortes de falanges son utilizados además como fuente de ADN para estudios genéticos y para identificar enfermedades implicadas en la disminución de muchas poblaciones de anfibios<sup>(13,14)</sup>.

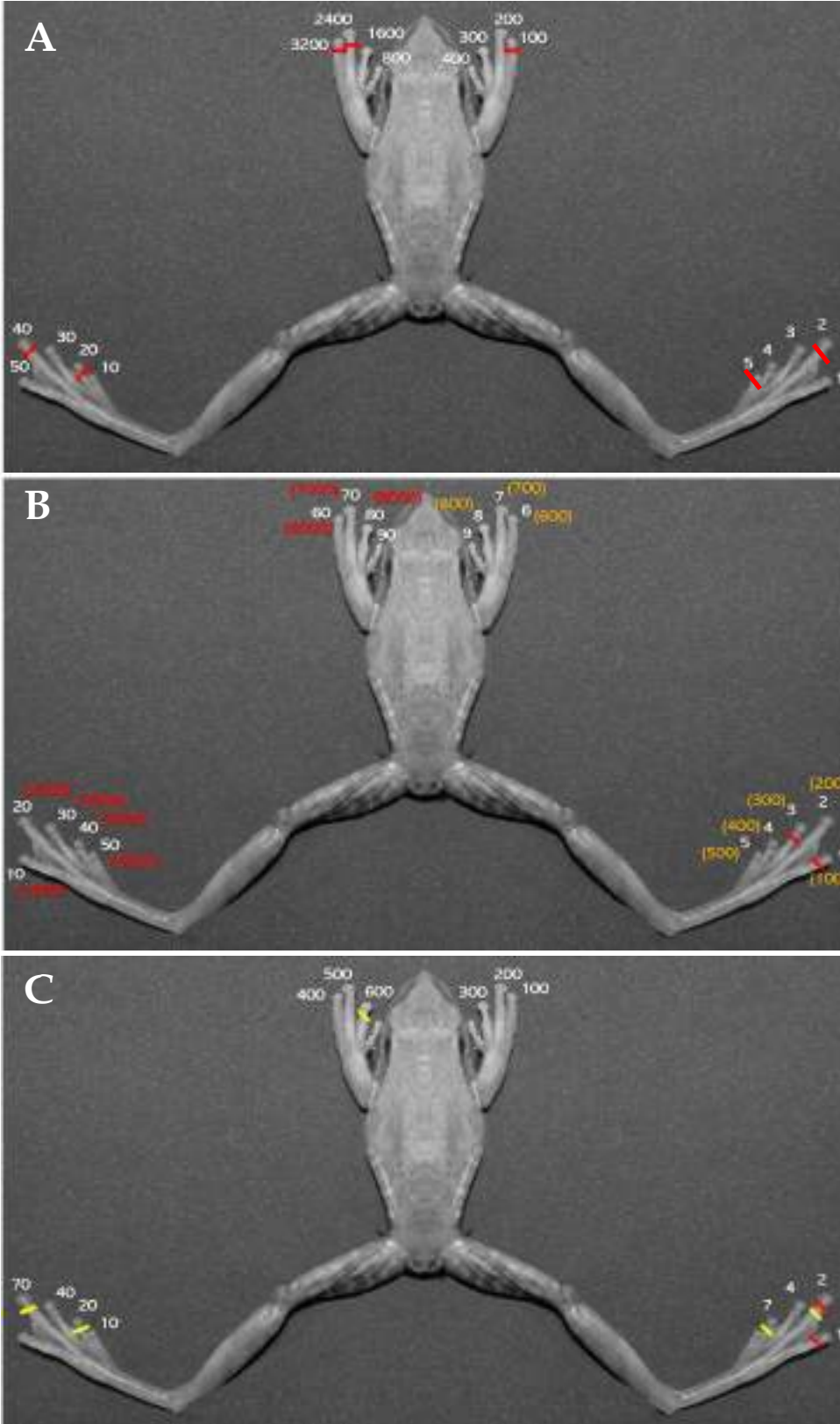
Existen numerosos procedimientos y métodos para llevar a cabo esta técnica dependiendo del objetivo del estudio. En todos los casos es recomendable que se minimice el efecto provocado por el corte de falanges reduciendo al mínimo la cantidad de dedos seccionados y la longitud de la sección. Asimismo, debe contemplarse no cortar ciertos dedos de manos o pies en especies que pueden ver afectado su comportamiento o movilidad por esta práctica. Este aspecto no ha sido habitualmente explorado por lo que se recomienda realizar pruebas preliminares u observaciones para comparar la movilidad y supervivencia de los ejemplares que han sufrido cortes<sup>(19)</sup>.

La prevención de infección o contaminación de los ejemplares manipulados debe ser una preocupación primordial con cualquier técnica de marcado. Existen guías que fijan procedimientos estándares para realizar de forma segura y aséptica el corte de falanges<sup>(20,21)</sup>. Se recomienda utilizar guantes de un solo uso, tijeras, bisturíes y pinzas de acero inoxidable esterilizadas y la aplicación del antiséptico y/o antibióticos tópicos después del procedimiento para prevenir infecciones (considerando que esto último puede no ser tan efectivo si los ejemplares se regresan al agua inmediatamente después del procedimiento).

Existen diferentes alternativas para codificar el corte de falanges de manera que permita identificar el ejemplar marcado en función con los objetivos del estudio. El corte puede limitarse a una escisión en la articulación interfalángica más distal (*toe-clipping*) o en una más proximal (*toe-tipping*, ver **Sección 4.2 Esqueletocronología**). Si la marca sólo se requiere para que el individuo no vuelva a ser incluido en una muestra o captura subsiguiente sin importar la identidad específica de cada ejemplar recapturado, es recomendable minimizar el número de cortes efectuándolo en un solo dedo, dado que existen estudios que mostraron una asociación inversa entre la cantidad de dedos cortados y la tasa de recaptura de los ejemplares<sup>(16,22)</sup>. Este tipo de marca reduce sensiblemente la cantidad de ejemplares a identificar con una marca exclusiva para cada uno, pero puede aplicarse si se pretende indicar con la marca la misma procedencia de varios ejemplares (un charco, una parcela, una transecta o una clausura).

Si el estudio requiere una marca exclusiva para cada ejemplar capturado será necesario recurrir a alternativas que obligan a realizar cortes en varios dedos de manos y pies para lograr identidades únicas con cada marca. Los diferentes esquemas toman en consideración la cantidad de dedos a cortar o evitan el corte de algunos dedos en particular. En cada caso el número de marcas individuales posibles varía con estas restricciones (**Figura 4.1.1**).





**Figura 4.1.1.** Diferentes alternativas para el reconocimiento individual de ejemplares por medio del corte de falanges. **A.** Según Martof<sup>(23)</sup>; el código representado es el 5767 que requiere el corte de las falanges 3200 + 2400 + 100 + 40 + 20 + 5 + 2.

**B.** Según Hero<sup>(24)</sup>; el corte de más de una falange en la misma extremidad indica el menor número posible. En el ejemplo el código correcto es 103 ya que no es posible marcar el código 301.

**C.** Según Phillot et al.<sup>(25)</sup>; el menor código resulta del corte de los dedos 1 + 2 (código 3) y el mayor posible del corte de los dedos 600 + 70 + 20 + 7 + 2 (código 699).

Las líneas rojas y amarillas representan las falanges que se cortan en un mismo individuo para establecer cada código único. Foto: M. S. Akmentins.

**Etiquetas electrónicas pasivas internas (Passive Integrated Transponder, PIT):** Las etiquetas PIT consisten en una cápsula electromagnética con un código alfanumérico, que es leído por un escáner. Consta de un chip de circuito integrado, un capacitor y una bobina de antena encapsuladas en vidrio o polipropileno. Para activar la etiqueta, el dispositivo de escaneo emite una señal de radio de baja frecuencia que genera un campo electromagnético de corto alcance. Luego, la etiqueta envía un código alfanumérico único al lector. Los escáneres están disponibles como modelos portátiles y que funcionan con baterías<sup>(26)</sup>. La inserción se realiza por vía subcutánea o en la cavidad corporal. Se han detectado pérdidas de las cápsulas y efectos nocivos relacionados a la supervivencia utilizando esta técnica. La implantación incorrecta puede causar la pérdida o la falla en la lectura de la etiqueta, o puede causar una infección que lleve a la expulsión de la cápsula o la muerte del individuo<sup>(27)</sup>. Muchas especies pueden resultar muy pequeñas para marcarlas con PIT si bien existen en el mercado etiquetas PIT de 1 mm de diámetro y 6 mm de largo que pesan solamente 7,15 mg. Su costo elevado puede ser un inconveniente importante si se pretende identificar un alto número de individuos.

**Implante visible de elastómeros (Visual Implant Elastomer, VIE):** Los elastómeros son un polímero biocompatible a base de silicona que se implantan mediante inyección subcutánea. Están formados por dos componentes, un líquido viscoso de color y un agente curador, que al entrar en contacto entre sí adquieren una consistencia sólida y flexible. El tiempo de endurecimiento depende de la temperatura ambiente, siendo de aproximadamente 45 minutos a unas horas en ambientes cálidos a varias horas o incluso días en ambientes fríos. Por este motivo, para poder aplicar el implante en estado líquido se recomienda mezclar únicamente la cantidad que se utilizará durante la sesión de marcado, aunque es posible mantener el compuesto mezclado por tres meses si se lo resguarda en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ <sup>(28)</sup>. Por separado, los componentes se pueden conservar en estado líquido un año en heladera, o incluso más.

La inyección se realiza con una jeringa de 0,3 cc con la ayuda de un inyector manual, que permite un mejor control de la presión aplicada y el volumen a inyectar. Así, tanto el tamaño del implante como la forma (circular/alargada) son controlados por el usuario. Existe una gama de 10 colores posibles para aplicar, 6 de los cuales (rojo, rosado, anaranjado, amarillo, verde y azul) son fluorescentes. Todos son visibles a simple vista con luz natural, pero para muestreos nocturnos o bajo el agua se recomiendan los fluorescentes, cuya visualización puede mejorarse utilizando una linterna de luz ultravioleta.

La técnica permite la individualización de muchos ejemplares o la distinción de individuos de cohortes distintas o sitios diferentes mediante la creación de códigos combinando distintos colores y colocando las marcas en distintas ubicaciones corporales<sup>(29,30,31)</sup>. Sin embargo, no se aconseja la combinación de ciertos colores, como el amarillo con verde ya que si bien con luz natural son perfectamente distinguibles, pueden llegar a confundirse bajo luz UV.

Una de las desventajas del método es la probabilidad de migración de la etiqueta una vez implantada. Para reducir este riesgo, se ha sugerido colocar los VIE en una región donde el movimiento sea poco probable como en las membranas (**Figura 4.1.2**) o entre los dedos de las patas traseras<sup>(17,32)</sup>, aunque el uso de esta técnica en animales pequeños o aquellos con membranas muy reducidas puede que no sea factible. En estos casos se ha propuesto una técnica híbrida denominada VIE-C que combina inyecciones de VIE en la superficie plantar con un solo corte de falange de los dedos del pie trasero<sup>(17)</sup>.

El tiempo de manipulación es relativamente rápido, y mejora a medida que el investigador gana experiencia. Sin embargo, algunos autores optan por anestesiar los individuos previamente al marcado<sup>(32,34)</sup>.

Una gran ventaja comparativa que ofrece esta técnica, además de ser inocua para los organismos, es la posibilidad de aplicar marcas a larvas, las que pueden perdurar a lo largo del ciclo de vida complejo de muchos anfibios pudiendo identificar ejemplares durante todo el desarrollo, a través de la metamorfosis y su migración a la vida terrestre<sup>(28,31)</sup>. Usualmente el marcado de larvas se ha limitado a cierta etapa de desarrollo y peso pero la técnica ha comenzado a mostrar resultados confiables en especies con renacuajos



**Figura 4.1.2.** Ubicación del implante visible de elastómero en la membrana interdigital (flecha negra). Foto: V. Corbalán.

### Caja 4.1.1 - Marcado de larvas de *Alsodes pehuenche* con elastómeros en la cordillera de los Andes

Valeria Corbalán<sup>1</sup>; Guillermo Debandi<sup>1</sup>; F. Martínez<sup>1</sup> & Carmen Úbeda<sup>2</sup>

El marcado de individuos con elastómeros ha sido implementado en larvas de *Alsodes pehuenche*, las que, por su tamaño relativamente grande, resultan de fácil manipulación para la aplicación de esta técnica. A partir de la observación de agrupaciones de larvas con distintos tamaños y estadios de desarrollo, el objetivo del estudio fue determinar la duración del desarrollo larval. Para ello se buscaron sitios con alta abundancia de larvas, las que fueron capturadas con redes de acuario y colocadas en contenedores con agua. Se clasificaron en clases de acuerdo al tamaño y grado de avance en el desarrollo de las patas traseras y delanteras. Luego, a cada clase se le asignó un color de elastómero (verde, naranja, rosa, amarillo) y los individuos fueron marcados con el color correspondiente a la clase a la que pertenecían. Sólo se marcaron aquellas larvas de tamaño mayor a 15 mm, y ningún individuo sufrió heridas o muerte durante la manipulación. Se aplicó una única marca en la región ventral a fin de evitar que los renacuajos sean detectados por depredadores aéreos (Figura 4.1.3a).



**Figura 4.1.3.** Detalles de la ubicación de implantes visibles de elastómeros en una larva y un postmetamórfico de *Alsodes pehuenche*. Foto: V. Corbalán.

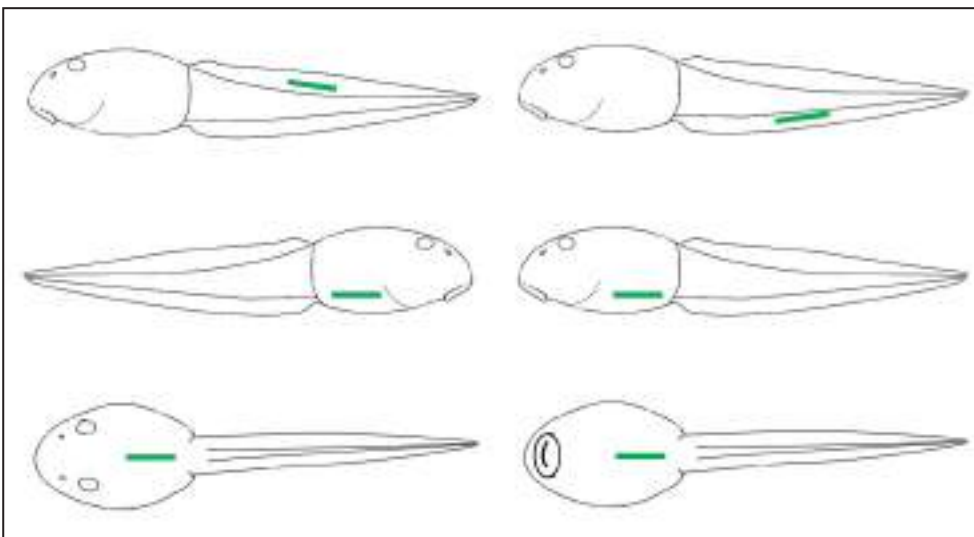
Una vez marcados, se liberaron en el sitio de captura, georreferenciando el lugar. Se realizaron recapturas luego de 12, 16, 23 meses y 4 años. No se observaron desplazamientos en ninguna de las marcas. Una segunda sesión de marcado se llevó a cabo con 16 meses de diferencia de la primera, y los elastómeros (que habían sido mantenidos en heladera con sus componentes separados) aún conservaban sus propiedades. Si bien la tasa de recaptura fue baja (alrededor del 15%), se pudo registrar el avance en el desarrollo larval y encontrar individuos marcados aún habiendo completado su metamorfosis (Figura 4.1.

**3b).** Los resultados indicaron que este desarrollo es muy lento, y cada individuo permanece al menos 4 inviernos (y tal vez 5) como larva<sup>(31)</sup>. Esto pone de manifiesto la vulnerabilidad de la especie ante un evento catastrófico (sequía del ambiente, modificación del curso de agua, salinización del agua, etc.) ya que en ausencia de las condiciones óptimas para el desarrollo se podrían eliminar varias generaciones al mismo tiempo.

1. Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (IADIZA), CCT Mendoza-CONICET, Mendoza, Argentina.

2. Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina.

pequeños y desde etapas tempranas del desarrollo<sup>(28,33,34)</sup>. Se han realizado pruebas en renacuajos marcados en seis posiciones corporales diferentes (**Figura 4.1.4**). La migración y la pérdida de la etiqueta en ciertas regiones (cola y región dorsal del cuerpo) son particularmente altas debido a la reabsorción de la cola durante la metamorfosis y probablemente debido a los movimientos de natación que involucran la musculatura dorsal. La región ventral y el lateral derecho son los más aconsejables, ya que permanecen por más tiempo y muestran la menor tasa de mortalidad en los individuos durante las fases iniciales de la metamorfosis<sup>(34)</sup>. Otra característica a tener en cuenta es que a medida que se desarrollan los renacuajos, los cambios individuales morfológicos y fenotípicos (aumento de pigmentación en la piel) pueden enmascarar la presencia de una etiqueta constituyendo una probable fuente de error en la identificación. Sin embargo, a pesar de sus limitaciones, esta técnica por su fácil aplicación y bajo costo constituye una de las más adecuadas para marcar renacuajos y adultos de muchas especies de anfibios.



**Figura 4.1.4.** Seis ubicaciones posibles de implantación de elastómeros (bandas verdes) en distintas partes del cuerpo de renacuajos para su identificación individual. Adaptado de<sup>(34)</sup>

El fabricante (Northwest Marine Technology, Inc) ofrece kits conteniendo los elastómeros (cantidad de acuerdo al kit y color a elección), vasos y paletas de mezclado, jeringas, inyector manual y linterna ultravioleta (405 nm) a prueba de agua, así como un manual de instrucciones.

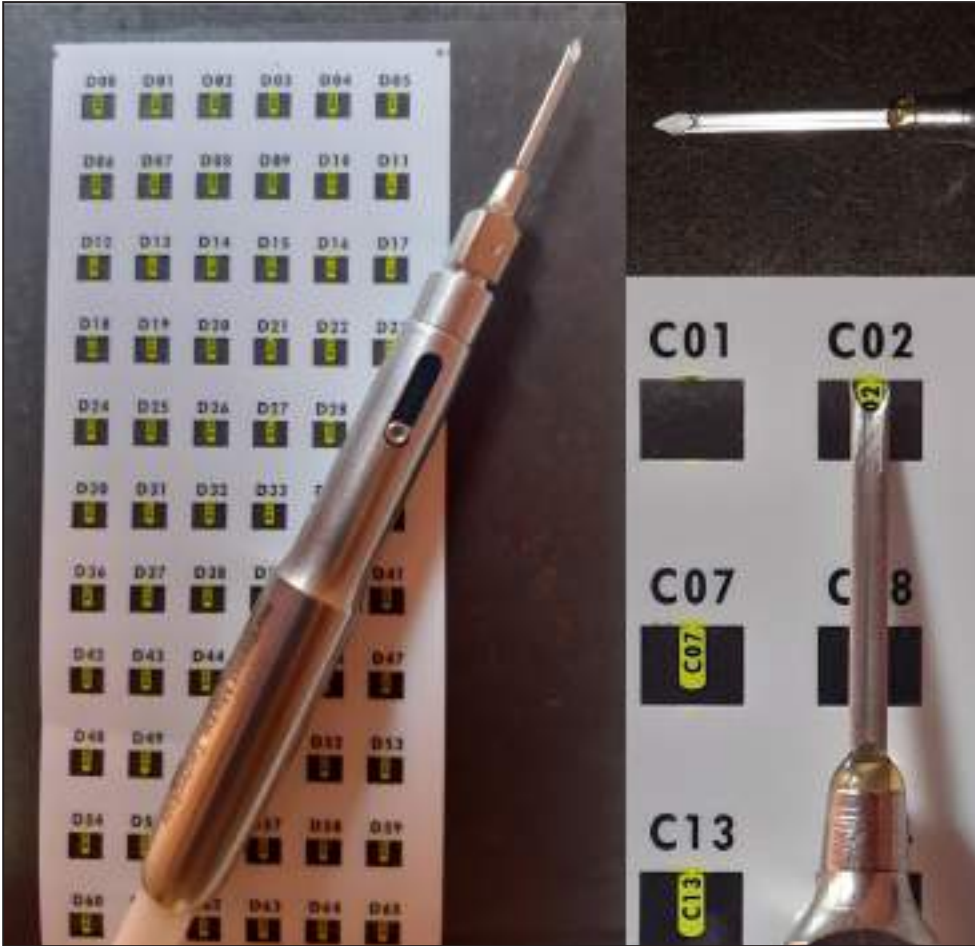
**Implantes visuales alfanuméricos (Visual Implant Alphanumeric, VIA):**

Las etiquetas VIA consisten en pequeñas etiquetas rectangulares fluorescentes con un código alfanumérico que se implantan bajo la piel pero permanecen visibles externamente para una fácil lectura incluso a simple vista. La inserción se realiza con un inyector proporcionado por el fabricante, pero en algunos casos los resultados son mejores haciendo una incisión previa. Es una técnica accesible debido a su costo relativamente bajo y la interpretación sencilla del código alfanumérico. Presenta algunas desventajas como la dificultad para insertar la etiqueta en especies con piel flácida, la variación en la retención de la etiqueta entre especies y el oscurecimiento de la etiqueta al marcar especies con pieles muy pigmentadas o por la migración a una parte muy pigmentada del cuerpo<sup>(19,35)</sup>. La retención de marcas fue baja en estudios de captura-recaptura de renacuajos<sup>(36)</sup>. Puede ocurrir inflamación en la zona de la colocación o la inversión de la etiqueta<sup>(18)</sup>.

El sitio de colocación de las etiquetas es muy variable dependiendo el tamaño corporal y la pigmentación de las especies a estudiar. La migración en las regiones dorsales del cuerpo es menos común, pero esta área tiende a estar más pigmentada, lo que puede dificultar la lectura<sup>(29)</sup>. La ubicación en la porción ventral del muslo es la más recomendada ya que usualmente es casi translúcida facilitando la lectura<sup>(18)</sup>.

La colocación de las etiquetas se efectúa con una aguja de inyección diseñada específicamente que no requiere hacer una incisión inicial para introducirla (**Figura 4.1.5**). Sin embargo, para marcar especies grandes o de piel gruesa, así como para marcar un gran número de individuos, se recomienda aplicar un anestésico local para no causar mayores molestias a los ejemplares<sup>(18)</sup>. También se sugiere el uso de pegamento veterinario que evita la expulsión de la etiqueta. El sitio de implantación debe esterilizarse con etanol al 90% así como todo el equipo de marcado luego de su utilización en un ejemplar por inmersión en etanol al 90% durante varios minutos<sup>(18)</sup>.

**Tinciones y tatuajes:** La tinción completa del cuerpo en renacuajos se ha aplicado como una técnica confiable en estudios para los que es necesario identificar individualmente ejemplares confinados en grupos en el labora-



**Figura 4.1.5.** Equipo para inyección de etiquetas VIA y detalle de la colocación de la etiqueta en el inyector. Foto: M. Vaira.

torio o que requieren que los investigadores registren a los individuos para observaciones de comportamiento<sup>(37-39)</sup> e incluso para estudios de tamaño poblacional y supervivencia<sup>(40)</sup>. Su uso puede considerarse para un período corto de tiempo dado que la coloración generalmente desaparece después de unos días<sup>(37)</sup> y los niveles altos de radiación solar pueden reducir la eficacia de la tinción debido al fotoblanqueo<sup>(41)</sup>. Algunos estudios han encontrado que la tinción puede tener efectos tanto en la respuesta de los depredadores<sup>(41)</sup> como en los niveles de agresión<sup>(42)</sup> y afectar la tasa de crecimiento de los renacuajos al menos en ciertas concentraciones y en algunas especies<sup>(27,38,40)</sup>.

Las tinturas biológicas más simples de utilizar son el rojo neutro y el azul de metileno aplicándolas por inmersión de los individuos en soluciones de muy baja concentración<sup>(37,41)</sup>. La aplicación de otros fluorocromos como la calceína también ha mostrado buenos resultados y la ventaja que la marca parece persistir a lo largo de la metamorfosis, si bien resulta más complejo de registrar dado que requiere una fuente de iluminación con filtros específicos<sup>(43)</sup>.

El tatuaje es una técnica que forma una cicatriz en la superficie de la piel con una marca identificable (números o símbolos). Esto se realiza aplicando sobre la piel calor (marcado por calor directo o electrocauterización), por congelación (usando nitrógeno líquido o hielo seco); o utilizando productos químicos<sup>(44)</sup>. El instrumento para realizar la marca puede ser un alambre muy fino que se retuerce para lograr la forma de la marca que luego se calienta o sumerge en líquido o hielo antes de apoyar sobre la piel. Requiere una manipulación importante y limpiar la piel del ejemplar previamente, lo que puede insumir mucho tiempo y sumar al dolor provocado por la marca un aumento del estrés del individuo. Las marcas pueden desaparecer en corto tiempo dependiendo de la especie y el tiempo que se dejó el alambre presionando sobre la piel.

**Cinturones y piercings:** Los cinturones o bandas para la cintura pueden fabricarse con una cuerda o banda elástica de distintos colores, con una etiqueta adherida o con cuentas de colores enhebradas<sup>(45)</sup>. Bandas similares pueden colocarse en los brazos o las piernas, pero pueden interferir con el amplexo o requerir un ajuste mayor para que no se deslicen y por lo tanto provocar lesiones al ejemplar. Pueden desprenderse con facilidad y tienen el potencial de engancharse o inhibir el movimiento. Además, los colores de las bandas o las cuentas pueden atraer a los depredadores con posibles implicancias para la supervivencia de los individuos. Sin embargo, como técnica de marcado temporal puede resultar útil y viable (ver **Caja 4.1.2**).

La técnica de piercing implica colocar una etiqueta o cuentas de vidrio o plástico coloreadas sujetas a un alambre de acero quirúrgico que se perfora a través de la piel y/o el músculo del animal<sup>(46)</sup>. Estas etiquetas o marcas son más invasivas y pueden causar molestias, lesiones e infecciones a los ejemplares. Tienen menor posibilidad de desprenderse que los cinturones y por ende mayor confiabilidad como una marca más permanente. Existe el riesgo que las etiquetas o el alambre se enreden con la vegetación si se aplica a ejemplares que luego son liberados en su entorno. Además, la inserción incorrecta del alambre podría causar necrosis del músculo.

Una modificación de la técnica de marcado propuesta por Nice y Myers<sup>(46)</sup>, se presenta a continuación:

Para la realización de la marca se utiliza alambre aleación de Nicrom (diámetro = 0,4 mm; las proporciones de los materiales que componen el alambre es 80% de cromo - 20% níquel; con un peso/por metro de 0,97 g). Este material no se corroe ni oxida y es altamente maleable, por esta razón es comúnmente



### Caja 4.1.2 - Utilización del marcado con cinturones de cuentas en *Melanophryniscus rubriventris*

Lidwina Bertrand<sup>1</sup> & Marcos Vaira<sup>2</sup>

La técnica de marcado de individuos con cinturones de cuentas, se aplicó en un estudio cuyo objetivo era describir y analizar las estrategias reproductivas de los machos y hembras de una población de *Melanophryniscus rubriventris*. El sitio reproductivo se censó diariamente en períodos consecutivos de 34, 9 y 11 días. Todos los individuos del área fueron marcadas con un cinturón de cuentas al concluir la observación (**Figura 4.1.6**). Se realizó un seguimiento diario de los individuos marcados para asegurar que no fueran lastimados por el cinturón. No se observaron individuos lacerados ni dañados. Asimismo, se registró una hembra oviponiendo con el cinturón colocado. Los machos marcados, que retornaban a los sitios reproductivos en días sucesivos, no mostraron signos de verse afectados por el cinturón realizando distintas actividades (caminando, vocalizando, en amplexo) de igual manera que los ejemplares no marcados.



**Figura 4.1.6.** Detalle de la confección del cinturón y de un macho y una pareja con la marca colocada. Fotos: L. Bertrand.

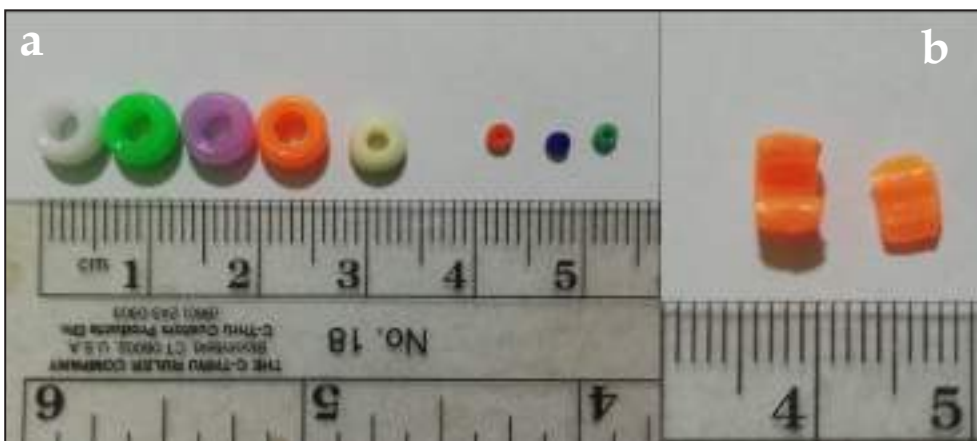
Los cinturones fueron confeccionados utilizando tanza elástica Cristal Line C.B.X., de 0,40 mm de grosor, y con cuentas de vidrio coloreadas (canutillos). Se fueron combinando canutillos de distintos colores según la secuencia deseada. Cada cinturón tenía un peso aproximado de 0,15 g. correspondientes al 4,5 % del peso corporal promedio de los individuos. Se cortaron los extremos de la tanza para evitar que quedaran puntas que pudieran lacerar la piel y se estiró el cinturón suavemente para asegurar que el nudo no corra.

En total fueron marcados 291 individuos (171 machos, 40 hembras y 40 parejas). En los sucesivos muestreos, sólo se encontraron 12 cinturones sueltos, de los cuales 7 correspondían al marcado de machos y 5 habían sido usados para marcar hembras. En tres oportunidades se observó que las hembras perdían su cinturón al quedar atrapadas entre las luchas de varios machos por intentar el amplexo. Sólo un 4% de los individuos marcados perdieron su cinturón, por lo que la técnica de marcado para observaciones durante períodos cortos de tiempo resultó efectiva.

1 Dpto. de Bioquímica Clínica - CIBICI - CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Lab. 6 - Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina.

2 Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

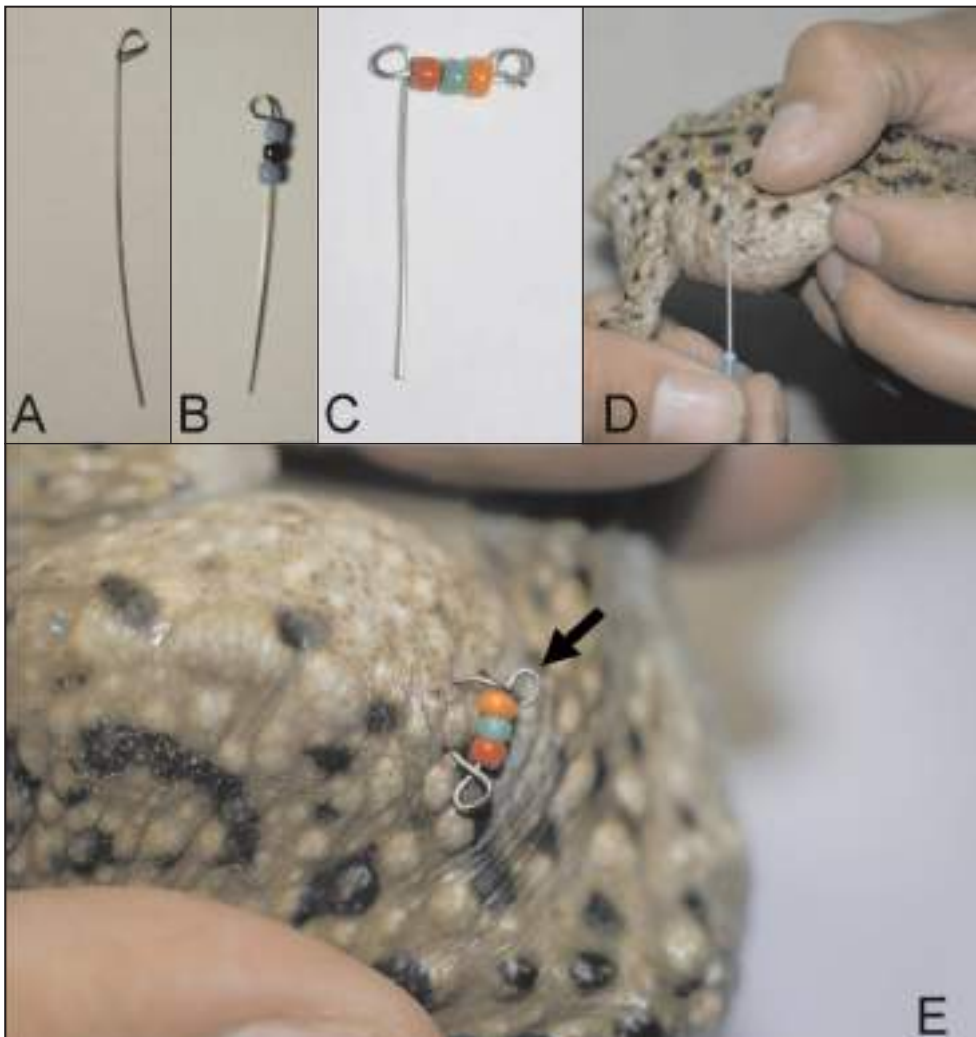
utilizado como alambre de resistencia (encontrándose presente en la mayoría de los artefactos de calefacción, como selladores de bolsas, calventores, etc.). Además, se utilizan perlas plásticas (comúnmente denominadas mostacillas) para crear un código de colores que nos permita identificar los ejemplares. Las perlas de colores se consiguen en diferentes tamaños entre 1,5 y 5 mm de diámetro (**Figura 4.1.7a**), lo cual brinda la posibilidad de escoger el tamaño deseado según el tamaño del animal a marcar y el objetivo del estudio. Las mostacillas al estar realizadas con material de color homogéneo (**Figura 4.1.7b**) son altamente resistentes a la decoloración.



**Figura 4.1.7.** a. Diferentes tamaños y colores de las perlas plásticas utilizadas para confeccionar piercings. b. Ejemplo de una mostacilla recuperada que no ha perdido la coloración. Fotos: E. Sanabria.

La aplicación de la marca en los anfibios adultos conlleva una serie de pasos que con la práctica se realizan de manera rápida y casi automática: Se cortan 4 cm de alambre de Nicrom y se construye un pequeño anillo en uno de los extremos con la ayuda de una pinza de puntas (**Figura 4.1.8A**). A continuación, se insertan tres perlas plásticas de diferentes colores para crear una combinación única para cada marca. Un código internacionalmente conocido y fácil de recordar es el que se utiliza para la codificación de los valores de resistores eléctricos (**Tabla 4.1.1**), pero se puede crear un código propio dependiendo de los colores de perlas disponibles (**Figura 4.1.8B**).

Una vez insertadas las 3 perlas en la secuencia deseada, cerrar con un pequeño anillo en el otro extremo, de forma que ajuste las perlas de plástico (**Figura 4.1.8C**). De esta manera, la marca está terminada ya que en ese extremo quedarán un par de centímetros de alambre, que permiten insertar la marca en el animal y cerrarla. El peso total de esta marca es de aproximadamente 0,2 g.



**Figura 4.1.8.** Pasos para colocación del piercing en anuros **A.** alambre de Nicrom con un anillo en un extremo. **B.** secuencia de mostacillas. **C.** marca completa con los dos anillos en cada extremo. **D.** marca inserta en la aguja para enhebrar en la piel. **E.** cierre de la marca pasando el extremo largo del alambre por el primer anillo (flecha). Fotos: E. Sanabria.

Color	Primera perla	Segunda perla	Tercera perla (multiplicador)
Negro	0	0	0
Marrón	1	1	10
Rojo	2	2	100
Naranja	3	3	1000
Amarillo	4	4	10000
Verde	5	5	100000
Azul	7	7	1000000
Violeta	8	8	10000000
Gris	9	9	100000000
Blanco	10	10	1000000000

**Tabla 4.1.1.** Codificación por color utilizada para los valores de resistores eléctricos.

Para realizar la colocación de la marca, y con el fin de prevenir infecciones, se embeben las marcas con alcohol en una concentración del 70%, así como las herramientas a utilizar. El lugar donde se aplicará la marca en el animal, se limpia con una gasa humedecida en alcohol al 30%, debido a que la gran permeabilidad de la piel de los anfibios los hace sensibles a las concentraciones bajas de alcohol y pueden provocar la muerte de los ejemplares.

Para colocar la marca se toma el ejemplar ubicado con la cloaca hacia arriba para tener fácil acceso al saco lateral. Para este paso se necesita una aguja hipodérmica estéril (calibre: 21Gx1”), que corresponde a las siguientes dimensiones: 2,5 centímetros de largo y un diámetro exterior 0,8 mm y un diámetro interno de 0,5 milímetros). Se pellizca la piel en el saco lateral del ejemplar (de forma de extender la piel) donde se va a introducir la aguja y se inserta en el saco lateral, teniendo en cuenta que solo se debe perforar la piel del ejemplar (sin tocar el músculo). Luego, se inserta en el orificio de la aguja el pie de largo de la marca, paso seguido se retira con suavidad la aguja y la marca queda enhebrada en la piel del ejemplar (**Figura 4.1.8D**). El paso final es cerrar la marca, para ello con una pinza de puntas levantaremos el pie largo de la marca y lo pasamos a través del primer anillo, y realizamos un segundo anillo, junto al primero, y de esta manera queda cerrada la marca (**Figura 4.1.8E**).

La lectura se realiza desde el extremo donde se cerró la marca en el cual quedarán dos anillos de alambre (**Figura 4.1.8E**, flecha) lo que se considera el inicio de la lectura de la marca.

### Comentarios finales

Las consideraciones sobre el bienestar animal y la preservación de las poblaciones a largo plazo resultan esenciales al elegir la técnica de marcado más

aconsejable para el estudio que se pretende emprender. Tomando en cuenta los objetivos y restricciones que impone el estudio, siempre será aconsejable optar por el uso de técnicas no invasivas. En caso contrario, resulta importante equilibrar los beneficios de la técnica y los problemas potenciales que producirá su aplicación como: dolor, morbilidad, reducción de la tasa de crecimiento y desarrollo, reducción de la fecundidad, efectos sobre la supervivencia y mortalidad de los ejemplares.

Dado que todos los estudios que aplican técnicas de marcado suelen incorporar permanentemente avances tecnológicos, modificaciones y adaptaciones resulta deseable que su aplicación sea analizada evaluando la efectividad de la técnica en la identificación de individuos y determinando la prevalencia de las marcas y las dificultades que puede exhibir la aplicación de la técnica en las diferentes especies o poblaciones. La publicación de los éxitos y fracasos de las técnicas utilizadas serán de gran ayuda para los estudios futuros que requieran implementar técnicas de marcado de individuos, evitando repetir errores innecesarios o ayudando a resolver aspectos importantes para implementar la técnica eficientemente.

### **Caja 4.1.3 - Marcado con piercings de perlas en especies del desierto del Monte**

**Lorena Quiroga & Eduardo Sanabria**

*Durante el año 2006 marcamos 250 ejemplares de diferentes especies en diferentes regiones del desierto del Monte. En todos los casos, las marcas se colocaron en el campo. Realizamos la recaptura al cabo de un mes consiguiendo recapturar 100 ejemplares y los mismos no registraron infecciones. Pudimos observar que las perlas de plástico no perdieron el color con el sol o el agua.*

*Por otro lado, se realizó el marcado de ranas y sapos en el laboratorio para diferentes experiencias. Estos animales fueron marcados en enero de 2007. Después de 16 meses, los animales no presentan infecciones en el área de la marca y no se observaron indicios de absorción de las marcas. Las especies marcadas con esta técnica fueron *Rhinella arenarum*, *R. fernandezae*, *Odontophrynus occidentalis* y *Leptodactylus latrans*. Este método es muy barato, fácil aplicar en el campo y los anuros no muestran ningún comportamiento anormal después que fueran marcados. Además, el bajo peso de las marcas (~0.02 g) posibilita el marcado de ejemplares pequeños.*

Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía Humanidades y Artes, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, San Juan, Argentina.

## Bibliografía

1. Pollock, K. H.; Nichols, J. D.; Brownie, C. & Hines, J. E. 1990. Statistical inference for capture-recapture experiments. *Wildlife Monograph* 107: 3-97.
2. Bradfield, K. 2004. Photographic identification of individual Archey's frogs. Doc. Science Internal Series 191, Dept. of Conservation, New Zealand.
3. Eitam A. & Blaustein, L. 2002. Non-invasive individual identification of larval *Salamandra* using tailfin spot patterns. *Amphibia-Reptilia* 23: 215-219.
4. Kenyon, N.; Phillott, A.D. & Alford, R.A. 2009. Evaluation of the photographic identification methods (PIM) as a tool of identifying adult *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae). *Herpetological Conservation and Biology* 4: 403-410.
5. Plăiașu, R.; Hartel, T.; Băncilă, R. I. & Cogălniceanu, D. 2005. The use of digital images for the individual identification of amphibians. *Studii și Cercetări Biologie* 10: 137-140.
6. Donnelly, M.A.; Guyer, C.; Juterbock, J.E. & Alford, R.A. 1994. Techniques for marking amphibians: 277-284. *En: Heyer, W.R.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, L.- A.C. & Foster, M.S. (eds.). Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians.* Smithsonian Institution Press, Washington and London.
7. Gamble, L.; Ravela, S. & McGarical, K. 2007. Multiscale features for identifying individuals in large biological databases: an application of pattern recognition technology to the Marbled Salamander *Ambystoma opacum*. *Journal of Applied Ecology* 45: 170-180.
8. Speed, C.W.; Meekan, M.G. & Bradshaw, C.J. 2007. Spot the match - wildlife photo-identification using information theory. *Frontiers in Zoology* 4: 1-11.
9. Cairo, S. L. & Zalba, S. M. 2007. Effects of a paved road on mortality and mobility of red bellied toads (*Melanophryniscus* sp.) in Argentinean grasslands. *Amphibia-Reptilia* 28: 377-385.
10. Van Tienhoven, A.M.; Den Hartog, J.E.; Reijns, R.A.; & Peddemors, V.M. 2007. A computer-aided program for pattern-matching natural marks on the spotted raggedtooth shark *Carcharias taurus* (Rafinesque, 1810). *Journal of Applied Ecology* 44: 273-280.
11. Liner, A.E.; Smith, L.L. & Castleberry, S.B. 2007. Effects of toe-clipping on the survival and growth of *Hyla squirella*. *Herpetological Review* 38: 143-145.
12. Ferner, J.W. 2010. Measuring and marking post-metamorphic amphibians: 123-141. *En: Dodd Jr., C.K. (ed.). Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques.* Oxford University Press, UK.
13. Funk, W.C.; Donnelly, M.A. & Lips, K.R. 2005. Alternative views of amphibian toe-clipping. *Nature* 433:193.
14. Correa, D.T. 2013. Toe-clipping vital to amphibian research. *Nature* 493:305.
15. Perry, G.; Wallace, M.C.; Perry, D.; Curzer, H. & Muhlberger, P. 2011. Toe clipping of amphibians and reptiles: science, ethics, and the law. *Journal of Herpetology* 45:547-555.
16. McCarthy, M.A. & Parris K.M. 2004. Clarifying the effect of toe clipping on frogs with Bayesian statistics. *Journal of Applied Ecology* 41:780-786.
17. Hoffmann, K.E.; McGarrity, M.E. & Johnson, S.A. 2008. Technology meets tradition: A combined VIE-C technique for individually marking anurans. *Applied Herpetology* 5: 265-280.
18. Caballero-Gini, A.; Villafañe, D.B.; Romero, L.; Ferreira, M.; Cañete, L.; Laino, R. & Musalem, K. 2019. Visible implant alphanumeric (VIA) as a marking method in the lesser snouted treefrog *Scinax nasicus*. *Acta Herpetologica* 14:129-133.
19. Brannelly, L.A.; Berger, L. & Skerratt, L.F. 2014. Comparison of three widely used marking techniques for adult anuran species *Litoria verreauxii* alpine. *Herpetological Conservation and Biology* 9: 428-435.
20. Herpetological Animal Care and Use Committee (HACC). 2004. Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory research. [https://asih.org/sites/default/files/2018-05/guidelines\\_herps\\_research\\_2004.pdf](https://asih.org/sites/default/files/2018-05/guidelines_herps_research_2004.pdf).
21. The Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV). 2009. Position statement. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 19: 40-41.
22. Grafe, T.U.; Stewart, M.M.; Lampert, K.P. & Rödel, M-O. 2011. Putting toe clipping into perspective: A viable method for marking anurans. *Journal of Herpetology* 45: 28-35.
23. Martof, B.S. 1953. Territoriality in the Green Frog, *Rana clamitans*. *Ecology* 34: 165-174.

24. Hero, J.M. 1989. A simple code for toe clipping anurans. *Herpetological Review* 20: 66-67.
25. Phillot, A.D.; McDonald, K.R. & Skerratt, L.F. 2010. Return rates of male hylid frogs *Litoria genimaculata*, *L. nannotis*, *L. rheocola* and *Nyctimystes dayi* after toe-tipping. *Endangered Species Research* 11: 183-188.
26. Gibbons, J.W. & Andrews, K.M. 2004. PIT tagging: Simple technology at its best. *BioScience* 54: 447-454.
27. Ferner, J.W. 2007. A review of marking and individual recognition techniques for amphibian and reptiles. Herpetological Circular 35. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Atlanta.
28. Fouilloux, C.A.; Garcia-Costoya, G. & Rojas, B. 2020. Visible implant elastomer (VIE) success in early larval stages of a tropical amphibian species. *PeerJ* 8: e9630.
29. Moosman, D.L. & Moosman, Jr.; P.R. 2006. Subcutaneous movements of visible implant elastomers in wood frogs (*Rana sylvatica*). *Herpetological Review* 37: 300-301.
30. Osbourn, M.S.; Hocking, D.J.; Conner, C.A.; Peterman, W.E. & Semlitsch, R.D. 2011. Use of fluorescent visible implant alphanumeric tags to individually mark juvenile ambystomatid salamanders. *Herpetological Review* 42: 43-47.
31. Corbalán, V.; Debandi, G.; Martínez, F. & Úbeda, C. 2014. Prolonged larval development in the Critically Endangered Pehuenche's frog *Alsodes pehuenche*: implications for conservation. *Amphibia-Reptilia* 35: 283-292.
32. Nauwelaerts, S.; Coeck, J. & Aerts, P. 2000. Visible implant elastomers as a method for marking adult anurans. *Herpetological Review* 31: 154-155.
33. Bainbridge, L.; Stockwell, M.; Valdez, J.; Klop-Toker, K.; Clulow, S.; Clulow, J. & Mahony, M. 2015. Tagging tadpoles: retention rates and impacts of visible implant elastomer (VIE) tags from the larval to adult amphibian stages. *Herpetological Journal* 25: 133-140.
34. Iannella, M.; Liberatore, L. & Biondi, M. 2017. Marking tadpoles with Visible Implant Elastomer (VIE) tags: methods for improving readability and decreasing mortality. *Salamandra* 53: 531-536.
35. Kaiser, K.; Alloush, M.; Jones, R.M.; Marczak, S.; Martineau, K. & Oliva, M. 2009. Use of visual implant Alpha (VIAAlpha) fluorescent tags in a small hylid frog with a new technique for application. *Herpetological Review* 40: 421-422.
36. Courtois, E.A.; Lelong, C.; Calvez, O.; Loyau, A. & Schmeller, D.S. 2013. The use of visible implant alpha tags for anuran tadpoles. *Herpetological Review* 44: 230-233.
37. Guttman, S.I. & Creasy, W. 1973. Staining as a technique for marking tadpoles. *Journal of Herpetology* 7: 388-390.
38. Travis, J. 1981: The effect of staining on the growth of *Hyla gratiosa* tadpoles. *Copeia* 1981: 193-196.
39. Harris, R.N.; Vess, T.J.; Hammond, J.I. & Lindermuth, C.J. 2003. Context-dependent kin discrimination in larval four-toed salamanders *Hemidactylium scutatum* (Caudata: Plethodontidae). *Herpetologica* 59: 164-177.
40. Jung, R.E.; Dayton, G.H.; Williamson, S.J.; Sauer, J.R. & Droegge, S. 2002: An evaluation of population index and estimation techniques for tadpoles in desert pools. *Journal of Herpetology* 36: 465-472.
41. Carlson, B.E. & Langkilde, T. 2013. A common marking technique affects tadpole behavior and risk of predation. *Ethology* 119: 167-177.
42. Fischer, E.K.; Alvarez, H.; Lagerstrom, K.M.; McKinney, J.E.; Petrillo, R.; Ellis, G. & O'Connell, L.A. 2020. Neural correlates of winning and losing fights in poison frog tadpoles. *Physiology & Behavior* 223.
43. Andis, A.Z. 2018. A new, noninvasive method of batch-marking amphibians across developmental stages. *Herpetological Conservation and Biology* 13: 423-432.
44. Measey, G.; Gower, D.; Oommen, O. & Wilkinson, M. 2003. A mark—recapture study of the caecilian amphibian *Gegeneophis ramaswamii* (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae) in southern India. *Journal of Zoology* 261: 129-133.
45. Wheeler, C.A. & Welsh Jr.; H.H. 2008. Mating strategy and breeding patterns of the foothill yellow-legged frog (*Rana boylei*). *Herpetological Conservation and Biology* 3: 128-142.
46. Nace, G. & Myers, E. 1982. Marking individual amphibians. *Journal of Herpetology* 16: 309-311.





## 4.2 ESQUELETOCRONOLOGÍA

**Federico Marangoni<sup>1</sup> & Javier A. López<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> *Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste (FACENA: UNNE-CONICET). Avenida Libertad 5460 — CP 3400 Corrientes, Argentina.*

<sup>2</sup> *Instituto Nacional de Limnología (INALI: CONICET-UNL). Ciudad Universitaria, Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina.*

<sup>3</sup> *Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina.*

El término “*Skeletochronology*” fue propuesto por Castanet et al.<sup>(1)</sup> para análisis teóricos y aplicaciones prácticas del uso de las marcas de crecimiento en el esqueleto (GMs de aquí en más, por sus siglas en inglés: “*Growth Marks*”) mediante los cuales las estrategias de historia de vida, y los factores que las controlan pueden ser descifradas. Esto se debe en parte a que durante la ontogenia de un vertebrado, las variaciones en las tasas de crecimientos producidas por variaciones ambientales locales, tienen una gran influencia en la organización del tejido esquelético mineralizado, principalmente huesos y dientes<sup>(2)</sup>. Si se considera además que cada parte del esqueleto tiene su propia condición específica de crecimiento, el cual también diferirá de un lugar a otro para un estado ontogenético en particular, se estará en condiciones de realizar inferencias de los patrones de crecimiento de un organismo, partiendo de estas variaciones en espacio y tiempo que sufre la organización tisular.

Así, para poder realizar estas inferencias, la esqueletocronología se basa en la presencia de marcas de crecimiento óseo de forma cíclico y anular, que se puede visualizar en secciones transversales principalmente de los huesos largos de los organismos. En los anfibios, especialmente en anuros y caudados, las marcas de crecimiento en el esqueleto osificado son identificadas con gran calidad debido a que los huesos de los “anfibios modernos” poseen una organización ósea muy simple<sup>(3,4)</sup>. A pesar de ello, desde la década de los 40, momento en el cual Senning reporta por primera vez la presencia de GMs en los huesos de *Necturus maculosus*, no siempre ha sido fácil encontrar un consenso en la descripción e identificación de estas marcas. Por ello resulta importante describir brevemente las tres categorías de GMs que pueden ser identificadas:

**ZONAS:** corresponden a las capas opacas más anchas, que se visualizan en las secciones transversales, depositadas durante los períodos anuales de osteogénesis activa<sup>(5)</sup>.

**ANNULI:** corresponden a períodos donde la osteogénesis es más lenta y, por lo tanto, estas marcas son más estrechas y translúcidas que las zonas adyacentes<sup>(5)</sup>.

**LAGs (*Lines of Arrested Growth*):** son líneas siempre delgadas, funcionalmente definidas como líneas de descanso (“*resting lines*”) que se depositan en los periodos donde la osteogénesis casi se detiene o se detiene completamente<sup>(6,7)</sup>.

En forma genérica, se puede decir que las GMs son la expresión de una variación gradual en la velocidad de la osteogénesis que se da en cada marca. Esto determina en su conjunto un ciclo completo de deposición del hueso. De este modo cada ciclo sucesivo comprende: una osteogénesis muy activa (ZONAS), pasando por una de menor actividad (ANNULI), y finalmente un detenimiento o “descanso” de la misma (LAGs). Cabe mencionar que

en muchos ocasiones, dependiendo de factores intrínsecos o extrínsecos de cada especie, esta descripción general sufre importantes modificaciones (e.g. no siempre están presente las annuli, presencia de doble LAGs, reabsorción ósea, entre otras), que se tratará en detalle al explicar el análisis de interpretación de los cortes realizados.

Las estimaciones de la edad a través del conteo directo de las LAGs, tanto en Argentina como en el resto del mundo sigue, en sus aspectos más generales, los procedimientos histológicos empleados por Castanet<sup>(3)</sup> y Castanet y Simirina<sup>(4)</sup>. Aunque pueden incorporarse pequeñas modificaciones a la técnica en función de las características de las muestras, equipamiento y objetivos del trabajo. En este punto es preciso quizás recordar que la esqueletocronología no es una línea de investigación en sí misma, sino, simplemente, un método que permite responder formulados que realizan los investigadores a la hora de intentar entender diferentes procesos y mecanismos próximos que determinan las observaciones efectuadas. En otras palabras, es la herramienta que permite acercarse, dentro de diferentes líneas de investigación, a un mejor entendimiento de las posibles adaptaciones, patrones, estructuras o funciones, en la historia de vida de una población, especie o comunidad biológica.

### **Primer paso, obtención de las muestras**

Como se sugirió en los párrafos introductorios, la muestra para esqueletocronología consiste en huesos largos de los individuos a analizar. La cantidad de individuos a analizar dependerá íntimamente de los objetivos del trabajo y de la disponibilidad de ejemplares.

Los huesos pueden ser tanto falanges (lo más usual) u otros huesos largos tales como húmeros, fémures, etc. (menos usual)<sup>(8,9,10)</sup>. Una ventaja del uso de falanges es que pueden obtenerse de animales vivos, ya que el corte de un dedo (*toe clipping*) no debería afectar significativamente la supervivencia del animal, ni genera mucho estrés<sup>(11)</sup>. La alternativa es el uso de animales de colección, en los que la selección del hueso a utilizar dependerá del objetivo del trabajo, el tamaño del animal y la posibilidad de disponer solo de una/s falange/s, u otro hueso largo.

### **Aspectos a considerar en y para el ajuste de la técnica de esqueletocronología**

Los mayores aspectos que hacen al ajuste de la técnica son:

**a) La especie que se vaya a estudiar**

Las diferencias que puedan surgir en la metodología para la estimación de la edad, en función de las especies a estudiar, están relacionadas a los tamaños de las falanges, u otros huesos largos (húmero, fémur) propios de cada especie, y al patrón de crecimiento que cada especie presenta. No es intención en este punto ahondar en las particularidades de cada especie, pero podríamos decir de forma general en base a la experiencia y, centrado en la revisión de estudios que se han realizado en la última década en especies Argentinas, que la mayor o menor factibilidad de obtener buenos cortes y GMs bien definidas, ya se evidencia a nivel Familia. Así, especies de la familia Bufonidae como *Rhinella achalensis*, *R. arenarum*, *Melanophryniscus devincenzii*, *M. atroluteus* y *M. krauczuki*<sup>(12-15)</sup>; Microhylidae: *Dermatonotus muelleri*<sup>(16, 17)</sup>; Ceratophryidae: *Ceratophrys cranwelli*<sup>(16)</sup> y *Chacophrys pierottii*<sup>(18)</sup>; Leptodactylidae: *Leptodactylus latinasus*, *L. mystacinus*, *L. luctator*, *L. bufonius*, *Physalaemus fernandezae*<sup>(19-22)</sup>; Hylidae: *Nyctimantis siemersi*<sup>(23,24)</sup> y Odontophrynidae: *Odontophrynus cf. barrioi*<sup>(25)</sup>, presentan diferencias que hace más fácil o dificultosa la tarea de hacer una lectura y análisis de las GMs. Las especies de la familia Bufonidae tienen, por ejemplo, huesos de las falanges de diámetro mayores en relación al tamaño corporal, presentando mayor área de hueso cortical, y unas GMs que, por lo general, están bien definidas y se tiñen con un buen contraste. Las especies de la familia Leptodactylidae, presentan LAGs que se tiñen más débilmente, y dado su patrón de crecimiento acelerado, es posible observar en las Zonas de crecimiento (es decir entre dos verdaderas LAGs) otras líneas más delgadas y más suavemente teñidas, que pueden dificultar su lectura. Como ejemplo de diferencias entre especies de una misma familia se puede citar el caso de la diferencia en este aspecto que se observa entre las especies de los géneros *Rhinella* y *Melanophryniscus*, siendo estas últimas más complejas a la hora de estimar la edad, dado su pequeño tamaño de hueso y la proximidad de diferentes GMs que se depositan en el mismo.

Por estas diferencias, y considerando el esfuerzo que demandan los cortes, con los gastos de insumos asociados, es recomendable analizar *a priori* qué especies son de interés para analizar, entre el abanico de posibilidades que se presenta. Lo ideal sería una especie con un tamaño de hueso cortical importante, que se conozca por la literatura que las líneas se expresan bien, y que no hay dificultad en su lectura y análisis posterior.

#### **b) Preparación de los tejidos: tiempos y agentes utilizados en la fijación, descalcificación, deshidratación, inclusión, desparafinado y colorante utilizados para la tinción**

Siguiendo la cronología con que se realiza el procesamiento de los tejidos, hasta el corte en sí en el micrótopo, se recomienda tener en cuenta:

El agente y tiempo de descalcificación que se va a utilizar. La mayor parte de la literatura y los estudios realizados en Argentina utilizan preferentemente el ácido nítrico al 5%. No obstante, en lo que se refiere a los tiempos de descalcificación existe mucha variación entre especies, autores y técnicas.

Los tiempos de descalcificación siempre están en relación a la longitud y diámetro del hueso. No es lo mismo el tiempo que llevará la descalcificación de una falange del dedo III de un *Rhinella diptycha* que el de un *Physalaemus albonotatus*. En la mayoría de los casos los tiempos de inmersión de las falanges en ácido nítrico varían entre 30 minutos y hasta 72 horas. Lo aconsejable es estandarizar los tiempos para cada especie, pinchando cada 30 minutos la falange con un alfiler entomológico y testear su rigidez hasta lograr que el tejido tome una consistencia más flexible para realizar el corte.

Por otro lado, existen diferencias entre autores a la hora de decidir si descalcificar las falanges sin extraer los tejidos que la recubren, o hacerlo con anterioridad y poner el hueso, pelado. Nuestra experiencia permite sugerir que no existen diferencias, en lo que a calidad de corte obtenido se refiere, en un caso u otro.

#### **c) Equipamiento para el procesamiento de los tejidos. Procesador “calesita”, dispensador de parafina, baño de flotación, casetes**

Quizás en este punto es donde se pone en juego la creatividad del investigador, becario o técnico que esté a cargo de los cortes. Es evidente, que toda aquella “ocurrencia innovativa” para reducir tiempos y costos, del personal y del laboratorio, es siempre aceptado con muy buen agrado. Es por ello que, si bien la mayoría sigue una metodología estándar, en los procesos de deshidratación, inclusión, desparafinado y tinción de los cortes, en cada laboratorio se haya incluido alguna modificación. Así se observa cómo varían la cantidad de concentraciones diferentes de alcoholes que se utilizan, la inclusión o no de Peterfí para evitar el endurecimiento de los huesos o el reemplazo del xileno por otro agente menos invasivo para el tejido. Además, los pasos por los diferentes agentes se puede realizar de un modo manual o con un procesador automático, o comúnmente llamado “calesita”. En la inclusión entra en juego las diferencias en el medio de inclusión que se utiliza, ya sea parafina y el tipo de parafina según los grados de temperatura que acepta, otros medios de inclusión como el caso de la resina plástica, que es más costosa y no reciclable, pero brinda un mejor medio de “sostén” al tejido. Consideramos que una parafina de 50-60 °C es lo más aconsejable y lo que se utiliza en la mayoría de los casos, y no existen grandes diferencias en eficiencia a la hora de obtener buenos cortes. Lo importante en este caso es que siempre la parafina esté en el rango de temperatura adecuado, no muy

caliente por ejemplo, y que siempre se encuentre limpia. Es recomendable reemplazarla cuando se observa que ya comienza a perder el color blanco original.

También es muy simpático conocer cómo en cada laboratorio se han esmerado por equilibrar la balanza de costo/beneficio, a la hora de elegir el molde en el cual se va a incluir el tejido en el medio seleccionado. Desde los clásicos casetes que se compran en las proveedoras científicas, pasando por el armado manual de pequeños recipientes con papel metalizado, hasta la utilización de la parte posterior de las pipetas plásticas Pasteur descartables. No cabe duda en este caso que el tamaño del tejido y la orientación correcta que se le debe dar juega un rol importante. En este sentido, sería un costo en vano de parafina y tiempo y agentes de desparafinado, colocar una minúscula falange de *Melanophryniscus* en un casete. Para ello es recomendable el armado de un molde alternativo “casero” más pequeño (**Figura 4.2.1**).

#### **d) Equipamiento de corte: Criostato vs. Micrótomos de rotación tipo Spencer**

Nuevamente aquí se presenta el caso de la balanza costos/beneficios. Quienes han tenido la posibilidad de usar los dos medios más comunes de instrumental de corte lo saben.

Por un lado, el Criostato presenta grandes ventajas frente al Micrótomos de rotación tipo Spencer (**Figura 4.2.1**). Si bien el paso de la descalcificación es el mismo, una vez realizado este paso, con el Criostato se pasa directamente al corte de los huesos. Es decir, no se precisa ni la deshidratación previa al corte, ni a la tinción. Una vez descalcificada la muestra se incluye con un medio, que casi de forma instantánea se congela, en el interior del criostato y se procede inmediatamente el corte del hueso, para posteriormente pasar a la tinción directa con unas gotas de Hematoxilina. Por lo general, la selección de los cortes bajo lupa y el montaje directo en los portaobjetos se realiza utilizando un medio permanente no soluble en xileno. En esta etapa es aconsejable poner los cortes teñidos en unas cápsulas de Petri con agua, para ayudar al viraje del colorante, mientras bajo lupa binocular se seleccionan para el montaje aquellos en los que se observa mayor hueso cortical, poca reabsorción ósea y GMs evidentes.

Por la rapidez con que se obtienen resultados con el criostato, debido al menor número de pasos en el corte en comparación con el micrótomos rotatorio, es que es muy utilizado en laboratorios patológicos donde es preciso acelerar los tiempos para el diagnóstico que se requiera.

La desventaja que existe es el costo de adquisición del instrumental. Es un equipamiento de importación, con precios en dólares, y que siempre superan



#### (A) MICROTOMO DE ROTACIÓN TIPO SPENCER

##### Recomendaciones:

- Realice periódicamente un ajuste de todos los tornillos del mecanismo interior y exterior.
- Mantenga siempre lubricado el mecanismo. Puede utilizarse aceite de máquinas de coser.
- Mantenga siempre limpio de polvo o restos de parafina el equipo.



#### (B) CASETES PARA INCLUSIÓN

##### Opciones:

- Se pueden usar los casetes comerciales o bien construir pequeñas canastitas con malla plástica con menor costo.
- En cualquiera de los casos, de ser muy pequeños las falanges u otro tejido a procesar, es aconsejable envolver el mismo con pequeños retazos de medias de nylon de mujer. De esta manera evitaremos que los tejidos se escapen por los orificios del casete o canastita.

**Figura 4.2.1:** Equipamiento para el procesamiento de los tejidos. Todas las fotografías incluidas en la figura fueron realizadas con el instrumental e insumos del “Laboratorio de Histología de la Asignatura Limnología de la FACENA-UNNE” por el Lic. José Miguel Piñeiro, bajo la dirección del Dr. Federico Marangoni.

**(C) MOLDES DE CONFECCIÓN DE TACOS DE PARAFINA****Opciones:**

- Optar por los comerciales, o fabricar de modo casero
- Para pequeñas falanges, de fabricar pequeños moldes con la parte posterior de pipetas plásticas en desuso. De esta manera se logra un taco de forma cilíndrica en vez de cuadrada o rectangular, pero igual de efectiva a la hora de realizar los cortes.

**(D) PARAFINERO****Opciones:**

- Existen opciones alternativas para comprar un parafinero.
- En este caso se adaptó, un parafinero que se puede adquirir en las casas especializadas en artículos de peluquerías. Al mismo se le incorporó una canilla que dispensa la parafina, recubierta de un material que evita la pérdida de calor y consiguiente solidificación de la parafina.

**(E) CUCHILLAS**

- En este caso se transformó la cuchilla que trae el micrótomomo, a un soporte para cuchillas descartables.
- A la cuchilla original se le realizó un muesca tipo "socalo" para que descansa la cuchilla descartable, y mediante tres orificios se asegura otra pieza construida, con función de sujetador que mantiene fija la cuchilla. Se requirió del trabajo de un tornero.
- Las descartables es reemplazan al perder el filo. Por el contrario las que trae de fábrica el micrótomomo hay que mandarla a afilar.





los porcentajes máximos que se pueden utilizar en un proyecto de investigación para la compra de este tipo de equipamiento (material inventariable). Con lo cual para un grupo en formación es una tarea titánica.

Sin considerarla una desventaja, también esa rapidez con que se obtienen los resultados en el criostato, se traduce en una merma de la calidad de los cortes. Se puede observar mejores detalles y mayor nitidez con la metodología que se aplica usando un micrótopo rotatorio dado que los tejidos se tiñen y aclaran mejor. Esta es en sí, además de la reducción en la compra del equipamiento, mucho más accesible para cualquier laboratorio, una de las razones del porqué este tipo de micrótopo es el instrumental más utilizado en esqueletocronología.

En la **Caja 4.2.1** se ha compilado una serie de causas posibles de problemas diferentes que pueden surgir cuando se realizan cortes histológicos con el micrótopo rotatorio.

#### **e) Tinción, colorantes más utilizados**

Como en la mayoría de los estudios generales de histología, la Hematoxilina-Eosina (H&E) suele ser el teñido de rutina. En el caso de la esqueletocronología, la hematoxilina de Harris se usa en el método regresivo. Este consiste en teñir todas las estructuras del tejido y luego someterlo a un proceso de decoloración controlada. En cambio, cuando se utiliza hematoxilina de Mayer, el método es progresivo. La tinción progresiva consiste en obtener una coloración adecuada controlando el tiempo de la sección en el colorante, de modo que a más tiempo más coloración. Otra de las hematoxilas comúnmente usada es la de Ehrlich o de Gill.

Como recomendación para su uso es mantenerla en lugar seco y fresco, y filtrarla antes de su uso, valiéndose de un papel de filtro de café por ejemplo.

#### **f) Medios de montaje**

Para el caso del criostato, se utiliza un medio comercial cuya formulación es sólo conocida por sus fabricantes. En su reemplazo hemos tenido buenos resultados con el adhesivo sintético Voligoma®. Por otro lado, en el caso de realizar la técnica con el micrótopo rotatorio, el más común y permanente es el bálsamo de Canadá. Sin embargo, también es posible utilizar una solución 1:1 de glicerina líquida y alcohol. Si bien esta última tiene la ventaja de ser más barata, es un medio de montaje no permanente. Por ello, transcurridos unos pocos días, se puede comenzar a observar decoloración de los tejidos. Por lo cual se recomienda realizar el fotografiado de las secciones de hueso, el mismo día o al día siguiente de realizar los cortes.

### Caja 4.2.1 - Problemas con cortes histológicos

#### **CINTA PARTIDA O RASGUÑADA A LO LARGO**

- Polvo o material indeseable en el filo de la cuchilla.
- Calcio o cuerpos extraños en el tejido.
- Partículas o Polvo en la parafina.

#### **CORTES GRUESOS Y DELGADOS**

- Bloque muy grande para el micrótopo.
- Tornillos sueltos.
- Bloque o tejido muy duro para cortar.
- Cuchilla oxidada.
- Grado de inclinación de la cuchilla insuficiente

#### **COMPRESIÓN Y ARRUGAS**

- Bloque o cuchillas calientes.
- Cuchilla muy vertical.
- Cortes muy finos.
- Tornillos del micrótopo sueltos.
- Cuchilla sin filo.

#### **CORTES CON AGUJEROS O PORCIONES FINAS Y GRUESAS**

- Tejidos procesados incompletos.

#### **CORTES INCOMPLETOS, SECOS O DEGRADADOS**

- Procesamiento o infiltración incompletos.
- Parafina muy caliente al momento de infiltrar o incluir.

#### **NO SE FORMAN CINTAS**

- Cuchilla sin filo.
- Bloque muy caliente.
- Ángulo incorrecto de la cuchilla.
- Mecanismo del micrótopo suelto.
- Procesamiento incompleto.

#### **RASGUÑOS, LINEAS O FRACTURAS EN EL CORTE**

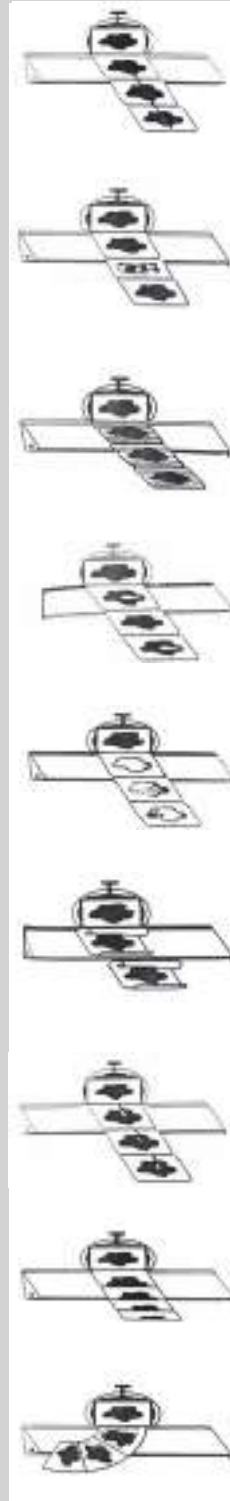
- Polvo o cuerpos extraños en la parafina.
- Calcio o cuerpos extraños en el tejido.

#### **CORTES DE TAMAÑO DESIGUAL**

- Bloque inadecuadamente devastado.
- Bloque no alineado con la cuchilla.

#### **CINTAS TORCIDAS O DESIGUALES**

- Filo de la cuchilla irregular.
- Bloque y cuchilla no están paralelos.
- Bloque no es rectangular o cuadrado.



### **g) Equipamiento para el fotografiado**

Gracias al avance en la tecnología hoy podemos observar desde imponentes, costosos y calificados microscopios con cámaras fotográficas acopladas, hasta un simple soporte para realizar fotografías con cualquier teléfono equipado con cámara directamente acoplado al ocular. Es evidente que las funcionalidades y las posibilidades que se abren teniendo un buen equipamiento no tienen discusión. Sin embargo, hay que mencionar que para el caso de obtener las fotomicrografías de los cortes de falanges, basta con un teléfono equipado con cámara y, como se indica a continuación, de un software para la posterior medición de las GMs.

### **h) Medición de los cortes y calibración del instrumental**

A lo largo de los años, y el paso por varios laboratorios, hemos observado que son muy pocos los casos en los que se cuenta con un microscopio con cámara acoplada y conectada a un software que esté bien calibrado en función de los distintos aumentos que se seleccionen para la obtención de las fotos. En muchos casos es necesario recurrir a la transformación de píxeles a micras u otras magnitudes, partiendo de una referencia de medida conocida, para calcular el tamaño del hueso. Estas medidas de referencias se pueden obtener fotografiando, con cada uno de los objetivos que presente el microscopio, un portaobjetos milimetrado que se puede comprar en las proveedoras científicas, a partir de fotografiar una cámara de Neubauer o directamente fotografiando un papel milimetrado. Con estas fotos de referencia se podrá calibrar los softwares a utilizar. Esto será el caso de no contar con uno ya calibrado en el laboratorio.

Para la medición de los cortes, en la mayoría de los estudios se toma el diámetro del eje mayor y menor de la cavidad medular, de cada LAGs y del perímetro del hueso. Esto servirá para los posteriores análisis del tamaño del hueso y poder estimar los patrones de crecimiento de la especie en estudio.

Siempre es aconsejable tomar como mínimo dos buenas fotos con el menor aumento en el que el corte sea visible en todo su contorno, las cuales servirán posteriormente para realizar las mediciones. Otras dos como mínimo, con el mayor aumento que el tamaño del corte lo permita, nos servirá para tener un buen detalle de la sección de hueso donde se analizarán las GMs y se estimará la edad.

### **i) Interpretación de las GMs para las estimas de la edad y patrón de crecimiento**

Se podría decir que esta etapa, luego de la obtención de los datos, es la más importante de todas. Será la forma en que se interpretan los resultados ob-

tenidos lo que dará mayor probabilidad de realizar una estimación segura de la edad. Claro que el lanzarse a la aplicación de la técnica, aprender sobre ella, y poder obtener buenos cortes es algo que se debe alentar a quienes se interesen en la ecología de anfibios y reptiles. Pero, no se debe olvidar proveer también el asesoramiento o el material bibliográfico que permita a los principiantes adquirir los conocimientos teóricos para luego poder interpretar lo que observan en las fotografías de los cortes. En muchos casos el personal adiestrado en la técnica obtiene muy buenos cortes, pero no ha recibido la preparación previa suficiente para entender lo que observa bajo el microscopio e intenta sacar conclusión a tientas.

Los procedimientos habituales que se siguen y aconsejan para la interpretación de los cortes son:

- Que las observaciones (o lectura de los cortes) se realicen de forma independiente por al menos dos personas. Esto garantiza que la estimación que cada uno realiza, no se verá condicionada por la interpretación de la otra persona.
- Que ninguno de los dos observadores cuente con la información del sexo o tamaño del individuo del cual proceden las falanges que está observando. Conocer a priori esta información los convertiría en observadores subjetivos, partiendo que generalmente en los anfibios se ha demostrado que las hembras alcanzan la madurez sexual en años posteriores a los machos, y que en algunos casos, el tamaño puede ser directamente proporcional a la edad. Como ejemplo, ante la duda si un animal tiene 3 o 4 años, se podría incurrir en el sesgo de optar por los 4 años al conocer con antelación que se trata de una hembra.
- En una etapa posterior, ambos observadores contrastarán sus datos y definirán, de forma conjunta, qué edad acuerdan en aquellos individuos que no hubo coincidencia en la estimación de la edad al analizarlo de forma independiente. La experiencia demuestra que esta instancia es muy enriquecedora, sobre todo cuando alguno de los dos observadores posee un mayor conocimiento en interpretación de los cortes y, como se indica más adelante, un buen conocimiento de la ecología de la especie en estudio.
- Siempre se selecciona para la estimación de la edad, aquellos cortes que contengan la mayor cantidad de hueso cortical y menor cavidad medular (ver más abajo), como es el caso de aquellos cortes de las diáfisis de los huesos largos donde se pueden observar las GMs.
- Dentro de la variedad de cortes “buenos” que se pueden encontrar al atravesar la diáfisis, siempre se recomienda seleccionar para la estimación de la edad aquellos cortes donde se observa la mayor cantidad de LAGs. Si bien

los estudios demuestran que la cantidad de LAGs, o por expresarlo de otra forma, la edad estimada en LAGs, no varía en función del corte de una u otra falange, u otro hueso largo del mismo individuo, es posible encontrar algún tipo de variación en la cantidad de LAGs observadas entre diferentes secciones de un mismo individuo, producto de un artefacto de la técnica.

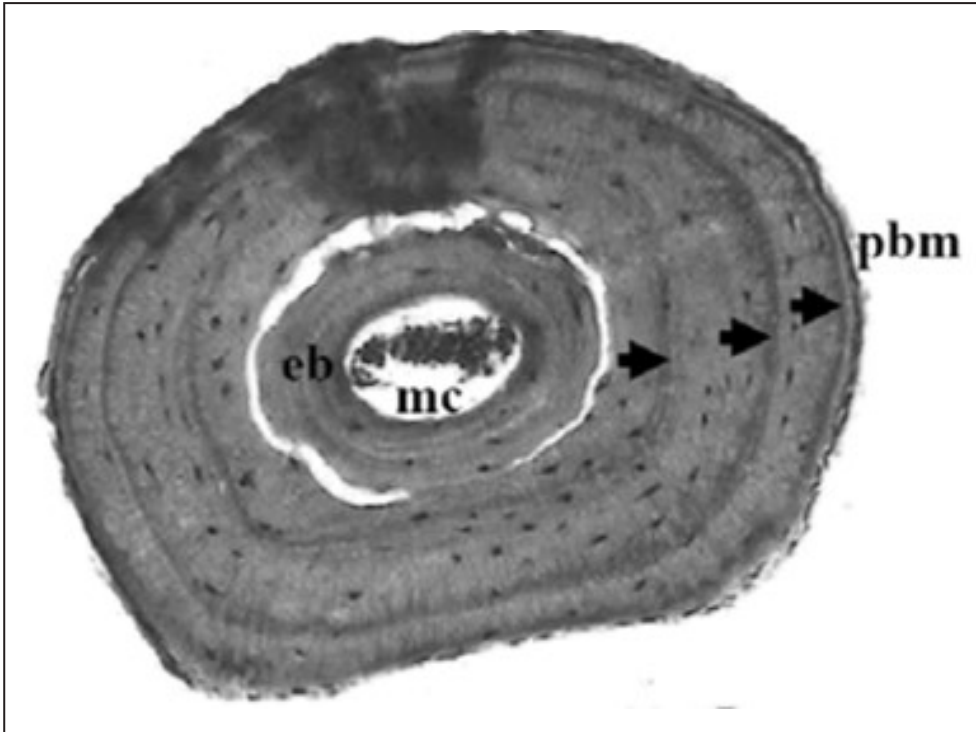
- Como ya se ha mencionado, es sumamente importante tener un conocimiento exhaustivo de la ecología en general, y particularmente de la biología reproductiva de la especie en estudio. Es necesario saber cuáles son sus períodos de actividad reproductiva, períodos que está activo pero que no necesariamente esté en la búsqueda activa de pareja o en núcleos reproductivos y los períodos de inactividad, sean hibernación o estivación. Como es sabido, existen especies que se reproducen en invierno y pasan el verano inactivos o viceversa. Por otro lado, también es muy importante conocer si dentro de un mismo año, una especie puede atravesar uno o dos periodos de actividad/inactividad, como es el caso de *Triturus marmoratus*<sup>(33)</sup>. Como se indicará a continuación en el párrafo de “Formación y cronología de las LAGs”, el desconocimiento de estos aspectos podría llevar a errores, por sobre o subestimación de la edad.

Realizadas estas las aclaraciones, las sugerencias para el procedimiento de identificar las GMs y estimar la edad son:

- 1) Identificación de las GMs.
- 2) Identificación de la línea de Metamorfosis.
- 3) Reabsorción endosteal e Identificación de la Línea de Reabsorción.
- 4) Presencia de LAGs en el hueso endosteal.
- 5) LAGs suplementarias.
- 6) Consideración del perímetro de hueso como una LAGs.

1) Para identificar las GMs resulta sumamente necesario contar con el conocimiento previo de lo que son las Zonas, Annuli, LAGs, y hacer una identificación de ellas como primera medida (**Figura 4.2.2**).

2) Se debe identificar la Línea de Metamorfosis (LM, de aquí en más) para, luego, expresar en qué porcentaje del total de individuos fue observada. La presencia de la LM garantiza que en el proceso de remodelación, la absorción ósea, no ha degradado ninguna de las LAGs más internas. Es decir, aquellas que se formaron en los primeros años de vida de un individuo. Esto,



**Figura 4.2.2:** Sección de falange de una hembra adulta de *Physalaemus fernandezae* teñida con Hematoxilina de Ehrlich, donde se pueden observar tres LAGs en el periosteo (indicadas con flechas). mc: cavidad medular, eb: hueso endosteal, pbm: margen del periosteo. Extraído de Marangoni y colaboradores<sup>(19)</sup>

en el caso de ocurrir, podría llevar a una subestimación de la edad.

Consecuentemente, la presencia de la LM también estará indicando los límites entre el hueso endosteal y el periosteo, siendo en este último donde se contarán las LAGs que se observan. Para la identificación a nivel histológico de la LM, el endosteo y periosteo, se sugiere la lectura de la bibliografía recomendada en el siguiente punto (**Figura 4.2.2**).

3) Como se ha comentado anteriormente, las LAGs depositadas en la región más interna del periosteo, es decir aquellas que se formaron durante los primeros años de vida (generalmente la primera o segunda LAGs), pueden ser totalmente removidas durante la reabsorción perimedular del hueso endosteal. Este proceso de remodelación ósea, deja marcada una línea identificable, mayormente en adultos con mayor grado de hueso endosteal, por su contorno irregular que se tiñe menos intensamente que la LM. Esta línea es denominada por muchos autores como Línea de Reabsorción (LR, de aquí en más). En los casos donde puede observarse reabsorción ósea, la LR pasa a ser el límite entre el hueso endosteal y el periosteo, y no la LM que fuera removida en el proceso. Es preciso también mencionar que las causas próximas de la reabsorción no están muy bien entendidas hasta el momento, por lo que se sugiere la consulta de: Castanet y colaboradores<sup>(26)</sup>, Hemelaar<sup>(27)</sup>, Castanet & Smirina<sup>(4)</sup>, Sinsch<sup>(28-30)</sup>, Marangoni y colaboradores<sup>(31)</sup> (**Figura 4.2.2**).

4) Durante la osteogénesis, las Zonas se alternan con líneas que se tiñen intensamente con Hematoxilina y representan periodos de detenimiento del crecimiento. Por tal motivo se las denomina LAGs, “*Lines of Arrested Growth*”, líneas de detenimiento o de descanso (“*resting lines*”), dado que unas pocas semanas sin osteogénesis es suficiente para inducir la deposición de las LAGs en anfibios<sup>(32)</sup>. Castanet y colaboradores<sup>(26)</sup> las describen como “más translúcidas que las otras marcas, también son más refractarias y aparecen como la estructura ósea más brillante bajo luz polarizada” (*sic*) (**Figura 4.2.2**). En el apartado siguiente se aborda el origen de su formación y cronología.

5) Al comenzar esta sección se hizo mención a la importancia que tiene, a la hora de realizar una estimación correcta de la edad por análisis de las GMs, el conocimiento exhaustivo de la biología reproductiva de la especie. Como se describe en el punto (4), las LAGs representan momentos en los que la osteogénesis se detiene, y si bien que las origina se analizará más adelante, está claro que estos periodos corresponden a momentos en los que los individuos se encuentran inactivos, ya sea por inviernos fríos y/o secos (hibernación), o veranos calurosos y secos donde los cuerpos de agua para la reproducción desaparecen y los individuos permanecen en sus refugios (estivación). También, se adelanta para una mejor comprensión, que estas LAGs en la mayoría de los casos se forman anualmente, es decir porque los individuos tienen un solo periodo de inactividad por año, sea por hibernación o estivación. Sin embargo, la presencia de LAGs suplementarias que irrumpen la regla general de “una LAGs por año”, es un caso que ocurre en un número importante de especies<sup>(8,27,33-35)</sup>. En muchos de los casos esto es debido a dos periodos de inactividad/actividad en un mismo año, lo que lleva a la formación de dos LAGs por año. Es aquí donde toma relevancia la recomendación de conocer *a priori* la biología de la especie que se estudia a fin de poder interpretar correctamente este tipo de excepciones a la regla general cuando se presente.

6) Otro de los detalles abiertos al debate entre los herpetólogos que aplican la técnica esqueletocronológica para la estimación de la edad, es la consideración o no del perímetro de hueso (es decir del borde exterior) como una LAGs. Es frecuente entre los observadores, que se opte por contar la cantidad de Zonas, es decir cuántos periodos de crecimiento tuvo el individuo, u optar por contar la cantidad de periodos de detenimiento del crecimiento, es decir, la cantidad de LAGs que se observan en la sección del hueso. Es en este último caso, donde se presenta la disyuntiva de considerar o no al perímetro como una LAG más. En este caso se debería considerar dos cosas: en primer lugar, la fecha de captura, y en segundo lugar, e insistiendo en el conocimiento previo que se debe tener sobre la biología de la especie en estudio, saber si la fecha de captura fue en los días o meses anteriores a la

hibernación/estivación, o por el contrario los individuos se capturaron en un lapso de tiempo inmediato posterior a estos períodos. En la **Figura 4.2.2**, se observa cómo en el primer caso el perímetro se cuenta como una LAG más, y no se cuenta de ocurrir el segundo caso.

## **Formación y cronología de las LAGs y validación del método**

### **Validación:**

Es importante, a la hora de realizar las interpretaciones correctas y poder discutir los resultados, detenerse a considerar las causas que originan la formación de las GMs, y su periodicidad. La bibliografía es muy extensa (ver Sinsch<sup>28</sup>), y a pesar de haber estado en debate por varias décadas, hoy existe suficiente evidencia para afirmar que:

Los estudios soportan la hipótesis de Castanet y colaboradores<sup>(26)</sup> quienes sostienen que la formación de las LAGs es, en última instancia, causada por una base genética con un ritmo circanual, que bajo condiciones naturales se torna sincrónica y reforzada con el ciclo estacional.

Para los anfibios sujetos a una marcada estacionalidad (cálido/frío o seco/húmedo), el ciclo climático anual parece ser el factor ambiental más importante responsable de la periodicidad anual observada.

Sin embargo, como se demostró en las últimas décadas, estudios realizados en especies tropicales y subtropicales, que viven en condiciones climáticas más o menos constantes a lo largo del año, o en condiciones estables de laboratorio (ver seguidamente), las líneas se expresan de igual forma<sup>(12-25)</sup>.

La periodicidad de las LAGs es anual, con excepción de aquellas especies que pueden presentar un doble ciclo de actividad anual<sup>(8,27,33-35)</sup>.

Ahora bien, en la práctica, para confirmar la confiabilidad del método esqueletocronológico, se puede asumir esa periodicidad anual basada en las fuentes bibliográficas que la confirman en numerosas especies, o bien confirmarlo empíricamente para cada una de las especies de las cuales se quiera describir su estructura de edad y sus parámetros relacionados.

Distintos acercamientos que se pueden utilizar y algunas consideraciones finales:

### **(i) Individuos de edad conocida**

Se puede referir el caso del trabajo pionero de Schroeder y Baskett<sup>(36)</sup> quienes



marcaron 42 metamórficos de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*), utilizando la técnica de toe-clipping<sup>(37)</sup>. Se criaron por muchos años en sitios cercados, y posteriormente se pudo confirmar que el número de zonas o annulis marcadas en el hueso pterigoideo, fueron iguales al número de años transcurridos desde el marcado de los metamórficos.

### (ii) Estudios de Marca-Recaptura en la naturaleza

(*ii*a) *Metamórficos*: es posible, siguiendo lo realizado por Tejedo y colaboradores<sup>(38)</sup> realizar una marcado individual de anfibios metamorfoseándose en una charca, y dado su intensa filopatría, realizar recapturas en su regreso al cuerpo de agua en años posteriores. Así, mediante el uso de la esqueletronología, confirmar la concordancia entre los años transcurridos desde la metamorfosis (cuando se los marcó) y la cantidad de líneas que se observa en los huesos.

(*ii*b) *Adultos*: esto implica la captura de adultos, de los cuales no se requiere conocer la edad *a priori*, sino simplemente observar la cantidad de líneas presentes en, por ejemplo, las falanges al momento de la captura. Posteriormente, cuando en años sucesivos se recapture el mismo individuo, se aplicará la técnica utilizando otra de sus falanges. Si la periodicidad es anual, el número de LAGs incrementadas entre la primera falange y segunda falange cortadas, se debería corresponder con los años transcurridos.

### (iii) Etiquetado fluorescente

Este método implica la introducción de marcas artificiales teñidas en el hueso en crecimiento y la realización de estudios de marca-recaptura. Estas marcas artificiales nos van a permitir observar el momento preciso de la deposición de las marcas y confirmar de esta manera su periodicidad.

Sin lugar a dudas, al considerar las alternativas de validación del método mediante las opciones (i) y (ii), los investigadores se encuentran con algunas problemáticas. Una de las que se resalta es el insignificante porcentaje de recapturas reportadas para anfibios cuando se marcan individuos en la naturaleza. Así, el esfuerzo en recursos humanos y financieros, relacionado a los resultados obtenidos, hace que estos métodos sean poco eficientes. Lamentablemente, en muy pocos casos es posible esperar el tiempo necesario para que los individuos marcados regresen a los cuerpos de agua, sea en uno, dos, o más años para poder validar el método y posteriormente publicar los resultados.

## Validación del método en especies de Argentina

En anfibios de Argentina, existen en la actualidad solo tres trabajos publicados que validaron el método en tres especies de anuros. Marangoni y colaboradores<sup>(16)</sup> criaron desde la metamorphosis (G-43, Gosner<sup>39</sup>) hasta cumplido un año de edad (desde el 15 de diciembre de 2006 al 15 de diciembre de 2007), siete individuos de *Ceratophrys cranwelli* y nueve de *Dermatonotus muelleri*, en los que se confirmó no solo la periodicidad anual de las GMs, sino también, la hipótesis de la base genética en la formación de la edad propuesta por Castanet y colaboradores<sup>(26)</sup>. Esto último basado en que los individuos fueron criados en condiciones constantes de laboratorio, eliminando cualquier influencia del ambiente, y los individuos permanecieron durante todo el año en actividad. A pesar de estas condiciones, las GMs se formaron en las falanges analizadas.

López y colaboradores<sup>(21)</sup>, capturaron ocho individuos adultos de *Leptodactylus luctator*, realizaron el corte de la primera y segunda falange del segundo dedo del pie izquierdo y los mantuvieron en cautiverio durante un año (diciembre de 2013 a enero de 2015). Los ocho ejemplares fueron divididos en dos grupos de cuatro individuos. Un grupo fue mantenido en condiciones estándares de laboratorio ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 12hs luz / 12hs oscuridad), eliminando cualquier influencia del ambiente. Mientras que el otro grupo fue mantenido en una habitación con menor temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y luz natural. Transcurrido el año de cautiverio, realizaron el corte de la tercera falange del mismo dedo y se compararon las GMs al inicio y al final del cautiverio para los individuos. En los ocho ejemplares se observó la formación de una sola LAG tras el año de cautiverio, sin relacionarse con el grupo al que pertenecieran, confirmando también en esta especie la hipótesis de la base genética en la formación de las GMs propuesta por Castanet y colaboradores<sup>(26)</sup>.

Recientemente, Piñeiro y colaboradores<sup>(24)</sup>, utilizando la misma metodología propuesta por Marangoni y colaboradores<sup>(16)</sup>, llegaron a las mismas conclusiones analizando en este caso individuos de *Nyctimantis siemersi*.

## Bibliografía

1. Castanet, J.; Meumier, F.J. & de Ricqlès, A. 1977. L'enregistrement de la croissance cyclique par le tissu osseux chez les Vertébrés poikilothermes: données comparatives et essai de synthèse. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique* 111: 183-202.
2. Amprino, R. 1947. La structure du tissu osseux envisagée comme expression de différences dans la vitesse de l'accroissement. *Archives de Biologie* 58: 315-330.
3. Castanet, J. 1982. Recherches sur la croissance du tissu osseux des reptiles. Application: la méthode squelettochronologique. Unpubl. PhD diss., Université Paris 7, Paris.
4. Castanet, J. & Smirina, E. 1990. Introduction to the skeletochronological method in amphibian and reptiles. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie* 11: 191-196.

5. Peabody, F.E. 1961. Annual growth zones in vertebrates (living and fossil). *Journal of Morphology* 108: 11-62.
6. Castanet, J. 1981. Nouvelles données sur les lignes cimentantes de l'os. *Archives de Biologie* 92: 1-24.
7. Ricqlès, A.; Meunier, F.J.; Castanet, J. & Francillon-Vieillot, H. 1991. Comparative microstructures of bone: 1-78. *Err: Hall B.K., (ed.). Volume 3 Bone Matrix and Bone Specific Products*. CRC Press, Boca Raton, FL.
8. Leclair, M.H.; Leclair Jr., R. & Gallant, J. 2005. Application of skeletochronology to a population of *Pelobates cultripes* (Anura: Pelobatidae) from Portugal. *Journal of Herpetology* 39: 199-207.
9. Bruce, R.C. & Castanet, J. 2006. Application of skeletochronology in aging larvae of the salamanders *Gyrinophilus porphyriticus* and *Pseudotriton ruber*. *Journal of Herpetology* 40: 85-90.
10. Cabezas-Cartes, F.; Boretto, J.M. & Ibarguengoytia, N.R. 2015. Age, growth and life-history parameters of an endemic vulnerable lizard from Patagonia, Argentina. *Herpetological Journal* 25: 215-224.
11. Perry, G.; Wallace, M.C.; Perry, D.; Curzer, H. & Muhlberger, P. 2011. Toe clipping of amphibians and reptiles: science, ethics, and the law. *Journal of Herpetology* 45: 547-555.
12. Jofré, G.M.; Reading, C.J. & di Tada, I.E. 2005. Breeding behaviour and reproduction in the Pampa de Achala toad, *Bufo achalensis*. *Amphibia-Reptilia* 26: 451-458.
13. Bionda, C.L.; Kost, S.; Salas, N.E.; Lajmanovich, R.C.; Sinsch, U. & Martino, A.L. 2015. Age structure, growth and longevity in the common toad, *Rhinella arenarum*, from Argentina. *Acta Herpetologica* 10: 55-62.
14. Bionda, C.L.; Babini, S.; Martino, A.L.; Salas, N.E. & Lajmanovich R.C. 2018. Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation* 14: e00398.
15. Marangoni, F. 2012. Ecología y demografía de tres especies sintópicas del género *Melanophryniscus* de los campos del sur de misiones. Seminario. XIII Congreso Argentino de Herpetología. Mar del Plata, Argentina.
16. Marangoni, F.; Schaefer, E.; Cajade, R. & Tejado, M. 2009. Growth-mark formation and chronology of two neotropical anuran species. *Journal of Herpetology* 43: 546-550.
17. Stănescu, F.; Marangoni, F.; Reinko, I. & Cogălniceanu, D. 2016. Life history traits of a Neotropical microhylid (*Dermatonotus muelleri*, Boettger 1885) from the Arid Chaco, Argentina. *The Herpetological Journal* 26: 41-48.
18. Marangoni, F.; Stănescu, F.; Courtis, A.; Piñeiro, J.M.; Ingaramo, M.D.R.; Cajade, R. & Cogălniceanu, D. 2018. Coping with aridity: life history of *Chacophrys pierottii*, a fossorial anuran of Gran Chaco. *South American Journal of Herpetology* 13: 230-237.
19. Marangoni, F.; Barrasso, D.A.; Cajade, R. & Agostini G. 2012. Body size, age and growth pattern of *Physalaemus fernandezae* (Anura: Leiuperidae) of Argentina. *North-Western Journal of Zoology* 8: 63-71.
20. Attademo, M.A.; Bionda, C.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Seib, S.N.; Basso, A. & Junges C.M. 2014. Age, size at sexual maturity, longevity, and reproductive potential of *Leptodactylus latinasus* and *Leptodactylus mystacinus* in a soybean crop and a native forest from mideastern Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 315-317.
21. López, J.A.; Antoniazzi, C.E.; Llanes, R.E. & Ghirardi, R. 2017. Age structure, growth pattern, sexual maturity, and longevity of *Leptodactylus latrans* (Anura: Leptodactylidae) in temperate wetlands. *Amphibia-Reptilia* 38: 371-379.
22. Marangoni, F.; Courtis, A.; Piñeiro, J.M.; Ingaramo, M.D.R.; Cajade, R. & Stănescu, F. 2019. Contrasting life-histories in two syntopic amphibians of the *Leptodactylus fuscus* group (Heyer 1978). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 91: e20180507.
23. Cajade, R.; Marangoni, F. & Gangenova, E. 2013. Age, body size, and growth pattern of *Argenteohyla siemersi pederseni*. *Journal of Natural History* 47: 237-251.
24. Piñeiro, J.M.; Cajade, R.; Courtis, A.; Ingaramo, M.D.R. & Marangoni F. 2018. Chronology of the LAGs formation and body growth in *Argenteohyla siemersi* from northeastern Argentina. *North-Western Journal of Zoology* 2019: e182502
25. Quiroga, L.; Sanabria, E. & Marangoni, F. 2015. Sexual size dimorphism and age in

*Odontophrynus* cf. *barrioi* (Anura: Odontophrynidae) from the Monte Desert, Argentina. *Journal of Herpetology* 49: 627-632.

26. Castanet, J.; Francillon-Vieillot, H.; Meunier, F.J. & de Ricqlès, A. 1993. Bone and individual aging: 245-283. *En: Hall, B.K. (ed.). Bone growth*. CRC Press, Boca Raton.
27. Hemelaar, A.S.M. 1985. An improved method to estimate the number of year rings resorbed in phalanges of *Bufo bufo* (L.) and its application to populations from different latitudes and altitudes. *Amphibia-Reptilia* 6: 323-342.
28. Sinsch, U. 2015. Skeletochronological assessment of demographic life-history traits in amphibians. *Herpetological Journal* 25: 5-13.
29. Sinsch, U.; Marangoni, F.; Leskovar, C. & Tejedo, M. 2010. Proximate mechanisms determining size variability in natterjack toads. *Journal of Zoology* 281: 272-281.
30. Sinsch, U.; Oromi, N. & Sanuy, D. 2007. Growth marks in natterjack toad (*Bufo calamita*) bones: histological correlates of hibernation and aestivation periods. *Herpetological Journal* 17: 129-137.
31. Marangoni, F.; Tejedo, M. & Cogălniceanu, D. 2021. Can age and growth patterns explain the geographical variation in the body size of two toad species? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 93: e20190470. DOI 10.1590/0001-3765202120190470.
32. Smirina, E.M.; Klevezal, G.A. & Berger, L. 1986. Experimental investigation of the annual layer formation in bones of amphibians. *Zoologicheskij Zhurnal* 65: 1526-1534.
33. Caetano, M.H.; Castanet, J. & Francillon, H. 1985. Determination de l'âge de *Triturus marmoratus marmoratus* (Latreille 1800) du Parc National de Peneda GerCs (Portugal) par squelettechronologie. *Amphibia-Reptilia* 6: 117-132.
34. Olgun, K.; Üzümlü, N.; Avci, A. & Miaud, C. 2005. Age, size and growth of the southern crested newt *Triturus karelinii* (Strauch 1870) in a population from Bozdag (Western Turkey). *Amphibia-Reptilia* 26: 223-230.
35. Alcobendas, M. & Castanet, J. 2000. Bone growth plasticity among populations of *Salamandra salamandra*: interactions between internal and external factors. *Herpetologica* 56: 14-26.
36. Schroeder, E.E. & Baskett, T.S. 1968. Age Estimation, growth rates, and population structure in Missouri Bullfrogs. *Copeia* 1968: 583.
37. Donnelly, M. & Guyer, C. 1994. Patterns of reproduction and habitat use in assemblage of Neotropical hylid frogs. *Oecologia* 98: 291-302.
38. Tejedo, M.; Reques, R. & Esteban, M. 1997. Actual and osteochronological estimated age of Natterjack Toads (*Bufo calamita*). *Herpetological Journal* 7: 81-82.
39. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.

### 4.3 ESTUDIOS ANATÓMICOS

**María Laura Ponssa**

*Unidad Ejecutora Lillo (CONICET-FML). San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.*

El estudio de la morfología de los organismos en un contexto evolutivo es anterior a Darwin en el sentido de que la idea de cambio a través del tiempo en animales y plantas se remonta a las antiguas escuelas de filosofía griega, hace más de 2.500 años<sup>(1,2)</sup>. De la observación de la morfología de los organismos surgen preguntas y su estudio permite la interpretación de los procesos que producen el plan estructural de los organismos<sup>(1)</sup>. En este sentido los anfibios resultan fascinantes por su diversidad de formas o morfologías<sup>(3)</sup>.

En estudios filogenéticos y taxonómicos, la utilidad de la morfología es manifiesta para la delimitación de caracteres. A pesar del auge de las filogenias moleculares en anfibios<sup>(4-8)</sup>, debido a la revolución tecnológica de secuenciación de ADN a finales del siglo pasado, el estudio de caracteres morfológicos sigue siendo fundamental para la definición, delimitación y descripción de especies, debido en parte a que su observación es más directa y operacional<sup>(9)</sup>. La morfología se ocupa centralmente de las propiedades emergentes de los organismos, las cuales los hacen mucho más que moléculas reducidas de sus partes<sup>(1)</sup>. A pesar de haber sido conceptuada como no innovativa o “pasada de moda”, en los últimos años el rol de la morfología ha sido redimensionado, no como una disciplina que brinda asistencia a otras, sino con un rol central, desarrollado en diferentes áreas de investigación como biología del desarrollo y la biología evolutiva (Evo-Devo), biomecánica, ecomorfología, morfología funcional, paleobiología<sup>(10,3)</sup>. Es una de las pocas ciencias modernas que complementan el estudio de forma, función y evolución, aportando un enfoque holístico<sup>(1)</sup> e integrando organísmica, desarrollo y genética, contribuyendo de este modo a nuestra comprensión de patrones y procesos biológicos<sup>(3)</sup>.

El desarrollo de estas disciplinas morfológicas va acompañado con la aplicación de nuevas técnicas (e.g. microtomografía computarizada que permite el procesamiento digital de imágenes, particularmente útil para especies escasas en colecciones, ya que es una técnica no invasiva) y herramientas metodológicas (e.g. métodos comparados) que permiten observaciones a diferentes niveles de organización y análisis rigurosos de los datos, respectivamente.

Hay consideraciones para la colecta de material para estudios morfológicos que son comunes a cualquier monitoreo. Al momento de planificar un viaje de colecta es fundamental tener en cuenta los objetivos de nuestro estudio. Según estos objetivos, será la selección de especies a colectar y las localidades. Para definir las localidades son útiles los registros de publicaciones y base de datos de colecciones donde fueron anteriormente colectadas las especies. Una vez definido estos puntos se debe solicitar los permisos de colecta teniendo en cuenta el tiempo que puede llevar este trámite, lo cual puede variar según las provincias donde se necesite realizarlos. Según los hábitos

o biología de las especies seleccionadas y las características del terreno se planificará la mejor época para la colecta. Por ejemplo, hay que considerar cuándo está presente la especie de acuerdo a sus hábitos reproductivos. También si el lugar es accesible en los meses de actividad de la especie; por ejemplo, algunas localidades de *Telmatobius ceiorum* (o alguna otra especie que vive en zonas de alta montaña) pueden resultar inaccesibles en épocas de lluvia debido a las crecientes de los ríos de montaña. En este sentido es muy útil, antes del viaje, contactar con personas locales, cuyo conocimiento del terreno facilita la planificación de la logística. En el caso de colecta de anuros adultos, que se hace principalmente durante la noche, es importante el contacto con la gente del lugar previamente a las salidas, porque la presencia de personas circulando de noche y con linternas puede resultar hostil. Adicionalmente es muy común que los sitios de reproducción sean estanques o bebederos de ganados que están dentro de puestos o fincas privadas. Por esto un reconocimiento previo del terreno y pedido de autorización es imprescindible en muchos casos.

Antes de salir de colecta, es recomendable identificar, durante el día, cuerpos de agua que puedan ser sitios de reproducción. La colecta en sí es muy sencilla, durante la noche se identifican los sitios escuchando el canto de los anuros, la captura es manual, se colocan los ejemplares en bolsas plásticas. Hay ambientes, e.g. Chaco Seco, donde después de una lluvia puede ocurrir una “explosión” de especies y ejemplares reproduciéndose en un mismo charco. En estos casos hay que tener cuidado de no colocar ejemplares de gran tamaño con otros muy pequeños, que puedan aplastarlos. También hay que tener en cuenta que la toxicidad de las secreciones de la piel de algunas especies, e.g., *Leptodactylus macrosternum*, puede matar a otras especies. En síntesis, hay que tener el cuidado de que los ejemplares que se coloquen por bolsa estén con aire y espacio suficiente para mantenerse vivos.

Los estudios ecomorfológicos y biomecánicos complementan los datos morfológicos con datos ecológicos, por ejemplo, de microhábitats y/o modos locomotores (ejemplos en anfibios anuros:<sup>11-16</sup>). Por eso es necesario registrar este tipo de datos, siendo la manera óptima organizarlos en planillas. Sin embargo, en muchos casos investigadores que están colectando con otros fines (por ejemplo, para un estudio biogeográfico), pueden no contar con estas planillas, lógicamente ya que no son su objetivo de estudio ni colecta. Aún así, es recomendable que estos datos se registren en los cuadernos de campo, y puedan depositarse en las colecciones. Por ejemplo, el registro de donde se encontraban los especímenes (agua, vegetación, tierra, etc.), actividad (amplexo, canto, etc.). Este tipo de datos es inexistente para muchas especies, y la observación directa del biólogo de campo es la fuente más valiosa para reca-

bar esta información. Este tipo de planillas deben confeccionarse teniendo en cuenta los objetivos del estudio, pero deben ser flexibles para registrar todo tipo de datos que surgen en el campo y pueden ser útiles para interpretar los análisis morfológicos posteriores. A modo de ejemplo o sugerencias estos son algunos ítems que pueden tenerse en cuenta en las planillas:

**Microhabitat:** arbóreo (altura, características de la percha); terrestre (sobre tierra u hojarasca, en cuevas); acuático (charcos, lagunas, remansos, agua corriente, sumergido, superficie).

**Sitio de amplexo, sitio de puestas, sitio de canto** (teniendo en cuenta los microhábitats señalados anteriormente).

**Actividad locomotora observada:** salto largo, salto corto, natación, caminador, excavación, trepadores.

**Breve descripción de movimientos de otras actividades,** por ejemplo, alimentación, acicalamiento.

Estos registros son complementados con videos y fotografías. Para estudios biomecánicos, las filmaciones se realizan en laboratorio, con los protocolos y diseños experimentales correspondientes (e.g.<sup>17-19</sup>). Sin embargo, el registro en el campo complementa esta información, y para esto es suficiente con un video captado desde un celular o cámara fotográfica común. Para estudios taxonómicos los datos tomados en el campo también son de utilidad, ya que los rasgos biológicos pueden ser utilizados para definir especies (e.g., *Leptodactylus aepipyta*<sup>20</sup>). Otro carácter utilizado para estudios taxonómicos es la coloración en vida, que debe registrarse antes de la fijación del ejemplar (e.g.<sup>20</sup>).

Debido al auge de los estudios moleculares, es una práctica común de la colecta de material tomar compulsivamente muestras de tejido (fragmento de hígado o músculo), para secuenciación de ADN. Si los ejemplares son colectados para estudios anatómicos no debe tomarse estas muestras de los órganos a estudiar, ya que justamente el material estará estropeado para los estudios morfológicos.

Si los ejemplares son juveniles, es decir entre metamórficos y adultos, es recomendable identificarlos como tales. Normalmente en las colecciones se identifican las larvas y los adultos, y los ejemplares juveniles quedan inmersos en los lotes de adultos. Sin embargo, aunque normalmente son considerados una réplica a escala de los adultos, se diferencian en variados caracteres del estadio adulto, y estos estadios de desarrollo son objeto de estudio *per se*<sup>(21, 22)</sup>.

Los ejemplares colectados son eutanizados con lidocaína o benzocaína, que puede venir en forma líquida o gel. Para la fijación de los ejemplares nor-



malmente se utiliza formol 4 - 10%, ya que es un buen fijador de órganos y tejidos. Se fijan durante 24 hs o toda la noche. Esta fijación se emplea para técnicas anatómicas tradicionales, para tinción con anticuerpos convencional, para microtomografía computarizada. Pero algunas técnicas pueden requerir del uso de otros fijadores, esto debe tenerse en cuenta con antelación, y al campo debe llevarse los fijadores preparados. Por ejemplo, para histología las muestras son fijadas con formol bufferado (Formol 10 % en buffer fosfato, 0, 2 M a pH 7); para microscopía electrónica de transmisión en una solución buffer fosfato o tampón 0,1 mol L<sup>-1</sup> con gluteraldehído 2,5% y para formaldehído 4%.

Si los ejemplares colectados serán utilizados para realizar experimentos en laboratorio deben ser trasladados en condiciones adecuadas para que no lleguen estresados, en recipientes donde se conserven oxigenados y con temperaturas óptimas (que puede variar según la procedencia y biología de las especies). En estos casos se recomienda, de ser posible, que los sitios de colecta sean cercanos al laboratorio.

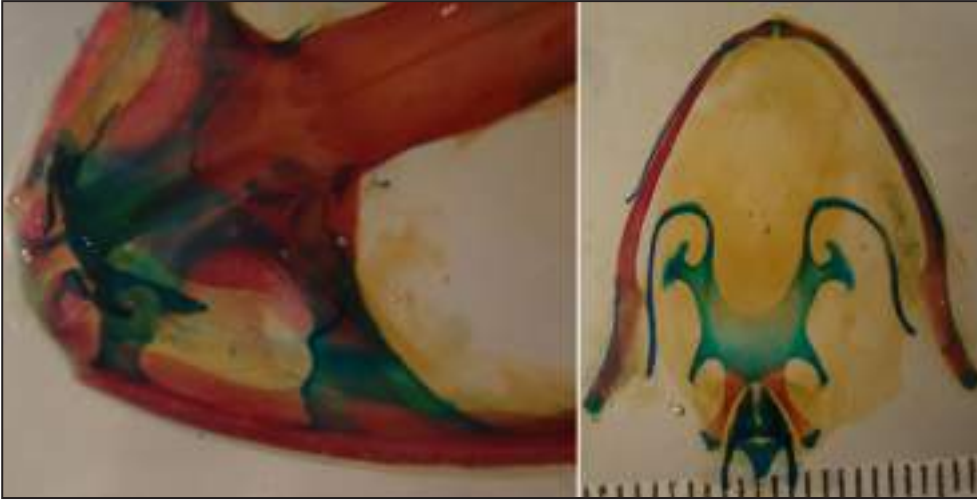
Las técnicas para el procesamiento de los ejemplares dependen del sistema de órganos específico que se desee estudiar. A modo de ejemplo, para el estudio del sistema nervioso, se utiliza Sudan Black B para teñir los nervios (ver técnica completa en<sup>23; 24</sup>), una recomendación es que la solución preparada esté madura o estacionada. Uno de los sistemas más comúnmente estudiados es el sistema esquelético. Los huesos han resultado ser una fuente útil de caracteres para filogenias (e.g.<sup>25-29</sup>), morfología funcional (e.g.<sup>14, 30</sup>), desarrollo (e.g.<sup>31-34</sup>), y son la principal fuente de comparación con los fósiles (e.g.<sup>35-37</sup>). Para el estudio de esqueletos secos, generalmente empleado en especímenes de gran tamaño, se emplean técnicas para “esqueletos secos” (**Figura 4.3.1**). Para material fresco (que no haya sido fijado), un método es utilizar larvas de derméstidos (coleópteros); los ejemplares se colocan en el dermestario y puede ser untado con manteca para hacerlo más apetecible para los insectos. Otra técnica rápida consiste en lavados sucesivos con Hipoclorito de Sodio, alternados con lavados en agua corriente y controlando cada vez la limpieza parcial de los huesos<sup>(38)</sup>. La concentración de lavandina debe ser controlada, teniendo en cuenta que, a mayor concentración, menor tiempo de inmersión de los especímenes. Una alternativa es ir pelando los ejemplares con bisturí y tijeras, y alternando con lavados con lavandina. Lo más práctico puede resultar combinar ambas técnicas: comenzar con los derméstidos y terminar con lavados de lavandina o agua oxigenada para limpiar detalles, como orificios o articulaciones. La desventaja de este procedimiento es que se pierden la información de las estructuras cartilagosas.



**Figura 4.3.1.** Preparado de esqueleto seco, cráneo en vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de *Leptodactylus savagei* (USNM 297785). Foto: M. L. Ponsa.

Para el estudio de huesos y cartílagos se utiliza la técnica de tinción diferencial para hueso y cartílago, con Alizarina Roja y Alcian Blue, respectivamente, y posterior diafanización de los músculos (ver la técnica completa en<sup>39-44</sup>), y conservación en glicerina (por esto se llaman “preparaciones húmedas”) (**Figura 4.3.2**). Esta técnica es más apropiada para especies pequeñas. Para esta técnica, como para cualquiera que implique retirar las vísceras, hay que tener cuidado en no cortar o estropear el esternón cartilaginoso ventral al hacer la disección. Originalmente se proponía transparentar el tejido blando con tripsina (enzima que digiere proteínas)<sup>(45,46)</sup>. La receta más ampliamente usada en anfibios en los laboratorios de nuestro país es la de Wassersug<sup>(40)</sup>, para animales fijados con formol 10% y empleando para la diafanización de los músculos hidróxido de potasio (KOH), el cual es relativamente accesible en precio y disponibilidad. Si se reemplaza el KOH por tripsina, se pueden lograr resultados óptimos: los músculos quedan más transparentes (no amarillentos como con el KOH) y los ejemplares más turgentes (con el KOH pueden quedar más flácidos). Lamentablemente la tripsina es muy costosa y no se consigue fácilmente en Argentina. Para el estudio de músculos y tendones, se emplea la misma técnica, pero sin el paso por el KOH para evitar la transparentación. Los músculos también pueden estudiarse mediante observación directa, tiñéndolos temporalmente con pinceladas de azul de metileno.

Como fue mencionado, una alternativa para ejemplares que no puedan prepararse con técnicas invasivas es la Micro Tomografía Computarizada (Micro-CT) es un método de análisis por rayos X donde se representa la imagen interna y externa de un objeto en 3D. Es el mismo método usado en medicina con los escáneres CT, pero a una escala mucho más pequeña y con una resolución mucho más alta, realmente lo que se llega a representar es una imagen microscópica en 3D. Una alternativa sino se dispone de los recursos para obtener estas imágenes, es realizar radiografías convencionales, para las cua-



**Figura 4.3.2.** Preparado de esqueleto con tinción diferencial para hueso y cartílago y posterior diafanización. Cráneo con detalle de cartílagos nasales (izquierda), mandíbula inferior, hioides y cartílagos cricoides y aritenoides (derecha) de *Leptodactylus macrosternum* (FML 12097). Foto: M. L. Ponssa.

les son útiles los equipos de odontólogos (por el tamaño de las muestras) (**Figura 4.3.3**). La desventaja es que se pierden muchos detalles, pero pueden complementarse con transparencias.



**Figura 4.3.3.** Radiografía de *Scythrophrys sawayae* (USNM 137658). Foto: M. L. Ponssa.

## Bibliografía

1. Kardong, K.V.K. 2009. Vertebrates. Comparative Anatomy, Function, Evolution. 6th edition.
2. Alghamdi, M.A.; Ziermann, J.M. & Diogo, R. 2017. An untold story: the important contributions of muslims scholars for the understanding of human anatomy. *The Anatomical Record* 300: 986-1008.
3. Wake, M.H. 2012. Morphology and herpetology: how and why they interact. *Journal of Herpetology* 46: 279-296.
4. Vences, M.; Kosuch, J.; Lötters, S.; Widmer, A.; Jungfer, K.H.; Köhler, J. & Veith, M. 2000. Phylogeny and classification of poison frogs (Amphibia: Dendrobatidae), based on mitochondrial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 34-40.
5. Faivovich, J.; Haddad, C.F.; Garcia, P.C.; Frost, D.R.; Campbell, J.A. & Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 294: 1-240.
6. Grant, T.; Frost, D.R.; Caldwell, J.P.; Gagliardo, R.; Haddad, C.F.; Kok, P.J.; Means, D.B.; Noonan, B.P.; Schargel, W.E. & Wheeler, W.C. 2006. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 299: 1-262.
7. Hedges, S.B.; Duellman, W.E. & Heinicke, M.P. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa* 1737: 1-182.
8. Pyron, R.A. & Wiens, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 543-583.
9. Wiens, J.J. 2004. What is speciation and how should we study it? *The American Naturalist* 163: 914-923.
10. Quinzio, S.I.; Goldberg, J.; Cruz, J.C.; Chuliver Pereyra, M. & Fabrezi, M. 2015. La morfología de los Anuros: pasado, presente y futuro de nuestras investigaciones. *Cuadernos de Herpetología* 29: 51-67.
11. Soliz, M. & Ponssa, M.L. 2017. Development and morphological variation of the axial and apendicular skeleton in Hylidae (Lissamphibia, Anura). *Journal of Morphology* 277: 786-813.
12. Fratani, J.; Ponssa, M.L. & Abdala, V. 2018. Evolution of tendon shape in an anuran clade and its relation to size, phylogeny and locomotion. *Journal of Zoology* 307: 233-241.
13. Fratani, J.; Ponssa, M.L. & Abdala, V. 2018. Tendinous framework of anurans reveals and all-purpose morphology. *Zoology* 126: 172-184.
14. Ponssa, M.L.; Fratani, J. & Abdala, V. 2018. Phylogenetic patterns and correlation of key structures for jumping: bone crests and cross-sectional areas of muscles in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Anatomy* 232: 870-885.
15. Abdala, V.; Ponssa, M.L.; Tulli, M.J.; Fabre, A.C. & Herrel, A. 2018. Frog structure and its relationship with locomotor modes. *Journal of Morphology* 279: 895-903.
16. Fratani, J.; Ponssa, M.L.; Rada, M. & Abdala, V. 2020. The influence of locomotion and habitat use on tendo-muscular units of an anuran clade (Anura, Diphyabatrachia). *Zoologischer Anzeiger* 284: 66-77.
17. Azizi, E.; Larson, N.P.; Abbot, E.M. & Danos, N. 2014. Reduce torques and stick the landing: limb posture during landing in toads. *Journal of Experimental Biology* 2017: 3742-3747.
18. Nauwelaerts, S.; Stamhuis, E. & Aerts, P. 2005. Swimming and jumping in a semi-aquatic frog. *Animal Biology* 55: 3-15.
19. Nauwelaerts, S. & Aerts, P. 2006. Take-off and landing forces in jumping frogs. *The Journal of Experimental Biology* 209: 66-77.
20. Schneideri, R.G.; Cardozo, D.E.; Brusquetti, F.; Kolenc, F.; Borteiro, C.; Haddad, C.; Basso, N.G. & Baldo, D. 2020. A new frog of the *Leptodactylus fuscus* species group (Anura: Leptodactylidae), endemic from the South American Gran Chaco. *PeerJ* e7869.
21. Vera, M.C. & Ponssa, M.L. 2014. Skeletogenesis in anurans: cranial and postcranial

- development in metamorphic and postmetamorphic stages of *Leptodactylus bufonius* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 95: 44-62.
22. Vera, M.C.; Abdala, V.; Barrionuevo, J.S. & Ponssa, M.L. 2019. Ultraestructura y ontogenia de un tendón digital en tres especies de anuros. *Cuadernos de Herpetología* 33: 51-58.
  23. Filipinski, G.T. & Wilson, M.V.H. 1984. Nerve staining using sudan black B and its potential use in comparative anatomy: 33-36. *En: Waddington, J. & Rudkin, D.M. (eds.). Proceedings of the 1985 Workshop on Care and Maintenance of Natural History Collections.*
  24. Nishikawa, K.C. 1987. Staining amphibian peripheral nerves with sudan black B: progressive vs regressive methods. *Copeia* 1987: 489-491.
  25. Morrison, M.E. 1994. A phylogenetic analysis of the *Bufo spinulosus* group (Anura: Bufonidae). PhD Thesis, Department of Systematics and Ecology and the Faculty of the Graduate School of the University of Kansas.
  26. Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics* 18: 367-393.
  27. Pramuk, J.B. 2006. Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* 146: 407-452.
  28. Ponssa, M.L. 2008. Cladistic analysis and osteological descriptions of the frog species in the *Leptodactylus fuscus* species group (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Zoological Systematic and Evolutionary Research* 46: 249-266.
  29. González Durán, G.A.; Targino, M.; Rada, M. & Grant, T. 2017. Phylogenetic relationships and morphology of the *Pristimantis leptolophus* species group (Amphibia: Anura: Brachycephaloidea), with the recognition of a new species group in *Pristimantis* Jiménez de la Espada, 1870. *Zootaxa* 4243: 42-74.
  30. Jorgensen, M.E. & Reilly, S.M. 2013. Phylogenetic patterns of skeletal morphometrics and pelvic traits in relation to locomotor mode in frogs. *Journal of Evolutionary Biology*.
  31. Havelková, P.; Roček, Z. 2006. Transformation of the pectoral girdle in the evolutionary origin of frogs: insights from the primitive anuran *Discoglossus*. *Journal of Anatomy* 209: 1-11.
  32. Pitsillides, A.A. & Ashhurst, D.E. 2008. A critical evaluation of specific aspects of joint development. *Developmental Dynamics* 237: 2284-2294
  33. Manzano, A.S.; Abdala, V.; Ponssa, M.L. & Soliz, M. 2013. Ontogeny and tissue differentiation of the pelvic girdle and hind limbs of anurans. *Acta Zoologica (Stockholm)* 94: 420-436.
  34. Barrionuevo, J.S. 2018. Growth and cranial development in the Andean frogs of the genus *Telmatobius* (Anura: Telmatobiidae): Exploring the relation of heterochrony and skeletal diversity. *Journal of Morphology*, 279: 1269-1281.
  35. Herrel, A.; Moureaux, C.; Laurin, M.; Daghfous, G.; Crandell, K.; Tolley, K.A.; Measey, J.; Vanhooydonck, B. & Boistel, R. 2016. Frog origins: inferences based on ancestral reconstructions of locomotor performance and anatomy. *Fossil Imprint* 72: 108-116.
  36. Lires, A.I.; Soto, I.M. & Gómez, R.O. 2016. Walk before you jump: new insights on early frog locomotion from the oldest known salientian. *Paleobiology* 42: 612-623.
  37. Nyakatura, J.A.; Melo, K.; Horvat, T.; Karakasiliotis, K.; Allen, V.R.; Andikfar, A.; Andrada, E.; Arnold, P.; Lauströer, J.; Hutchinson, J.R.; Fischer, M.S. & Ijspeert, A.J. 2019. Reverse-engineering the locomotion of a stem amniote. *Nature*: 351-355.
  38. Sanders, O. 1953. A rapid method for preparing skeletons from preserved Salientia. *Herpetologica* 9: 48.
  39. Simons, E.V. & Van Horn, J.R. 1971. A new procedure for whole mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. *Acta Morphol Neerland Scandinavia* 85: 281-292.
  40. Wassersug, R.J. 1976. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin fixed vertebrates. *Stain Technology* 51: 131-134.
  41. Dingerkus, G. & Uhler, L.D. 1977. Enzyme clearing of alcian blue staining whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology* 52: 229-232.
  42. Hanken, J. & Wassersug, R.J. 1981. The visible skeleton. *Functional Photography* 16: 22-26.
  43. Alberch, P. 1985. Museum collection and the evolutionary study of growth and development: 29-41. *En: Miller, E.H. (ed.). Museum collections: their roles and future in biological research. British Columbia Provincial Museum, Occasional Paper* 25: 1-222.
  44. Taylor, W.R. & Van Dyke, G.C. 1985. Revised procedures for staining and clearing small

fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 2: 107-119.

45. Taylor, W.R. 1967. An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. *Proceedings U.S. National Museum* 122: 1-17.
46. Taylor, W.R. 1967. Outline of a method of clearing tissues with pancreatic enzymes and staining bones of small vertebrates. *Turtox News* 45: 308-309.

## 4.4 ESTUDIOS BIOACÚSTICOS

**Pablo Grenat<sup>1,2,4</sup>, Evelina J. León<sup>3,4</sup>, Paola M. Peltzer<sup>3,4</sup>, Víctor H. Zaracho<sup>5</sup>, Eduardo F. Schaefer<sup>6</sup> & Rafael C. Lajmanovich<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup> *Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional N° 36 - km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Argentina.*

<sup>2</sup> *Instituto de Ciencias de la Tierra, Biodiversidad y Sustentabilidad Ambiental (ICBIA), UNRC-CONICET, Argentina.*

<sup>3</sup> *Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.*

<sup>4</sup> *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.*

<sup>5</sup> *Laboratorio de Herpetología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste., Argentina.*

<sup>6</sup> *Instituto de Investigaciones Geohistóricas - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IIGHI, CONICET- UNNE). Av. Castelli 930 (H3504AAO) Resistencia - Chaco - Argentina.*

El conocimiento básico sobre las características de las especies, como los involucrados en el comportamiento, la ecología o la distribución, son un elemento clave para ayudar a múltiples disciplinas en la investigación científica<sup>(1)</sup>. Es así que las pruebas de hipótesis, el diseño experimental, los estudios de observación o el modelado en distintas ramas de la biología se basan fuertemente en la información de la historia natural de cada especie<sup>(2,3)</sup>.

Las señales acústicas tienen una gran utilidad taxonómica en varios grupos de animales<sup>(4,5,6)</sup> y son fundamentales en la comunicación de individuos de la misma especie. La forma de las señales de la comunicación acústica depende de varios factores relacionados con la información que transmitan, por ejemplo: con las características del emisor, del receptor y del ambiente<sup>(7,8,9)</sup>, como también de procesos biológicos y sociobiológicos<sup>(10)</sup>. Por otra parte, el estudio de la comunicación vocal en anuros ha servido durante mucho tiempo como un parámetro modelo para comprender la evolución de los sistemas sensoriales y los mecanismos subyacentes<sup>(11)</sup>.

Diversas características del canto de los anuros pueden influir en la selección sexual, entre ellas la intensidad, la tasa de emisión, la duración, el tono y los patrones temporales de interacción entre machos. Adicionalmente, toda la maquinaria morfológica (por ejemplo, sacos vocales, **Figura 4.4.1**), fisiológica y bioquímica involucrada en la producción de sonidos, se moldea por selección sexual.

En el campo de la bioacústica existe diversidad de estudios relacionados con el comportamiento vocal de los anuros<sup>(12-20)</sup> con la ecología<sup>(21,22)</sup>, la evolución<sup>(23-27)</sup>, y con aspectos fisiológicos<sup>(28-31)</sup>. La aplicación de análisis bioacústicos comparativos a nivel mundial, ha resultado en el descubrimiento de muchas especies de anuros morfológicamente crípticas durante el último tercio del siglo XX y en consecuencia, en un aumento del número de especies<sup>(32-34)</sup>.

Adicionalmente, los estudios bioacústicos permiten determinar el movimiento de los individuos, la identificación automática de especies sin necesidad de verlas directamente, la estimación de la actividad reproductiva diaria, estacional y anual, como también permiten realizar una evaluación rápida de la diversidad de anfibios de un determinado lugar. Esto último, de realizarse a largo plazo, permite, sin necesidad de coleccionar especímenes, o reduciendo al mínimo las colectas, analizar fluctuaciones en la diversidad de especies a lo largo del tiempo, generando bases de datos bioacústicos de vital importancia al momento de analizar cambios asociados, por ejemplo, a modificaciones antrópicas u otras que puedan reducir y eventualmente incrementar la riqueza y diversidad de especies en un determinado sitio. Asimismo, las comparaciones de los cantos de advertencia inter e intraespe-





**Figura 4.4.1.** Sacos vocales dobles involucrados en la vocalización de *Trachycephalus typhoni*. Foto: P. Peltzer.

cíficos también han sido utilizados para analizar la influencia de la variación geográfica (dialectos), y el establecimiento de patrones filogenéticos<sup>(26)</sup>.

Debido a que el costo energético de emitir señales vocales en muchas especies es bastante alto, la selección debe favorecer los mecanismos para aumentar la eficiencia de la producción y transmisión del sonido, permitiéndole de esta manera a los individuos mantener las reservas energéticas mientras se maximiza la emisión de señales acústicas<sup>(11)</sup>.

El alto costo energético de la emisión del canto probablemente explique la existencia de coros relativamente cortos de muchos machos<sup>(35)</sup>, que ejercen fuertes presiones selectivas sobre sus competidores y permiten atraer, en un lapso corto de tiempo a las hembras, estrategia denominada fonotaxia. Sin embargo, en algunas especies de anfibios el costo energético de cantar por la noche es menor, por lo que pueden extender el período de vocalizaciones corales durante varios meses<sup>(36,37)</sup> incrementando así las probabilidades de éxito en el apareamiento. Los cantos pueden variar sustancialmente en amplitud, duración y estructura de frecuencia, lo que afecta la distancia que recorre el sonido en el entorno y la facilidad con la que el receptor puede localizar la posición del emisor<sup>(38,39)</sup>.

Las especies de anuros se caracterizan por emitir señales con una estructura acústica básica cuya variabilidad depende de numerosos factores, por lo que es probable que diferentes condiciones ambientales interfieran en ciertas propiedades estructurales del canto de manera constante<sup>(40-43)</sup>. Además, las propiedades del canto de los anuros están influenciadas por factores ambientales como el fotoperíodo, la humedad relativa y la temperatura del ambiente<sup>(44-47)</sup>; por esto, es sumamente importante que al realizar análisis bioacústicos se consideren y exploren cuali y cuantitativamente los posibles efectos del mayor número posible de variables ambientales, especialmente la temperatura, la humedad, la presión atmosférica, el fotoperíodo, la intensidad del viento y las precipitaciones, la densidad de la vegetación circundante, el tipo de sustrato, entre otros, sobre las diferentes variables acústicas.

## Clasificación de las vocalizaciones en Anuros

**Estructura.** Los sonidos emitidos por los anuros pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura temporal, espectral (frecuencias) y al número y complejidad de los elementos que lo componen, a partir del uso de herramientas de análisis tales como oscilogramas y espectrogramas (ver **Caja 4.4.1** y **Figura 4.4.2**). Siguiendo la terminología de la revisión realizada por Köhler y colaboradores<sup>(48)</sup>, la clasificación de las vocalizaciones de acuerdo a su estructura se resume en aquellas que se componen de:

**Notas pulsadas:** compuesta por una repetición de pulsos bien definidos, a menudo con un espaciado, intensidad y frecuencia regulares. También denominada tren de pulsos (**Figura 4.4.2A**).

**Notas no pulsadas:** Dentro de esta categoría se incluyen los sonidos tonales y los pulsátiles: *a) Tonales:* contienen un único componente de frecuencia en cualquier instante de tiempo, aunque la frecuencia o la amplitud puedan variar a través del tiempo por modulación. Las vocalizaciones de este tipo se escuchan como silbidos, o como “clics” si las notas son muy cortas. La mayoría de los anuros con cantos tonales presentan armónicos, que son componentes de frecuencia de la señal que se caracterizan por ser múltiplos enteros de la frecuencia fundamental (ver **Caja 4.4.1**; **Figura 4.4.2B**); *b) Pulsátiles:* presentan una rápida modulación de amplitud alternante, pero, generalmente, sin picos de energía discretos que puedan reconocerse inequívocamente como pulsos. No es posible hacer un recuento claro de los pulsos (**Figura 4.4.2C**).

### Caja 4.4.1 - Terminología básica utilizada en bioacústica de anuros

**Notas:** Unidades de sonido temporalmente discretas, separadas por intervalos cortos de tiempo, en relación a la longitud total del canto. Los cantos pueden estar conformados por una única nota o por varias notas (multinota).

**Pulso:** Físicamente, es definido como un tren de ondas simple, producido por una única liberación o impulso de energía, separado en el tiempo de otros pulsos por una significativa reducción de la amplitud. Por las características intrínsecas de las vocalizaciones de los anuros, esta reducción de amplitud entre pulsos raramente se traduce en silencios totales.

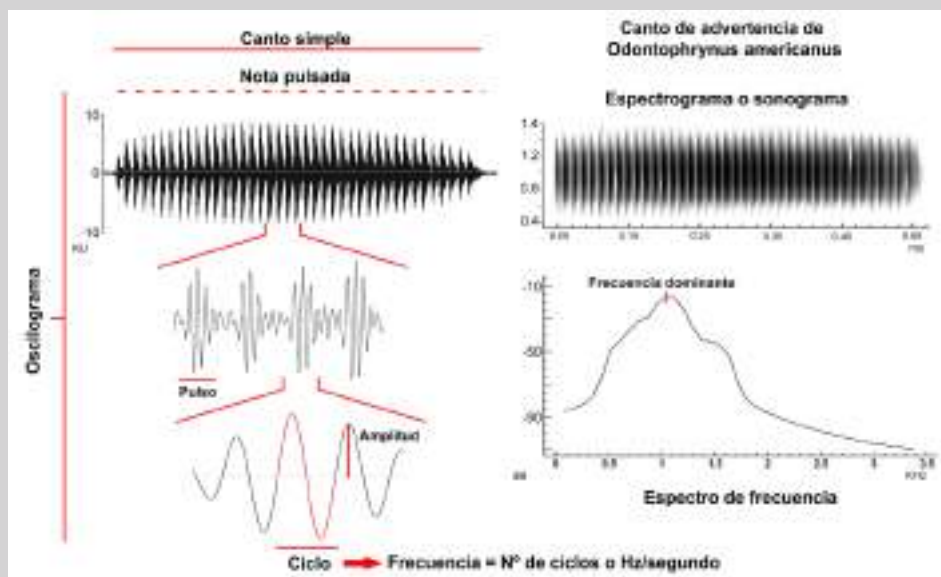
**Frecuencia:** Número de ciclos de oscilación de las ondas sonoras por unidad de tiempo. La unidad utilizada para la medición de los ciclos por segundo es el Hertz o Hercio (Hz) o kiloHertz (kHz; equivalente a 1000 Hz). El sonido audible está definido en relación a la percepción humana entre los 20 y los 20000 Hz. Por debajo de este umbral se denomina infrasonido y por encima ultrasonido.

**Amplitud:** Diferencia entre la presión máxima (pico de la onda sonora) y la presión ambiental. Proporcional a la intensidad del sonido.

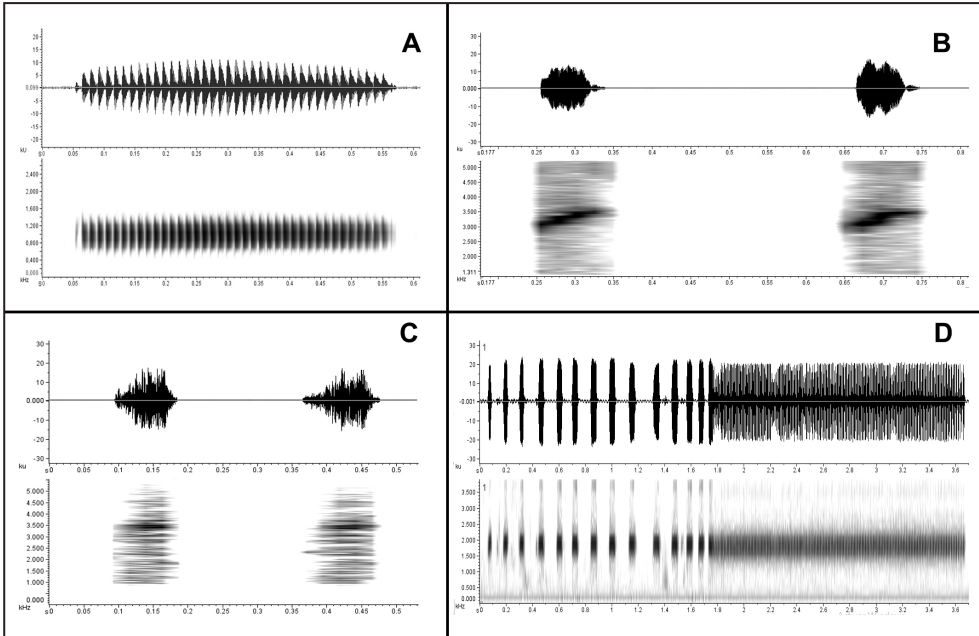
**Oscilograma:** Representación visual de un sonido, que muestra los cambios en la amplitud a lo largo del tiempo.

**Espectrograma:** Representación visual de un sonido, mostrando la frecuencia y la amplitud del sonido a lo largo del tiempo. También denominado como audiospectrograma o sonograma.

**Espectro de frecuencia (power spectrum):** Representación visual de un sonido, mostrando la amplitud relativa de cada componente de frecuencia. La frecuencia basal del canto es denominada frecuencia fundamental. A menudo se corresponde también con la frecuencia dominante (frecuencia con mayor concentración de energía en el espectro), aunque muchas veces el pico de mayor intensidad puede darse en algunos de los armónicos del canto (múltiplos de la frecuencia fundamental).



Definiciones siguiendo a Toledo et al.<sup>(52)</sup> y Köhler et al.<sup>(48)</sup>. Imagen extraída de Steinmann y Grenat. COMPORTAMIENTO ANIMAL REPRODUCTIVO: un enfoque evolutivo<sup>(53)</sup>



**Figura 4.4.2.** Tipos de vocalizaciones en anuros según su estructura temporal y espectral. Oscilograma y espectrograma de: (A) canto simple pulsado de *Odontophrynus americanus*; (B) serie de dos cantos simples tonales de *Leptodactylus latinasus*; (C) serie de dos cantos simples pulsátiles de *Scinax nasicus*; (D) canto compuesto o complejo de *Melanophryniscus stelzneri*, con series de notas tonales en la primer mitad del canto y un tren de pulsos en la segunda mitad. Imagen extraída y modificada de Steinmann y Grenat<sup>(53)</sup>.

De acuerdo al número y complejidad de los elementos que componen el canto, se reconocen:

**Cantos simples:** formados por un único elemento o nota, o por un grupo de notas de estructura similar (Figura 4.4.2A-C).

**Cantos compuestos o complejos:** presentan más de una nota, que difieren en cuanto a su estructura temporal y/o espectral (Figura 4.4.2D).

**Función.** Los anuros pueden generar distintos sonidos según el contexto en el que se encuentren. En general, las vocalizaciones de los anuros transmiten información sobre: ubicación; tamaño corporal del individuo; identidad individual; estado reproductivo individual (receptivo: cantos de apareamiento o cortejo, no receptivo: canto de liberación); motivación agresiva o interacciones depredador-presa<sup>(18,49-51)</sup>. Toledo y colaboradores<sup>(52)</sup> relevaron la información disponible sobre los tipos de canto reconocidos, basados en su significancia biológica, y los subdividieron en tres categorías de acuerdo al contexto social en el cual fueron observados: reproductivos, agresivos y defensivos (Tabla 4.4.1). Mientras que los cantos agresivos suelen estar siempre asociados a eventos reproductivos, los cantos defensivos son adaptaciones para prevenir la depredación<sup>(52)</sup>. Köhler y colaboradores<sup>(48)</sup> sugieren además una nueva categoría, los cantos de alimentación (feeding call) que refieren a los sonidos emitidos por los renacuajos y juveniles de algunas especies en ese contexto.

Tipo	Nombre	Contexto
Reproductivos (cantos)	<b>Advertencia o apareamiento</b> ( <i>Advertisement call</i> )	Durante la temporada de apareamiento. Atracción de pareja y segregación de otros machos competidores. Transmiten información sobre la identidad específica, la receptividad sexual, la posición, el tamaño y, en algunos casos, la identidad individual de los machos en un coro. Puede actuar en la orientación de ambos sexos hacia los sitios de reproducción, en la formación de agregaciones reproductivas, y en la discriminación de sexos. Actúa como un importante mecanismo de aislamiento pre-reproductivo entre especies, resultando un elemento de alto valor taxonómico. Es el tipo de vocalización más comúnmente estudiada.
	<b>Cortejo</b> ( <i>Courtship call</i> )	Comunicación entre machos y hembras a corta distancia, previo al amplexo. Podría estimular y orientar a las hembras.
	<b>Amplexo</b> ( <i>Amplectant call</i> )	Durante el amplexo, podría estimular la liberación de huevos.
	<b>Liberación</b> ( <i>Release call</i> )	Cuando un individuo no receptivo es amplexado. Comúnmente se produce entre dos machos. A menudo acompañado por una vibración corporal. Tiene valor taxonómico.
	<b>Liberación post-ovoposición</b>	Emitido por el macho, durante el amplexo, después de la oviposición y antes de la liberación de la hembra.
Agresivos (cantos)	<b>Lluvia</b> ( <i>Rain call</i> )	Provocados por cambios climáticos, en condiciones de alta humedad ambiente, incluso fuera del período reproductivo (ej. durante el día, para especies nocturnas). Función desconocida.
	<b>Territorial</b> ( <i>Territorial call</i> )	Defensa de un territorio sobre machos co- o heteroespecíficos (principalmente en especies territoriales).
	<b>Encuentro</b> ( <i>Encounter call</i> )	Encuentro a corta distancia entre por lo menos dos machos.
	<b>Lucha</b> ( <i>Fighting call</i> )	Durante un combate físico entre machos.
	<b>Alarma</b> ( <i>Alarm scream</i> )	Cuando un individuo es sorprendido por un depredador potencial y huye gritando o cuando es presa de un depredador; su objetivo es alarmar a sus congéneres sobre la presencia de un depredador; puede evitar la depredación.

**Tabla 4.4.1.** Clasificación y contexto en los cuales se emiten diferentes tipos de vocalizaciones reportadas en especies de anuros. Extraído y modificado de Toledo *et al.*<sup>(52)</sup>.

<b>Defensivos</b> (gritos)	<b>Angustia</b> ( <i>Distress scream</i> )	Durante el sometimiento por parte de un depredador, puede evitar la depredación. Puede ser producido por machos y hembras.
	<b>Aviso</b> ( <i>Warning scream</i> )	Durante el acercamiento de un posible depredador, puede advertir al depredador sobre cualquier riesgo ofrecido por el anuro. Puede ser producido por machos y hembras.

## Materiales y métodos necesarios en estudios de vocalizaciones

### Metodología general de grabación

Al llegar a un sitio de muestreo y previo a la grabación, es recomendable registrar datos importantes de lugar, fecha, hora, ubicación geográfica, detalles del hábitat y del contexto (qué especies están presentes, si vocalizan en coros, caracterización del sitio reproductivo, etc.).

Si se va a trabajar con vocalizaciones de individuos focales (estudios taxonómicos, evolutivos, comportamentales, etc.), es aconsejable poder acercarse lo suficiente al sitio de canto, para individualizar al ejemplar que será registrado o al menos su posición relativa, siempre intentando no perturbar su comportamiento. La distancia de grabación debería ser no mayor a 1-1,5 mts y no menor a los 50 cm para no influir en el comportamiento del animal y evitar la saturación del audio. Esta distancia dependerá también del tipo de micrófono que estemos utilizando y su capacidad de reducir el ruido ambiente. El tiempo de grabación debería ser suficiente para obtener series de 10 a 20 cantos (grabaciones continuas sin cortes intermedios), para asegurar un número adecuado de cantos limpios y sin solapamientos, para su posterior análisis. Al finalizar cada registro y antes de dar por finalizada la grabación, es recomendable mencionar información básica como: día, hora, temperatura, especie, sitio o cualquier otra información que sea relevante para el estudio y ayuden a contextualizar el tipo de emisión, por ejemplo: presencia y distancia de otros machos, depredadores, etc. Esto ayudará a organizar y almacenar los archivos con exactitud, evitando confusiones entre registros en aquellos casos en que se realicen múltiples grabaciones en una misma jornada a una especie en particular.

Posteriormente a la grabación, es recomendada la captura del individuo (para medición de largo corporal y peso) y el registro de la temperatura (agua o aire, dependiendo del sitio de canto) y/o corporal. En estudios que requieran el registro de varios individuos o coros en un mismo momento (monitoreo de diversidad, utilización del espacio acústico, etc.) pueden utilizarse

grabadores con micrófonos omnidireccionales para captar mejor el paisaje acústico. Si fuera posible, en estos estudios, la utilización de grabadores automatizados (GDA) es ampliamente recomendado (ver **Sección 3.4 Monitoreo acústico pasivo**).

Ya en el laboratorio, resulta útil establecer una metodología para nombrar y archivar cada registro. Si bien esto dependerá de los objetivos de cada investigación, un ejemplo es la combinación de especie+fecha+sitio+número de grabación, ej: Lb25092018S3G4.wav (*Leptodactylus bufonius*, 25/09/2018, Sitio 3, Grabación 4). Una vez asignado el nombre puede incorporarse al cuaderno de campo junto a sus datos asociados.

### Instrumentos de grabación

Una parte importante del diseño del estudio es establecer el tipo y especificidad del equipo de grabación que mejor se adapte a los objetivos planteados. En todos los casos es recomendable el uso de un equipo de grabación que permita el mayor detalle posible. La mayoría de las especies de anuros vocalizan dentro del rango audible (20Hz y 20000Hz), por lo que un requisito mínimo es que la combinación micrófono-grabador cubra un rango similar de frecuencia (*frequency response*), lo más uniforme y plana posible, de al menos 60 a 16000 Hz<sup>(48)</sup>. Otras características recomendables de un grabador son: i) posibilidad de ajuste manual del nivel de grabación; ii) entradas para conexión de micrófonos externos (recomendado del tipo XLR); iii) almacenamiento de archivos de sonido digital en formatos sin compresión como WAV o AIFF (debe evitarse el almacenamiento en formatos de sonido comprimido como MP3); iv) construcción sólida y tamaño adecuado, para soportar condiciones de campo complejas y permitir una manipulación cómoda; v) posibilidad de combinar baterías internas y externas que aumenten el tiempo de uso. Entre las marcas de grabadores más reconocidas y utilizadas para bioacústica se pueden reconocer a Marantz®, Tascam®, Sony®, Roland®, SoundDevices®, Olympus® y Zoom®. En los siguientes enlaces, correspondientes al sitio web Avisoft Bioacoustics®, se encuentran comparaciones entre diferentes grabadores digitales que pueden ser útiles a la hora de valorar los diferentes equipos:

[http://www.avisoft.com/tutorials/sound-recording-in-the-field/;](http://www.avisoft.com/tutorials/sound-recording-in-the-field/)

<http://www.avisoft.com/recorder-tests/>

En cuanto a los micrófonos, la mayoría de los grabadores de las marcas nombradas anteriormente poseen micrófonos integrados de buena calidad, aunque el uso de micrófonos externos es siempre recomendado. Una de las características básicas de los micrófonos es su direccionalidad. En este sen-

tido se podría optar por micrófonos direccionales (que registran el sonido frontal, disminuyendo los sonidos laterales) u omnidireccionales (que captan sonidos desde cualquier dirección), dependiendo del tipo de registro que sea requerido. Si nuestro estudio requiere grabaciones de individuos focales en un ambiente ruidoso como puede ser un coro, entonces la mejor elección es un micrófono direccional, mientras que sí lo que necesitamos es el registro de coros para determinar las especies presentes en una comunidad, un micrófono omnidireccional sería más adecuado<sup>(54)</sup>.

### Ejemplos de metodologías e instrumental según tipo de lugar o sitio

Los sonidos varían con el tipo de ambiente, el relieve, viento, temperatura y humedad, siendo estos una propiedad dinámica de todos los paisajes. Por otro lado, los paisajes urbanos, están dominados por sonidos producidos por el ser humano por una variedad de fuentes, como vehículos, máquinas, sirenas, etc.<sup>(55)</sup>.

A partir de esto, es necesario entender que en estudios bioacústicos no es conveniente utilizar la misma metodología en todos los tipos de ambientes, ya que la transmisión de las señales acústicas puede verse interferida por cualquier elemento de su configuración donde se emite. En la **Tabla 4.4.2**, se resumen los ambientes mayormente estudiados, así como ejemplos de los instrumentos y métodos aplicados por diferentes investigadores en cada uno.

**Variables a tener en cuenta durante la grabación.** Al trabajar con señales acústicas es necesario tener en cuenta los factores que pueden causar variaciones en las vocalizaciones y que pueden influir no solo en la fiabilidad de los registros sino también en los resultados y conclusiones posteriores (**Tabla 4.4.3**) (ej.<sup>41, 49, 50, 56-66</sup>).

### Antecedentes en Argentina

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, la bioacústica se basa en el conocimiento científico de las señales y, básicamente, en las descripciones cuantitativas y cualitativas de las vocalizaciones de diferentes especies. Sin embargo, esta tarea está lejos de completarse, especialmente en las regiones tropicales, que albergan la mayor parte de la diversidad de especies de anfibios del planeta<sup>(67-69)</sup>. Las descripciones de las señales acústicas en anuros a menudo son acotadas en información y generalmente se limitan a las comparaciones entre taxones estrechamente relacionados<sup>(70)</sup>. En este sentido, los metadatos relacionados con las condiciones ambientales, el contexto con-



Tipo de ambiente	Materiales de grabación	Metodología general
Cultivos o pastizales	Grabador analógico conectado a micrófono unidireccional	Ubicar el micrófono a una distancia <50 cm del individuo a grabar o lo más cerca posible sin objetos interferentes para aumentar la relación señal-ruido (107). Se considera como excelente una relación S-R de 20 - 30 dB. Registrar el sonido durante 3 minutos o hasta completar 20-30 cantos <sup>(54)</sup> .
	Grabador automático con micrófono omnidireccional	El grabador se debe montar sobre un soporte de madera a aproximadamente 1,5 m sobre el suelo con una distancia de 100-200 m o de acuerdo a la extensión del sitio. Posteriormente programar las grabaciones que se sugiere deben tener una duración de 3 min en diferentes horarios de acuerdo al objetivo del estudio <sup>(108)</sup> .
Ambientes boscosos, selváticos o monte	Grabadoras autónomas (teléfonos celulares conectadas a micrófonos)  Grabadores automáticos con micrófono omnidireccional  Grabadores digitales conectados a micrófonos uni- u omnidireccionales.	Los grabadores deben ubicarse a una distancia de 200 - 300 m entre sí con el micrófono direccionado hacia abajo a una altura de aproximadamente 2 m <sup>(109,110)</sup> . Como en todos los casos es importante ubicar los dispositivos lo más cercano posible a la fuente emisora de sonido para aumentar y mejorar la relación señal-ruido. De acuerdo al objetivo del estudio, los micrófonos pueden estar ubicados a 1m o a 50 m de el/los individuos que cantan <sup>(111,112)</sup> para obtener entre 10-20 cantos.
Estanques o cuerpos de agua	Grabadores automáticos con micrófonos unidireccionales u omnidireccionales.	Los grabadores automáticos se instalarán a 1,5 m sobre el suelo, a una distancia que variará según el diámetro del estanque o de los cuerpos de agua. Estos dispositivos pueden programarse para realizar grabaciones constantes (formato WAV) en períodos de tiempo definidos previamente (minutos, horas, etc.) durante diferentes momentos del día, semanas o meses <sup>(113)</sup> .
	Grabadores digitales con micrófono interno o unidireccional.  Hidrófonos	Los grabadores digitales con cualquiera de las variantes de micrófonos se ubicaran a aprox 1.5 m del individuo emisor durante 3-5 minutos <sup>(114,115)</sup> .  El hidrófono es un sistema de grabación subacuática que se fija a un flotador, se coloca aproximadamente en el centro del estanque o cuerpo de agua de manera que cuelgue a la mitad de la profundidad del agua, y puede registrar todas las llamadas emitidas <sup>(116)</sup> .

**Tabla 4.4.2.** Metodologías generales en estudios bioacústicos de acuerdo a la estructuración del ambiente.

Ambientes urbanos con presencia de ruido antropogénico	Grabadores digitales con micrófonos unidireccionales o de escopeta.  Medidor de nivel de sonido (sonómetro)	Ubicar el micrófono a una distancia de 50-100 cm del individuo emisor durante 3-5 minutos. Se medirá la amplitud del ruido a 50- 00 m del foco emisor de tales señales <sup>(65, 66)</sup> . En este tipo de trabajo también son recomendados los experimentos con playback <sup>(117)</sup> .
--	---	--

ductual y/o los procedimientos metodológicos pueden ser precisos o estar ausentes en muchos estudios vocales descriptivos<sup>(48,71)</sup>. Por lo que se sugiere la lectura de la reciente guía para la descripción de llamadas de los anuros<sup>(48)</sup>.

En Argentina, existe una variedad de trabajos que hacen referencia a los diferentes tipos de cantos que emiten los anuros que se encuentran ampliamente distribuidos en nuestro país. Una de las vocalizaciones que ha sido descrita en varias especies son los **cantos de advertencia**. Para citar algunos ejemplos, en la familia Leptodactylidae, en *Leptodactylus furnarius* se ha reportado su canto como una sola nota repetida regularmente<sup>(72)</sup>; mientras que para *Physalaemus cuqui* se demostró la presencia de un largo gemido trinado y 7 u 8 armónicos<sup>(73)</sup>. En la familia Hylidae, para *Boana cordobae* se ha descrito un canto del tipo tonal no pulsado formado por aproximadamente 4 notas<sup>(43)</sup>, que puede presentar variación geográfica con cantos constituidos por 5 notas<sup>(64)</sup>. Dentro de la misma familia, *Dendropsophus nanus* presenta dos tipos de notas pulsadas en su canto, ambas con frecuencias dominantes similares<sup>(74)</sup>, mientras que *Nyctimantis siemersi* posee cantos muy variables en duración, número de notas y se describe su posible sincronización de dúos evitando la superposición de notas<sup>(75)</sup>. En el microhylido *Elachistocleis haroi*, se reportó un canto compuesto por un largo y agudo trino en relación a otras especies del mismo género<sup>(76)</sup>. También en la familia Bufonidae, se ha reportado para *Melanophryniscus cupreuscapularis* emisiones aisladas, generalmente agrupadas, seguidas por un rápido vibrato, presentando similitudes con el resto de especies del grupo *M. stelzneri*<sup>(77)</sup>.

Otros trabajos han estudiado la variación geográfica en parámetros estructurales del canto de advertencia. En *B. pulchella* se reportó una variación en la duración de las notas, frecuencias dominantes y tasas de emisión del canto entre poblaciones de Córdoba y Buenos Aires<sup>(78)</sup>, *Physalaemus biligonigerus*<sup>(60)</sup> mostró diferencias significativas en todos los parámetros de su canto en cinco poblaciones de la provincia de Córdoba y también se reportaron diferencias entre el canto de *B. cordobae* y *B. pulchella* en la misma provincia<sup>(64)</sup>. Por otro lado, se ha estudiado el efecto de la destrucción y fragmentación de hábitat<sup>(79-82)</sup> y del ruido antropogénico en especies como *Scinax nasicus*<sup>(66)</sup> y

Factores		Efectos
Ambiental	Temperatura	Al ser animales ectotermos, los cambios de temperatura en el ambiente pueden generar cambios en la estructura temporal del canto. (ej. a temperaturas bajas, los cantos pulsados son más lentos o de mayor duración, mientras que a temperaturas elevadas son más rápidos o cortos). Los registros acústicos deben estar asociados con datos de temperatura del agua y/o aire dependiendo del sitio de canto del individuo.
	Tamaño corporal	En general existe una relación inversa entre el tamaño del cuerpo y la masa de las cuerdas vocales con la frecuencia, siendo los machos de mayor tamaño los que cantan con una frecuencia dominante más baja. Es recomendable la medición del tamaño corporal y peso del individuo registrado, con el fin de analizar esta relación.
Contexto social	Motivación	La distribución temporal de los cantos puede mostrar una notable variación intra e interespecífica, dependiendo de las características comportamentales de las especies (ej. reproducción explosiva o prolongada, esfuerzo y regularidad de los cantos dentro de una misma noche), y del contexto en el que se encuentran los individuos (ej. mayor motivación en coros).
	Interacciones en coros	Los individuos a menudo ajustan el tiempo y número de cantos en respuesta a otros machos del coro. A mayor competencia, mayor es el cambio esperado en el canto. Puede ser complicada la diferenciación clara de distintos tipos de vocalizaciones que pueden emitir los individuos en este contexto.
	Natural y/o antrópico	Los sonidos naturales o geofónicos (ej. arroyos, viento, lluvia, otros animales) y de origen antrópico interfieren en la comunicación de los anfibios. Estos contextos de ruido pueden generar enmascaramiento y deterioro en la recepción y reconocimiento de las señales. Muchas especies de anuros expuestas a ambientes de ruido muestran modificación de sus señales para compensar los altos niveles de ruido ambiental (ej. variación de la frecuencia, modificación de parámetros temporales para vocalizar en períodos de silencio, etc.).
Geográfico	Variación geográfica	En especies con distribuciones amplias, pueden encontrarse a menudo variaciones en las vocalizaciones que pueden ser atribuidas a adaptaciones locales, diferencia en la disponibilidad de recursos, o reducción en el flujo de genes.
Evolutivo	Variabilidad y función de las propiedades acústicas	<i>Propiedades estáticas:</i> bajo restricciones morfológicas o morfo-fisiológicas; selección estabilizadora o direccional débil (ej. en muchas especies, la frecuencia dominante y la tasa de pulsos). Importantes en el reconocimiento de las especies y la identidad individual y poblacional.

**Tabla 4.4.3.** Principales factores afectando las propiedades acústicas de los cantos de anuros.

*Propiedades dinámicas:* bajo restricciones energéticas; selección direccional (por ejemplo, la duración del canto e intercanto). Podrían ser importantes en la elección de pareja.

La clasificación estática o dinámica para una misma propiedad puede variar entre las especies. Es importante el estudio de las propiedades acústicas en cada especie, para comprender su función específica y mejorar el diseño de estudios acústicos dependiendo del tipo de información que se desea obtener.

*Odontophrynus americanus*<sup>(65)</sup>. Ambas especies han presentado variaciones en parámetros acústicos de cantos de advertencia como frecuencia, duración o amplitud y esto permite resaltar la importancia de realizar trabajos a campo que consideren el efecto de diferentes factores externos. En este sentido, también se ha evaluado la influencia de la temperatura en el canto de especies como *Physalaemus biligonigerus*<sup>(83)</sup>, *Pleurodema tucumanum*<sup>(84)</sup> y *Ceratophrys cranwelli*<sup>(62)</sup> debido a la característica ectotérmica de los anuros. Entre otros trabajos que describen diferentes aspectos del canto de advertencia se puede mencionar variaciones intraespecíficas en *Scinax acuminatus*<sup>(85)</sup>, *Odontophrynus cordobae*<sup>(63)</sup> y *O. americanus*<sup>(86)</sup>, patrones vocales determinando procesos de especiación<sup>(44,87)</sup>, descripción temporal y espectral de *Gastrotheca christiani*, un anfibio en peligro de extinción<sup>(88)</sup> y patrones espaciales<sup>(89)</sup>.

Otro tipo de vocalizaciones estudiadas en Argentina han sido los **cantos de liberación** que son emitidos a machos conoespecíficos y heteroespecíficos por lo tanto conllevan información identificadora de cada especie<sup>(27,90)</sup> y que ocurre cuando son amplexados por otros machos intra o interespecíficamente o cuando las hembras no se encuentran receptivas<sup>(50)</sup>. Por ejemplo, se ha estudiado el canto de liberación en *Telmatobius reverberii*<sup>(91)</sup>, *Rhinella arenarum* y *R. papillosa*<sup>(92)</sup> y *Melanophryniscus cupreuscapularis*<sup>(77)</sup>. También se ha descrito el canto espectral y variaciones temporales de *R. bernardoi*<sup>(93)</sup>. Algunos estudios han demostrado que este canto posee información importante para determinar relaciones filogenéticas en situación de simpatria, tal es el caso de investigaciones con especies neotropicales como *R. achalensis*, *R. limensis*, *R. papillosa*, *R. arenarum*<sup>(94)</sup>. Para *O. cordobae* y *O. americanus* los cantos de liberación son sugeridos como herramienta de carácter diagnóstico para distinguir especies crípticas<sup>(95)</sup>. En la misma línea, estudios realizados en siete especies del género *Rhinella* confirman la diferenciación de éstas a partir del canto de liberación y la hibridación natural de *R. bergi* y *R. major*<sup>(96)</sup>.

En relación a los **cantos territoriales**, también denominados cantos agresivos son emitidos cuando otros machos invaden un territorio, donde puede ha-

ber una competencia por recursos como oviposición, alimentación, sitios de llamadas y hembras, o simplemente para el espacio acústico<sup>(52,97)</sup>. Este tipo de canto se ha descrito en especies como *Oreobates discoidalis*, con dos o tres notas cortas repetidas y en algunas ocasiones un armónico, *O. barituensis* con una nota breve y sin armónicos<sup>(98,99)</sup> y *Gastrotheca christiani*<sup>(88)</sup> con notas largas y más de treinta pulsos.

Otro canto que se encuentra dentro de la categoría de agresivo es el **canto de encuentro**, se emiten durante cualquier tipo de encuentro agresivo entre machos, incluyendo señales de largo y corto alcance. Se ha descrito en *Nyctimantis siemersi*<sup>(100)</sup>, que emiten este canto mientras tratan de persuadir a otro macho con sus sacos vocales inflados. Lo mismo fue analizado para *Phyllisalaemus albonotatus*<sup>(101)</sup>, *Odontophrynus barrioi*<sup>(102)</sup> y *Melanophryniscus cupreuscapularis*<sup>(77)</sup>. Según lo estudiado este tipo de canto son menos estereotipados y pueden ser más intensos, complejos y puede presentar variaciones en la duración de las notas en relación con los cantos territoriales.

Por último y menos estudiados se describen los **cantos de cortejo**, hasta el momento solo se ha registrado en *Boana punctata*, descrito como un canto de corta duración<sup>(103)</sup> y *Dendropsophus nanus*, el cual presentó notas similares pero de menor amplitud que la llamada de advertencia<sup>(74)</sup>. Probablemente, no se hayan reportado estos cantos para muchas especies debido a la falta de observaciones detalladas sobre el comportamiento de cortejo. Sin embargo, recientes estudios en ranas que habitan cascadas incluyen no solo información morfológica de adaptaciones de los sacos vocales sino también acompañando al canto despliegues visuales<sup>(104)</sup>.

La falta de información sobre la historia natural de las especies puede comprometer la cantidad, la calidad y los tipos de investigación en los anuros.

## Depósitos de datos bioacústicos

Debido a la relevancia de la bioacústica en la delimitación de especies de anuros, el depósito de registros de cantos en bibliotecas de sonido puede facilitar los estudios taxonómicos<sup>(105,106)</sup>, los archivos de sonido son depósitos importantes de la biodiversidad mundial y almacenan información sobre las especies<sup>(48,106)</sup>. El Consejo Internacional de Bioacústica (<http://www.ibac.info/links.html#libs>) proporciona una lista completa de enlaces a todos los principales archivos de sonido del mundo (ver<sup>48</sup>), entre ellas, las mayores colecciones científicas de sonido animal son: Fonoteca Zoológica del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid (<http://www.fonozoo.com/>); Biblioteca del Laboratorio de Ornitología de Cornell, Nueva York (<https://www>.

### Caja 4.4.2 - Grabación de sonidos utilizando teléfonos celulares

*En muchos casos, podemos encontrarnos en la necesidad de grabar señales acústicas en situaciones donde no tenemos la disponibilidad de equipos de grabación específicos. Ante la premisa de que siempre es mejor una grabación en donde sacrifiquemos calidad, en lugar de no contar con el registro, es que aparece como una opción viable el registro de señales mediante teléfonos celulares. La ventaja de estos dispositivos es que es común contar con ellos en cualquier situación y en todo momento, siendo además muy factible realizar grabaciones de una calidad aceptable.*

*Para un mejor registro utilizando estos dispositivos es necesario tener en cuenta algunos puntos (siguiendo recomendaciones de ebird.org / Macaulay Library):*

**Formato del archivo:** *Es recomendable no utilizar las aplicaciones de notas de voz que traen estos dispositivos por defecto, y que dan como resultado registros acústicos en formato MP3 (gran compresión y disminución notable de la calidad sonora). Por el contrario, existen varias aplicaciones gratuitas que permiten registros en formato WAV y diferentes configuraciones relacionadas a la calidad del audio que se desea obtener (ej: RecForge II o Lexis Audio Editor para Android y Voice Record Pro para IOS). Por otra parte, es necesario contemplar la disponibilidad de espacio en el teléfono, dado que estos archivos son considerablemente más pesados que los registros en MP3.*

**Configuraciones básicas:** *En estas aplicaciones deberían seleccionarse la mayor calidad de grabación posible; el canal de grabación en Mono (la mayoría de los teléfonos celulares graba con un único micrófono); el control de ganancia automática desactivado; y, si contara con la opción, el nivel de grabación máximo lo más alejado de 0 db (idealmente entre -6 y -12 dB), de modo que el sonido se vea afectado lo menos posible.*

**Técnica de grabación:** *Los pasos que deben seguirse para un registro correcto ya fueron expuestos en el apartado "Metodología General de Grabación", aunque deben tenerse en cuenta algunos puntos particulares para el uso de estos dispositivos. En primer lugar, es necesario reconocer donde se encuentra el micrófono en el teléfono, de manera de dejarlo despejado durante la grabación, y apuntando a la fuente de sonido que se desea registrar. Además, debería minimizarse el ruido de fondo (por parte del operador o de fuentes externas), debido a que estos dispositivos están diseñados para registrar sonidos cercanos y fuertes. Por ello, es aconsejable acercarse lo más posible a la fuente de sonido a registrar, manteniéndose alejados de fuentes externas de ruido, y evitando movimientos (al caminar, hablar o mover el celular) que puedan generar un sonido más fuerte y cercano que el que se quiere grabar. Una buena forma de evitar esto es colocar el teléfono en una superficie fija o utilizar un trípode.*

macaulaylibrary.org); Fonoteca Neotropical Jacques Vielliard de la Universidad Estatal de Campinas, São Paulo ([www.2.ib.unicamp.br/fnjv/](http://www.2.ib.unicamp.br/fnjv/)) y Biblioteca Británica de Sonidos de Vida Silvestre (<https://sounds.bl.uk/>). En ellas se pueden obtener y depositar audios siguiendo un protocolo particular para cada colección. En Argentina, se encuentra la posibilidad de depositar registros acústicos en el Laboratorio de Genética Evolutiva “Claudio Juan Bidau”, del Instituto de Biología Subtropical (CONICET-UNaM) de Misiones y en la Fonoteca Zoológica de la Universidad Nacional del Nordeste (FZ-UNNE) que funciona como depósito de grabaciones de especies animales y paisajes sonoros y depende del Laboratorio de Herpetología de la Universidad Nacional del Nordeste, con sede en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de Corrientes. De esta manera, se puede resignificar la importancia del depósito de archivos de sonido en colecciones audiovisuales accesibles a los investigadores y que se convierta en una práctica común para ayudar a futuras investigaciones.

## Bibliografía

1. Guerra, V.; Llusia, D.; Gambale, P.G.; de Morais, A.R.; Márquez, R.; & Bastos, R.P. 2018. The advertisement calls of Brazilian anurans: Historical review, current knowledge and future directions. *PLoS ONE* 13.
2. Rojas, D.; Warsi, O.M.; & Davalos, L.M. 2016. Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) challenge a recent origin of extant Neotropical diversity. *Systematic Biology* 65: 432-448.
3. Trakimas, G.; Whittaker R.J. & Borregaard M.K. 2016. Do biological traits drive geographical patterns in European Amphibians? *Global Ecology and Biogeography* 25: 1228-1238.
4. Alstrom, P. 2003. The use of sounds in Avian systematics and the importance of bird sound archives. *Bulletin-British Ornithologists Club* 123.
5. Bickford, D. et al. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148-155.
6. Tishechkin, D. Yu. 2014. The use of bioacoustic characters for distinguishing between cryptic species in insects: Potentials, restrictions, and prospects. *Entomological Review* 94: 289-309.
7. Andersson, M. & Iwasa Y. 1996. Sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution* 21: 296-302.
8. Bradbury, J.W.; & Vehrencamp, S.L. 1998. *Animal Communication*. Sinauer Assoc.; Inc.; Sunderland, Mass.
9. Endler, J. 2000. Evolutionary Implications of the Interaction between Animal Signals and the Environment: 11-46. *En: Espmark, Y.; Amundsen, T. & Rosenqvist, G. (eds.). Animal Signals: Signalling and Signal Design in Animal Communication*. Tapir Academic Press.
10. Simmons, A.M. 2006. Perspectives and Progress in Animal Acoustic Communication: 1-14. *En: Simmons, A. & Fay, R.R (eds.). Acoustic Communication*. Springer Handbook of Auditory Research, vol 16. Springer, New York, NY.
11. Narins, P.M.; Feng, A.S.; & Fay, R.R. (eds.). 2006. *Hearing and Sound Communication in Amphibians*. Springer New York.
12. Blair, W.F. & Bogert, C.M. 1962. The influence of sound on the behavior of Amphibians and Reptiles. *Copeia* 1962: 230.
13. Schneider, H. 1966. Die Paarungsrufe Einheimischer Froschlurche (Discoglossidae, Pelobatidae, Bufonidae, Hylidae). *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* 57: 119-136.
14. Salthe, S.N. & Mecham, J.S. 1974 Reproductive and courtship patterns: 309- 521. *En: Lofts, B. (ed.). Physiology of the Amphibia*, Academic Press, New York.

15. Keister, A.R. 1977. Communication in Amphibians and Reptiles: 519-544. *En: Sebeok, T.A. (ed.), How Animals Communicate*. Indiana University Press, Bloomington.
16. Wells, K.D. 1977. The social behaviour of Anuran Amphibians. *Animal Behaviour* 25: 666-693.
17. Gerhardt, H.C. & Schwartz, J.J. 1995. Interspecific interactions in Anuran courtship: 603-632. *En: Heatwole, H., & Sullivan, B. (eds.) Amphibian Biology 2: Social Behaviour*. Surrey Beatty, Chipping Norton, NSW.
18. Ryan, M.J. 2001. *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press.
19. Gerhardt, H.C.; Huber, F. & Simmons, A.M. 2003. Acoustic communication in insects and anurans: Common problems and diverse solutions. *The Journal of the Acoustical Society of America* 114: 559-559.
20. Wells, K.D. & Schwartz, J.J. 2006. The Behavioral Ecology of Anuran Communication: 44-86. *En: Narins, P., Feng, A.S., & Fay, R.R. (eds.) Hearing and Sound Communication in Amphibians*. Springer New York.
21. Schiøtz, A. 1967. The treefrogs (Rhacophoridae) of west Africa. *Spolia Zoology Museum Haun (Copenhagen)* 25: 1-346.
22. Valério, L.M.; Dorado-Rodrigues, T.F.; Chupel, T.F.; Penha, J. & Strüssmann, C. 2016. Vegetation structure and hydroperiod affect Anuran composition in a large Neotropical wetland. *Herpetologica* 72: 181-188.
23. Straughan, I.R. 1973. An analysis of the mechanisms of mating call discrimination in the frogs *Hyla regilla* and *H. cadaverina*. *Copeia* 1973: 415-424.
24. Ryan, M.J. 1988. Energy, calling and selection. *American Zoology* 28: 885-898.
25. Gerhardt, H.C. 1994. The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 293-324.
26. Cocroft, R.B. & Ryan M.J. 1995. Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. *Animal Behaviour* 49: 283-303.
27. Goicoechea, N.; De La Riva, I. & Padial, J.M. 2010. Recovering phylogenetic signal from frog mating calls. *Zoologica Scripta* 39: 141-154.
28. Narins, P.M. & Zelik, R. 1988. The effects of noise on auditory processing and behavior in amphibians: 511-536. *En: Fritsch, B.; Ryan, M.J.; Wilczynski, W.; Hetherington, T.E. & Walkowiak, W. (eds.) The Evolution of the Amphibian Auditory System*. Wiley, New York.
29. Kelley, D.B. 2004. Vocal communication in frogs. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 751-757.
30. Andrade, D.V.; Bevier, C.R. & de Carvalho, J.E. 2017. *Amphibian and Reptile Adaptations to the Environment*. CRC Press, Boca Raton, FL.
31. Caorsi, V.; Guerra, V.; Furtado, R.; Llusia D.; Miron, L.R.; Borges-Martins, M.; Both, C.; Narins, P.; Meenderink, S. & Márquez, R. 2019. Anthropogenic substrate-borne vibrations impact Anuran calling. *Scientific Reports* 9: 1-10.
32. Glaw, F. & Köhler, J. 1998. Amphibian species diversity exceeds that of mammals. *Herpetological Review* 29: 11-11.
33. Köhler, J.; Vieites, D.R.; Bonett, R.M.; García F.H.; Glaw, F.; Steinke, D. & Vences, M. 2005. New Amphibians and global conservation: A boost in species discoveries in a highly endangered vertebrate group. *BioScience* 55: 693.
34. Vences, M. & Köhler, J. 2008. Global diversity of Amphibians (Amphibia) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 569-580
35. Murphy, C.G. 1994. Determinants of chorus tenure in Barking Treefrogs (*Hyla gratiosa*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34: 285-294.
36. Bevier, C.R. 1997. Breeding activity and chorus tenure of two Neotropical hylid frogs. *Herpetologica* 53: 297-311.
37. Wells, K.D. 2001. The energetics of calling in frogs: 45-60. *En: Ryan, M.J (ed.) Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington.
38. Richards, D.G. & Wiley, R.H. 1980. Reverberations and amplitude fluctuations in the propagation of sound in a forest: Implications for animal communication. *The American Naturalist* 115: 381-399.
39. Rosa, P. & Koper, N. 2018. Integrating multiple disciplines to understand effects of anthropogenic noise on animal communication: *Ecosphere* 9: e02127.
40. Barrio, A. 1964. Caracteres eto-ecológicos diferenciales entre *Odontophrynus americanus* (Duméril et Bibron) y *O. occidentalis* (Berg) (Anura, Leptodactylidae). *Physis* 24: 385-390.



41. Gerhardt, H.C. 1991. Female mate choice in treefrogs: Static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour* 42: 615-635.
42. Ryan, M.J. & Wilczynski, W. 1991. Evolution of intraspecific variation in the advertisement call of a cricket frog (*Acris crepitans*, Hylidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 44: 249-271.
43. di Tada, I. E.; Zavattieri, M.V. & Martino, A.L. 1996. Análisis estructural del canto nupcial de *Hyla pulchella cordobae* (Amphibia: Hylidae) en la provincia de Córdoba (Argentina). *Revista Española de Herpetología* 10: 7-11.
44. Martino, A.L. & Sinsch, U. 2002. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *Journal of Zoology* 257: 67-81.
45. Guimarães, L. & Bastos, R.P. 2003. Vocalizações e interações acústicas em *Hyla raniceps* (Anura, Hylidae) durante a atividade reprodutiva. *Iheringia - Série Zoologia* 93: 149-158.
46. Bosch, J. & De La Riva, I. 2004. Are frog calls modulated by the environment? An analysis with Anuran species from Bolivia. *Canadian Journal of Zoology* 82: 880-888.
47. Almeida-Gomes, M.; Hatano, F.H, Van Sluys, M. & Rocha, C.F.D. 2007. Diet and microhabitat use by two Hylodinae species (Anura, Cycloramphidae) living in sympatry and syntopy in a Brazilian Atlantic Rainforest area. *Iheringia - Serie Zoologia* 97: 27-30.
48. Köhler, J.; Jansen, J. & Rodríguez, A. 2017. The use of bioacoustics in Anuran taxonomy: Theory, terminology, methods and recommendations for best practice. *Zootaxa* 425: 1-124
49. Gerhardt, H.C. & Huber, F. 2002. *Acoustic Communication in Insects and Anurans: Common Problems and Diverse Solutions*. University of Chicago Press, Chicago and London.
50. Wells, K.D. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press.
51. Toledo, L.F. & Haddad, C.F.B. 2009. Defensive vocalizations of Neotropical anurans. *South American Journal of Herpetology* 4: 25-42.
52. Toledo, L.F.; Martins, I.A.; Bruschi, D.P.; Passos, M.A.; Alexandre, C. & Haddad, C.F.B. 2015. The anuran calling repertoire in the light of social context. *Acta Ethologica* 18: 87-99
53. Steinmann, A.R. & Grenat, P.R. 2020. *Comportamiento Animal Reproductivo: Un Enfoque Evolutivo*. UNI RIO Editora, Córdoba, Argentina.
54. Angulo, A.; Rueda-Almonacid, J.V.; Rodríguez-Mahecha & La Marca, E. (eds). 2006. *Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina*. Conservación Internacional. Serie Manuales de Campo N° 2. Panamericana Formas e Impresos S.A.; Bogotá D.C.
55. Barber, J.R.; Crooks, K.R. & Fristrup, K.M. 2010. The costs of chronic noise exposure for terrestrial organisms. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 180-189.
56. Castellano, S. & Giacoma, C. 1998. Stabilizing and directional female choice for male calls in the European green toads. *Animal Behaviour* 56: 275-287.
57. Narins, P.M. 2001. Ectothermy's last stand: Hearing in the heat and cold: 61-70. *En: Ryan, M.J. (ed.). Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington DC.
58. Hödl, W. & Amezcua, A. 2001. Visual signalling in anuran amphibians: 121-141. *En: Ryan, M.J. (ed.). Frogs Speaking. Recent Advances in the Study of Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press: Washington.
59. Tárano, Z. 2002. Vocal responses to conspecific call variation in the neotropical frog *Physalaemus enesefae*. *Journal of Herpetology* 36: 615-620.
60. Bionda, C.; Salas, N. & di Tada, I. 2006. Variación bioacústica en poblaciones de *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leptodactylidae) en Córdoba, Argentina. *Revista Española de Herpetología* 20: 95-104.
61. Parris, K.M.; Velik-Lord, M. & North, J.M.A. 2009. Frogs call at a higher pitch in traffic noise. *Ecology and Society* 14: 25.
62. Valetti, J.A.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2013. Bioacústica del canto de advertencia de *Ceratophrys cranwelli* (Anura: Ceratophryidae). *Revista de Biología Tropical* 61: 273-280.
63. Grenat, P.R.; Valetti, J.A. & Martino, A.L. 2013. Intra-specific variation in advertisement call of *Odontophrynus cordobae* (Anura, Cycloramphidae): a multilevel and multifactor analysis. *Amphibia-Reptilia* 34: 471-482.
64. Baraquet, M.; Grenat, P.R.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2015. Geographic variation in the advertisement call of *Hypsiboas cordobae* (Anura, Hylidae). *Acta Ethologica* 18: 79-86

65. Grenat, P.; Pollo, F.; Ferrero, M. & Martino, A.L. 2019. Differential and additive effects of natural biotic and anthropogenic noise on call properties of *Odontophrynus americanus* (Anura, Odontophrynidae): Implications for the conservation of anurans inhabiting noisy environments. *Ecological Indicators* 99: 67-73.
66. Leon, E.; Peltzer, P.M.; Lorenzon, R.; Lajmanovich, R.C. & Beltzer, A.H. 2019. Effect of traffic noise on *Scinax nasicus* advertisement call (Amphibia, Anura). *Iheringia - Serie Zoologia* 109: e2019007.
67. Stuart, S.N.; Hoffmann, M.; Chanson, J.S.; Cox, N.A.; Berridge, R.J.; Ramani, P. & Young, B.E. 2008. Threatened Amphibians of the World. Lynx Edicions, Barcelona.
68. Blaustein, A.R.; Han, B.A.; Relyea, R.A.; Johnson, P.T.J.; Buck, J.C.; Gervasi, S.S. & Kats, L.B. 2011. The complexity of Amphibian population declines: Understanding the role of cofactors in driving Amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223: 108-119.
69. Cardinale, B.J. *et al.* 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486: 59-67.
70. Batista, V.G.; Gambale, P.G.; Lourenço-De-Moraes, R.; Campos, R.M. & Bastos, R.P. 2015. Vocalizations of two species of the *Hypsiboas pulchellus* group (Anura: Hylidae) with comments on this species group. *North-Western Journal of Zoology* 11: 253-261.
71. Cardoso, A.J. & Vieillard, J. 1990. Vocalizacoes de anfibios anuros de um ambiente aberto, em Cruzeiro do Sul, estado do Acre. *Revista Brasileira de Biología* 50: 229-242.
72. Baldo, D.; Cristian, T. & Magno, V.S. 2008. Amphibia, Anura, Leptodactylidae, *Leptodactylus furnarius*: New country record, geographic distribution map and advertisement call. *Check List* 4: 98-102.
73. Ferrari, L. & Vaira, M. 2001. Advertisement call and breeding activity of *Physalaemus cuqui* (Lobo, 1993). *Herpetological Bulletin* 77: 20-22.
74. Teixeira, B.F.; Zaracho, V.H. & Giaretta, A.A. 2016. Advertisement and courtship calls of *Dendropsophus nanus* (Boulenger, 1889) (Anura: Hylidae) from its type locality (Resistencia, Argentina). *Biota Neotropica* 16: e20160183.
75. Zaracho, V.H. & Areta, J.I. 2008. The advertisement call of *Argenteohyla siemersi pedersenii* (Amphibia, Anura, Hylidae) and comments on its taxonomic status. *FACENA* 24: 49-57.
76. Pereyra, L.C.; Akmentins M.S.; Laufer G. & Vaira M. 2013. A new species of *Elachistocleis* (Anura: Microhylidae) from North-Western Argentina. *Zootaxa* 3694: 525-544.
77. Duré, M.I.; Schaefer, E.F. & Kehr, A.I. 2015. Acoustic repertoire of *Melanophryniscus cupreuscapularis* (Céspedes and Álvarez 2000) (Anura: Bufonidae): advertisement, encounter, and release calls. *Journal of Herpetology* 49: 53-9.
78. Baraquet, M.; Salas, N.E. & Di Tada, I.E. 2007. Variación geográfica en el canto de advertencia de *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) en Argentina. *Revista Española de Herpetología* 21: 107-118.
79. Peltzer, P. & Lajmanovich, R. 2001. Habitat fragmentation and Amphibian species richness in riparian areas of the Paraná River, Argentina. *Froglog* 46: 5.
80. Peltzer, P. M.; Lajmanovich R.C. & Beltzer, A.H. 2003. The effects of habitat fragmentation on amphibian species richness in the floodplain of the middle Parana River. *The Herpetological Journal* 13: 95-98.
81. Peltzer, P.; Bock G.; Tardivo, R. & Lajmanovich, R. 2004. Effects of habitat loss and fragmentation on Anuran in Espinal Eco-region of Argentina: a GIS approach. *Froglog* 63: 3-4.
82. Peltzer, P.M. 2006. La fragmentación de hábitat y su influencia en la diversidad y distribución de anfibios anuros de áreas ecotónicas de los dominios fitogeográficos amazónico y chaqueño. Doctorado en Ciencias Naturales, Facultad y Museo de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de La Plata.
83. Bionda, C.; Salas, N. & Di Tada, I. 2008. Effect of temperature on the advertisement call of *Physalaemus bilingonigerus* (Anura: Leptodactylidae). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 19: 19-22.
84. Valetti, J.A. & Martino, A.L. 2012. Temperature effect on the advertisement call of *Pleurodema tucumanum* (Anura: Leiuperidae). *Phyllomedusa* 11: 125-134.
85. Faivovich, J.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2001. Comentarios preliminares sobre las vocalizaciones de *Scinax acuminatus* (Anura: Hylidae). IV Congreso Argentino de Herpetología Salta, Argentina.

86. Grenat, P.R.; Valetti, J.A. & Martino, A.L. 2017. Call variability, stereotypy and relationships in syntopy of tetraploid common lesser escauerzo (genus *Odontophrynus*). *Zoologischer Anzeiger* 268: 143-150.
87. Martino, A.L.; Dehling, J.M. & Sinsch, U. 2019. Integrative taxonomic reassessment of *Odontophrynus* populations in Argentina and phylogenetic relationships within Odontophrynidae (Anura). *PeerJ* 2: e6480.
88. Vaira, M.; Ferrari, L. & Akmentins, M. S. 2011. Vocal repertoire of an endangered marsupial frog of Argentina, *Gastrotheca christiani* (Anura: Hemiphractidae). *Herpetology Notes* 4: 279-284.
89. Sanchez, L.C.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2009. Structure of wetland-breeding anuran assemblages from the southern section of Paraná river, Argentina. *Herpetological Journal* 19: 173-184.
90. Aronson, L.R. 1944. The sexual behavior of Anura. 6. The mating pattern of *Bufo americanus*, *Bufo fowleri*, and *Bufo terrestris*. *American Museum* 1250: 1-15.
91. Cei, J.M. 1969. The Patagonian Telmatobiid Fauna of the Volcanic Somuncura Plateau of Argentina. *Journal of Herpetology* 3: 1-18.
92. Brown, L.E. & Guttman, S.I. 1970. Natural hybridization between the toads *Bufo arenarum* and *Bufo spinulosus* in Argentina. *American Midland Naturalist* 83: 160.
93. Sanabria, E.A. & Quiroga, L.B. 2012. The release call of *Rhinella bernardoi* (Anura: Bufonidae). *Herpetology Notes* 5: 255-258.
94. di Tada, I.E.; Martino, A.L. & Sinsch, U. 2001. Release vocalizations in neotropical toads (*Bufo*): Ecological constraints and phylogenetic implications. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 39: 13-23.
95. Grenat, P.R. & Martino, A.L. 2013. The release call as a diagnostic character between cryptic related species *Odontophrynus cordobae* and *O. americanus* (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa* 3635: 583-586.
96. Guerra C.; Baldo, D. & Rosset, S. 2011. Advertisement and release calls in Neotropical toads of the *Rhinella granulosa* group and evidence of natural hybridization between *R. bergi* and *R. major* (Anura: Bufonidae). *Zootaxa* 3092: 26-42.
97. Brenowitz, E.A. 1982. The active space of Red-Winged Blackbird song. *Journal of Comparative Physiology A* 147: 511-522.
98. Akmentins, M.S. 2011. Vocal repertoire of two species of *Oreobates* Jiménez de La Espada, 1872 (Anura: Strabomantidae) of the Yungas Andean Forest, NW Argentina. *Journal of Natural History* 45: 1789-1799.
99. Akmentins, M.S.; Velasco, M.A.; Kass, C.A. & Kacoliris, F.P. 2015. A new threat for the endangered frog *Atelognathus reverberii* (Anura: Batrachylidae) in Argentinean Patagonia. *Phyllomedusa* 14: 63-66.
100. Cajade, R. et al. 2010. Reproductive biology of *Argenteohyla siemersi pedersenii* Williams and Bosso, 1994 (Anura: Hylidae) in Northeastern Argentina. *Journal of Natural History* 44: 1953-1978 .
101. Duré, M.I.; Schaefer, E. & Kehr, A.I. 2003. Descripción del canto de encuentro en *Physalaemus albonotatus* (Anura: Leptodactylidae) de Corrientes, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 17: 119-125.
102. Rosset, S.D.; Ferraro, D.P.; Alcalde, L. & Basso, N. 2007. A revision of *Odontophrynus barrioi* (Anura: Neobatrachia): morphology, osteology, vocalizations, and geographic distribution. *South American Journal of Herpetology* 2: 97-106.
103. Brunetti, A.E.; Taboada, C. & Faivovich, J. 2015. Extended vocal repertoire in *Hypsiboas punctatus* (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology* 49: 46-52.
104. Elias-Costa, A.J. & Faivovich, F. 2019. Convergence to the tiniest detail: vocal sac structure in torrent-dwelling frogs. *Biological Journal of the Linnean Society* 128: 390-402.
105. Glaw, F.; Köhler, J.; De la Riva, I.; Vieites, D.R. & Vences, M. 2010. Integrative taxonomy of Malagasy treefrogs. Combination of molecular genetics, bioacoustics and morphology *Boophis*. *Zootaxa* 2383: 1-82.
106. Toledo, L.F.; Tipp, C. & Márquez, R. 2015. The value of audiovisual archives. *Science* 347: 484.
107. Budney, G.F. & Grotke, R.W. 2009. Técnicas para la grabación de las vocalizaciones de las Aves Tropicales. *Ornithological Monographs* 48: 147-163.

108. Walls, S.C.; Waddle, J.H. & Faulkner, S.P. 2014. Wetland reserve program enhances site occupancy and species richness in assemblages of anuran amphibians in the Mississippi Alluvial Valley, USA. *Wetlands* 34: 197-207.
109. Depraetere, M.; Pavoine, S.; Jiguet, F.; Gasc, A.; Duvail, S. & Sueur, J. 2012. Monitoring animal diversity using acoustic indices: Implementation in a temperate woodland. *Ecological Indicators* 13: 46-54.
110. Deichmann, J.; Hernández-Serna A.; Delgado C.J.A.; Campos-Cerqueira M. & Aide, T.M. 2017. Soundscape analysis and acoustic monitoring document impacts of natural gas exploration on biodiversity in a Tropical Forest. *Ecological Indicators* 74: 39-48.
111. Forti, L. Lingnau, R. & Bertoluci, J. 2017. Acoustic variation in the advertisement call of the Lime treefrog *Sphaenorhynchus caramaschii* (Anura: Hylidae). *Vertebrate Zoology* 69: 197-205.
112. Penna, M.; Moreno-Gómez, F.N.; Muñoz, M.I. & Cisternas, J. 2017. Vocal responses of austral forest frogs to amplitude and degradation patterns of advertisement calls. *Behavioural Processes* 140: 190-201.
113. Duarte, M.H.L.; Caliari, E.P.; Viana, Y.P. & Nascimento, L.B. 2019. A natural orchestra: How are Anuran choruses formed in artificial ponds in Southeast Brazil? *Amphibia-Reptilia* 40: 1-10.
114. Cunningham, G.M. & Fahrig, L. 2010. Plasticity in the vocalizations of Anurans in response to traffic noise. *Acta Oecologica* 36: 463-70.
115. Haga, I.A.; De Carvalho, T.R.; De Andrade, F.S. & Giaretta, A.A. 2017. Advertisement and aggressive calls of *Pithecopus azureus* (Anura: Phyllomedusidae) from the border of Brazil and Paraguay. *Phyllomedusa* 16: 47-56.
116. Sacchi, R.; Cigognini, R.; Gazzola, A.; Bernini, F. & Razzeti, E. 2015. Male calling activity in syntopic populations of *Rana latastei* and *Rana dalmatina* (Amphibia: Anura). *Italian Journal of Zoology* 82: 124-132.
117. Kaiser, K.; Scofield, D.; Alloush, M.; Jones, R.; Marczak, S.; Martineau, K.; Oliva, M. & Narins, P. 2011. When sounds collide: The effect of anthropogenic noise on a breeding assemblage of Frogs in Belize, Central America. *Behaviour* 148: 215-232.

## 4.5 ESTUDIOS TRÓFICOS

**Marta I. Duré<sup>1,2</sup>, Javier A. López<sup>1,4</sup>, Rafael C. Lajmanovich<sup>1,3</sup>, Paola M. Peltzer<sup>1,3</sup>, Andrés M. Attademo<sup>1,3</sup>, Eduardo F. Schaefer<sup>1,5</sup> & Carolina Antoniazzi<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Centro de Ecología Aplicada del Litoral CECOAL-CONICET-UNNE, Ruta 5, km 2.5, W 3400 AMD, Corrientes, Argentina.

<sup>3</sup> Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Limnología (INALI: CONICET-UNL). Ciudad Universitaria, Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina; Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Paraje el Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina.

<sup>5</sup> Instituto de Investigaciones Geohistóricas - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IIGHI, CONICET- UNNE). Av. Castelli 930 (H3504AAO) Resistencia - Chaco - Argentina.

### 4.5.1. Ecología Trófica- Antecedentes

Los anfibios son eslabones importantes en el flujo de energía de los ecosistemas acuáticos y terrestres debido a su ciclo de vida bifásico<sup>(1)</sup>. Por esto, los estudios destinados a analizar las interrelaciones tróficas y preferencias alimentarias, a nivel poblacional o comunitario, brindan información importante para determinar la composición de gremios o ensambles y resultan de vital importancia para entender aspectos fundamentales tanto de sus historia de vida como de la forma en que las diferentes especies de anfibios comparten y explotan sus recursos<sup>(2-4)</sup>.

Numerosos estudios han demostrado la importancia del alimento para la evolución y organización de las comunidades de anuros, tanto adultos como juveniles, en diferentes ecosistemas. Pueden comportarse como depredadores generalistas (aquellos que consumen una gran variedad de presas) o especialistas (con preferencia por un ítem alimentario) y dietas que se encuentran entre estos dos extremos. El resultado de este comportamiento se traduce en una relación costo-beneficio (búsqueda, captura y manipulación, *versus* ganancia energética). Dicha elección se ajusta, además, a fluctuaciones y sincronizaciones espacio-temporales en los períodos de actividad de los anuros y sus presas, lo que puede depender tanto de factores naturales como antrópicos (cultivos, deforestación, contaminación), o una combinación de los mismos<sup>(5-8)</sup>.

Por otra parte, además de la oferta trófica, existen otros factores que influyen en la selección de una presa<sup>(4,9-18)</sup>. Estos son: tipo, número y volumen de presas consumidas, relación entre el tamaño de las presas y del depredador, cambios ontogénicos y potencial aumento de la capacidad antidepredatoria, a partir de alcaloides provenientes de las presas<sup>(4,15,16,19-22)</sup>.

En el último Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina<sup>(23)</sup>, uno de sus componentes, destinado a evaluar y categorizar el estado actual de las poblaciones de anuros de nuestro país, identifica como uno de los problemas a resolver “la escasez de información básica sobre distribución y aspectos fundamentales de historias de vida (estimaciones de abundancia, fluctuaciones naturales / estacionales, aspectos tróficos, características reproductivas, etc.) de las especies Insuficientemente Conocidas (IC) o descriptas recientemente”. Sobre esta base, resulta imperioso detectar cuáles son las regiones (o provincias) donde se observa un vacío de información con respecto a esta temática, identificando géneros y especies con datos tróficos insuficientes o sin datos para el país.

En Argentina, existen en la actualidad alrededor de 20 especies categorizadas como insuficientemente conocidas, y se han reportado datos tróficos para,

aproximadamente, el 43% de las especies citadas para el país. En lo que respecta a estudios sobre dieta, se observa un predominio de estudios del tipo descriptivo convencional, puntuales, sin referencia a variaciones temporales (estacional), ontogenéticas o espaciales (entre hábitats o incluso regiones diferentes), y en la mayoría de los casos sin evaluar la disponibilidad de presas.

**4.5.1a -Larvas:** se han realizado diversos estudios analizando la composición y ecología trófica, a nivel intra e interespecífico, en ambientes lénticos de Argentina<sup>(24-30)</sup>. La mayor parte de ellos en especies de las ecoregiones del Espinal, Chaco Húmedo y Deltas e Islas del Río Paraná región del Litoral Fluvial, donde abordan el estudio de especies puntuales<sup>(27,31,32)</sup> siendo escasos los análisis comparativos interespecíficos<sup>(25,30,33,34)</sup>.

En general, las larvas de anuros son detritívoras, herbívoras, suspensívoras y micrófagas<sup>(24,25,31, 35-38)</sup>. Los renacuajos incluyen en sus dietas elementos de comunidades acuáticas planctónicas, bentónicas, neustónicas y perifíticas, tales como microinvertebrados, protozoos, macrófitas, algas unicelulares coloniales, cianobacterias, bacterias, granos de polen, hongos, detritus y materia orgánica disuelta y, en algunas especies, huevos, larvas, juveniles de anuros, peces, pequeños artrópodos y restos plásticos<sup>(27,30,34,39-43)</sup>. Estudios recientes incorporan el análisis de las proporciones de isótopos de N y C y muestran que, dependiendo de la especie, oferta trófica y características del cuerpo de agua que habitan, los renacuajos pueden ocupar desde los niveles más bajos en las redes tróficas hasta los más elevados, con señales isotópicas que los ubican como consumidores primarios, omnívoros y hasta como carnívoros<sup>(34,46,47)</sup>.

**4.5.1b -Postmetamorfos y adultos:** En su mayoría, los anuros adultos son carnívoros. Por lo general, éstos consumen una gran cantidad de invertebrados, principalmente artrópodos incluyendo, arácnidos, crustáceos y, especialmente, insectos<sup>(2,5,8,18,35,48-61)</sup>. En algunas especies, se ha desarrollado el canibalismo, la oofagia, ictiofagia, anurofagia, ofiofagia, o mastozofagia. Pueden comportarse como depredadores oportunistas o generalistas, donde el contenido de la dieta refleja la disponibilidad de presas en el ambiente. Sin embargo, algunas de ellas están especializadas en algún tipo particular de invertebrado<sup>(11-16,35,50)</sup>. Toft<sup>(2)</sup> identifica dos patrones en la alimentación; los “especialistas en hormigas y termitas” y los “no especialistas en hormigas”, que consumen otros grupos de invertebrados. En este contexto, la disponibilidad de presas es uno de los factores de mayor influencia en la actividad

trófica de los anfibios. Johnson<sup>(62)</sup> define la disponibilidad trófica como la cantidad de un recurso accesible a un animal en un periodo y lugar determinado. En este sentido, muchos investigadores coinciden en que, en la medida de lo posible, debe incorporarse en los análisis la información sobre la disponibilidad de alimento<sup>(4,11-15,56,61)</sup>; con la finalidad de describir y comparar la alimentación de una especie en un determinado sitio considerando sus preferencias tróficas<sup>(63)</sup>.

Los estudios tróficos resultan fundamentales para determinar el estatus de las especies en cada región, ya que las características alimentarias y las interacciones establecidas entre ellas, son parte esencial para la caracterización de cada especie tanto a nivel poblacional como comunitario. Además, conocer este aspecto fundamental en sus historias de vida, ayuda a identificar las potenciales especies, o grupos de especies, amenazados o en peligro y prever su respuesta ante un determinado tipo de disturbio, entre ellos: la fragmentación del hábitat, contaminación, desecación, fuego, entre otros<sup>(8)</sup>.

En Argentina numerosos estudios descriptivos y comparativos han sido realizados en adultos, mencionando a Basso<sup>(64)</sup>, Lajmanovich<sup>(65, 66)</sup>, Peltzer y Lajmanovich<sup>(5,51,67,68)</sup>, Duré et al.<sup>(54)</sup>, Attademo et al.<sup>(6,56,57)</sup>, López et al.<sup>(58-61,69)</sup>, Peltzer et al.<sup>(7)</sup>, describiendo su rol como importantes depredadores de artrópodos y ocasionalmente de vegetales. En este sentido, es necesario mencionar que los anfibios adultos actúan como controladores naturales de invertebrados considerados perjudiciales para el hombre, tal como lo describen algunos trabajos realizados en cultivos de soja, arroz y zonas urbanas<sup>(5,6,56,57)</sup>.

## 4.5.2. Técnicas

### 4.5.2.1 Metodología utilizada para la obtención de contenidos

#### 4.5.2.1a -Larvas

Históricamente, la ecología trófica de renacuajos se analizó mediante el estudio de los contenidos del tracto digestivo<sup>(24-26,32,33,37,38,70-72)</sup>, y en su mayoría esta metodología sigue desarrollándose en distintos trabajos<sup>(73)</sup>.

Una vez capturados, se deben seleccionar los ejemplares que no evidencien signos de un estado físico inusual (salvo que esto fuera parte del objetivo del estudio). Estos deben ser sacrificados lo más rápidamente posible, preferentemente *in situ*. Para ello, se puede implementar la administración de una sobredosis de anestésico en solución acuosa (1 ml de una solución saturada de benzocaína en etanol / 1 L de agua) y luego fijarlos *in situ* en formalina bufferada al 10%<sup>(74,75)</sup>, para detener los procesos digestivos y evitar así la des-



composición del material. Es de suma importancia remarcar, que siempre que sea necesario sacrificar ejemplares, sea cual fuere el estadio de su ciclo de vida, es necesario contar con un protocolo de procedimientos aprobado por un Comité de Ética o CICUAL (Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio).

En laboratorio, se debe extraer el tracto digestivo mediante una incisión desde la cloaca hasta el disco oral, bajo lupa. Para el análisis, se puede considerar el contenido del tracto intestinal completo<sup>(76,77)</sup> o la primera porción del mismo, evaluando previamente que no existan diferencias de los ítems presas en los distintos sectores<sup>(37)</sup>. Cada intestino se dividirá, mediante cortes longitudinales, en una placa de Petri con la finalidad de extraer su contenido. A esto se le añadirá una cantidad conocida de formaldehído al 4% y se colocará en un microtubo o eppendorf<sup>(76)</sup>.

Para la observación y determinación de la composición alimentaria se deberán analizar, bajo microscopio óptico, tres alícuotas del tubo eppendorf previamente montadas en un portaobjetos. El volumen de las alícuotas dependerá de la cantidad de contenido presente en cada tracto digestivo, el cual puede variar entre 0,05 a 0,2 ml.

Estos estudios tienen algunas limitaciones a la hora de comprender ciertos aspectos de la ecología trófica de las larvas, ya que los materiales ingeridos no siempre son asimilados o puede no ser el material primario que se digiere. Además, los distintos elementos de la dieta son digeridos a distintas velocidades y representan sólo una instantánea de la composición trófica en el momento de la recolección<sup>(78)</sup>.

Algunas opciones de reciente uso son el análisis bioquímico de los contenidos digestivos y estudios de tejidos mediante biomarcadores tales como ácidos grasos<sup>(79)</sup>, o isótopos estables<sup>(30,44,80)</sup>. Los isótopos estables del carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) son una alternativa eficaz para entender los flujos de energía y las posiciones tróficas de los renacuajos en las redes tróficas, porque indican la asimilación de los nutrientes<sup>(81,82)</sup>.

Por otra parte, en renacuajos de anfibios herbívoros que obtienen una nutrición significativa de fuentes autótrofas, se debe considerar la importancia de la microbiota intestinal ya que, probablemente, sean estos microorganismos los encargados de los procesos de degradación y asimilación de nutrientes<sup>(83)</sup>. Para larvas de especies Neotropicales se puede mencionar el estudio de Lajmanovich et al.<sup>(84)</sup> que, a través de técnicas microbiológicas tradicionales, describieron la microbiota intestinal de larvas *Rhinella arenarum*; compuesta principalmente por coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Enterococcus*).

*bacter* spp.), y otros reconocidos géneros bacterianos como *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*.

Con el fin de evaluar, en forma preliminar, la composición bacteriana del intestino de renacuajos, utilizando técnicas convencionales de microbiología en condiciones de esterilidad, se extrae el intestino de las larvas y macera en solución fisiológica, para posteriormente realizar las diluciones convenientes y sembrarlo en placas de Petri para su recuento y/o identificación. El medio de cultivo que se emplee dependerá de la información que se quiera obtener. Se podrá realizar un análisis cualitativo que permita identificar las principales especies de bacterias presentes en la microbiota, o un análisis cuantitativo que estime en qué proporciones se encuentran los distintos grupos de microorganismos bacterianos dentro de la comunidad intestinal. El análisis cualitativo implica la siembra del contenido intestinal en un medio no-selectivo, como agar nutritivo, a partir del cual se aíslan distintas colonias para su identificación individual a través de distintas pruebas bioquímicas y posterior caracterización fenotípica. Por su parte, para el análisis cuantitativo, el contenido intestinal es directamente sembrado en medios selectivos (en los que sólo crecen un tipo específico de microorganismos) para valorar la cantidad de unidades formadoras de colonias que crecen en cada uno de ellos.

En la mayoría de las investigaciones recientes sobre la microbiota intestinal de larvas de anfibios, la identificación se realiza por la secuenciación del ADN directamente del intestino (metagenómica), e incluyen un espectro más amplio de taxones que se analizan a mayor escala<sup>(85-87)</sup>.

#### **4.5.2.1b -Postmetamorfos y adultos**

Uno de los métodos utilizados para la obtención de contenidos estomacales en anuros involucra el sacrificio de individuos con la finalidad de extraerles el estómago y/o el intestino y así acceder al contenido que se encuentre en los mismos. Ésta metodología es hoy aceptable sólo cuando los ejemplares sean utilizados también para otros estudios o hayan sido preservados con la finalidad de integrar una colección científica. Actualmente, se prefieren otras técnicas en las que no sea necesario recurrir a la eutanasia, tal es el caso del lavaje estomacal o "*Stomach Flushing*".

En el caso de que se recurra a la evisceración de individuos, los anfibios deberán ser eutanizados y preservados en formalina al 10%. Con la finalidad de evitar que los procesos digestivos actúen sobre el contenido, perdiendo valiosa información; es aconsejable que este procedimiento no exceda las dos

horas posteriores a la captura. Para la extracción del tracto digestivo se debe realizar una incisión en el abdomen en forma de “C” o en forma de “T ⊥” lo que deberá hacerse con sumo cuidado, preservando el resto de los órganos para futuros estudios. Al abrir el tracto digestivo sobre una caja de Petri, se retirarán cuidadosamente las presas y todo el contenido, resguardando que las mismas no pierdan antenas, patas u otras estructuras cruciales para su identificación. Se puede utilizar agua destilada con ayuda de una piseta para lavar todo el contenido de las paredes internas del tracto. Es de suma importancia remarcar, que siempre que sea necesario sacrificar ejemplares, sea cual fuere el estadio de su ciclo de vida, es necesario contar con un protocolo de procedimientos aprobado por un Comité de Ética o CICUAL (Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio).

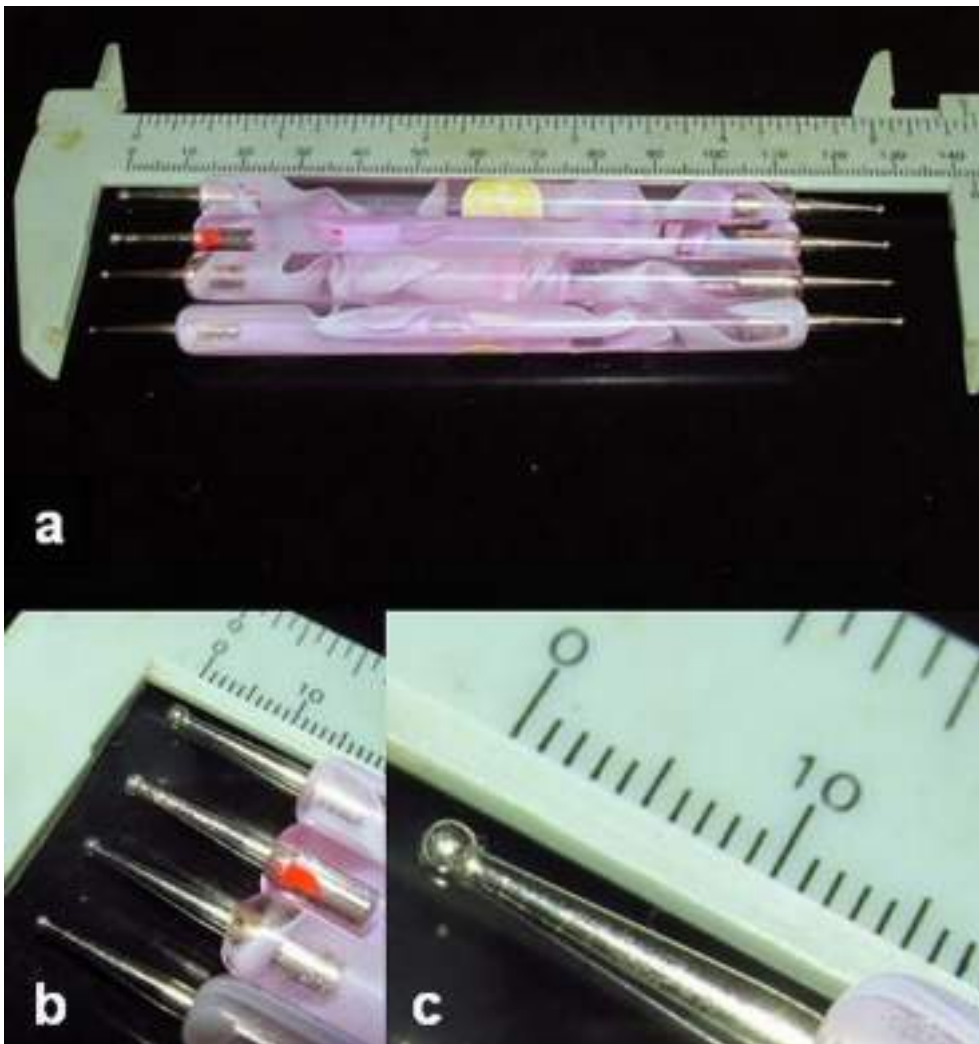
El lavaje estomacal (stomach flushing): es una técnica ampliamente difundida y, en la actualidad, recomendada para la extracción de presas ingeridas ya que permite obtener contenidos y conocer la cantidad exacta de estómagos llenos de la muestra total, evitando así el sacrificio de un alto número de individuos innecesariamente. El protocolo recomendado con la descripción detallada de la técnica es el propuesto por Solé et al.<sup>(88)</sup>. Se utiliza una pinza para abrir la boca del ejemplar a estudiar a los fines de introducir una sonda plástica (tipo vesical) conectada a una jeringa previamente cargada con agua mineral, o de la misma laguna según corresponda. Las sondas de diferentes medidas, de acuerdo al tamaño del animal, se pueden adquirir en ortopedias, científicas y comercios del rubro de insumos hospitalarios. Una vez terminado este paso, se introduce la cánula por la boca con mucho cuidado, sin lastimar el animal, hasta llegar al estómago. Lentamente se incorpora el agua, preferentemente con el ejemplar boca abajo, y se espera a que el bolo alimenticio salga despedido. Luego se colectará, fijará (formalina 10% o alcohol 70%) y rotulará el material gastrointestinal obtenido.

**4.5.2.1.1b Consejos prácticos a considerar para reducir los riesgos del lavado estomacal en ejemplares anuros metamórficos, juveniles, subadultos y adultos:** Es necesario remarcar que la técnica del lavado estomacal es sencilla, económica, y muy segura para los ejemplares examinados; siempre y cuando sea practicada por personas entrenadas, y con las herramientas adecuadas. No obstante, es fundamental maximizar los cuidados con individuos de pequeño tamaño, como ser metamórficos y juveniles de todas las especies, y subadultos y adultos de especies de pequeño porte.

Las siguientes sugerencias se basan en la realización de lavado estomacal a más de 3000 ejemplares anuros de más de veinte especies y de todos

los estadios de desarrollo. Tanto de pequeño porte (*Pseudopaludicola* spp.; *Elachistocleis* spp.; *Physalaemus* spp.) como de gran tamaño (*Rhinella dipitycha*; *Leptodactylus luctator*; *Leptodactylus laticeps*) (Schaefer y Duré, obs. pers.).

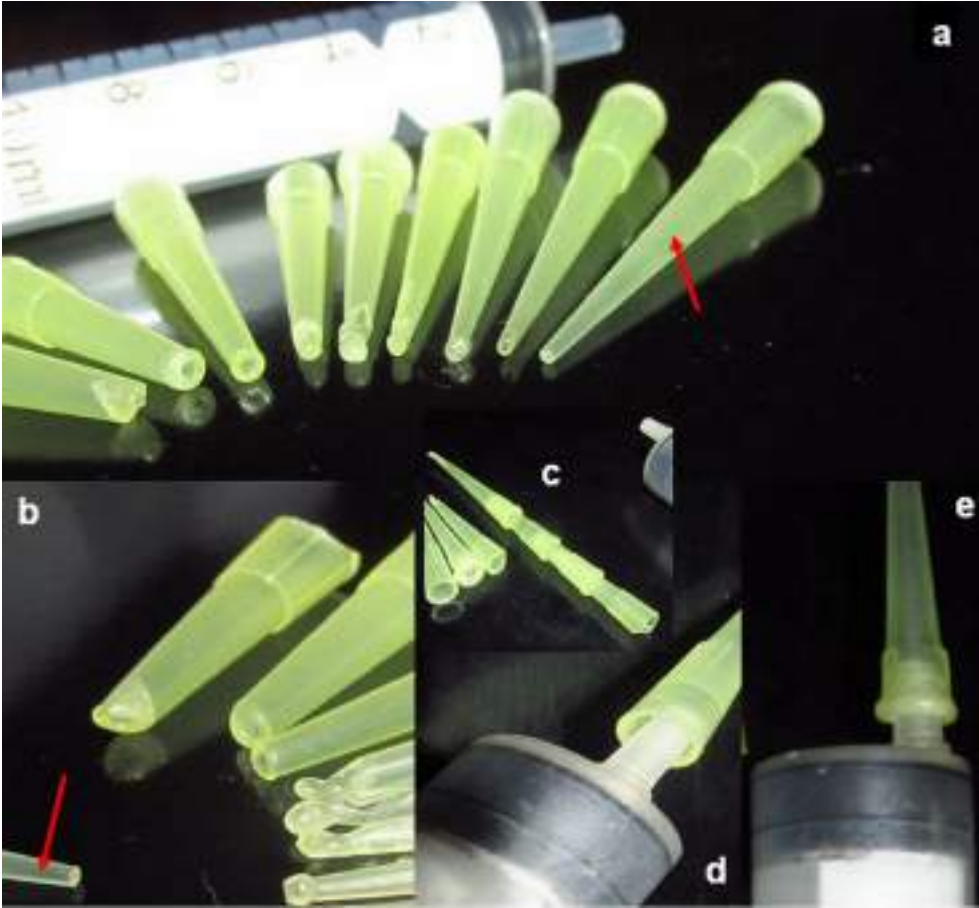
- Utilizar **bolillos metálicos pequeños**, como fórceps, para facilitar la apertura de la boca en lugar de pinzas. Son herramientas rígidas de punta esférica, que permiten efectuar presión en la comisura bucal de anuros, forzando la apertura de la boca, sin causar lesiones. Se consiguen en artísticas, algunas ferreterías y estéticas (**Figura 4.5.1a,b,c**).
- Es necesario resaltar, que en la mayoría de las especies de pequeño y mediano porte, la boca se puede abrir simplemente con la ayuda de la punta de la cánula ya encastrada en la jeringa. Sin embargo, en



**Figura 4.5.1.** a- Bolillos metálicos con diferentes puntas esféricas; b-c- Detalle de las puntas. Foto: E. Schaefer.

casos de especies grandes, capaces de morder con mucha fuerza (*Rhinella diptycha*; *Leptodactylus luctator*; *Leptodactylus laticeps*; *Lepidobatrachus* spp.; *Ceratophrys* spp.), será necesario que otro operario facilite la apertura de la boca con ayuda de un bolillo hasta que el encargado de realizar el lavado estomacal inserte la cánula adecuadamente.

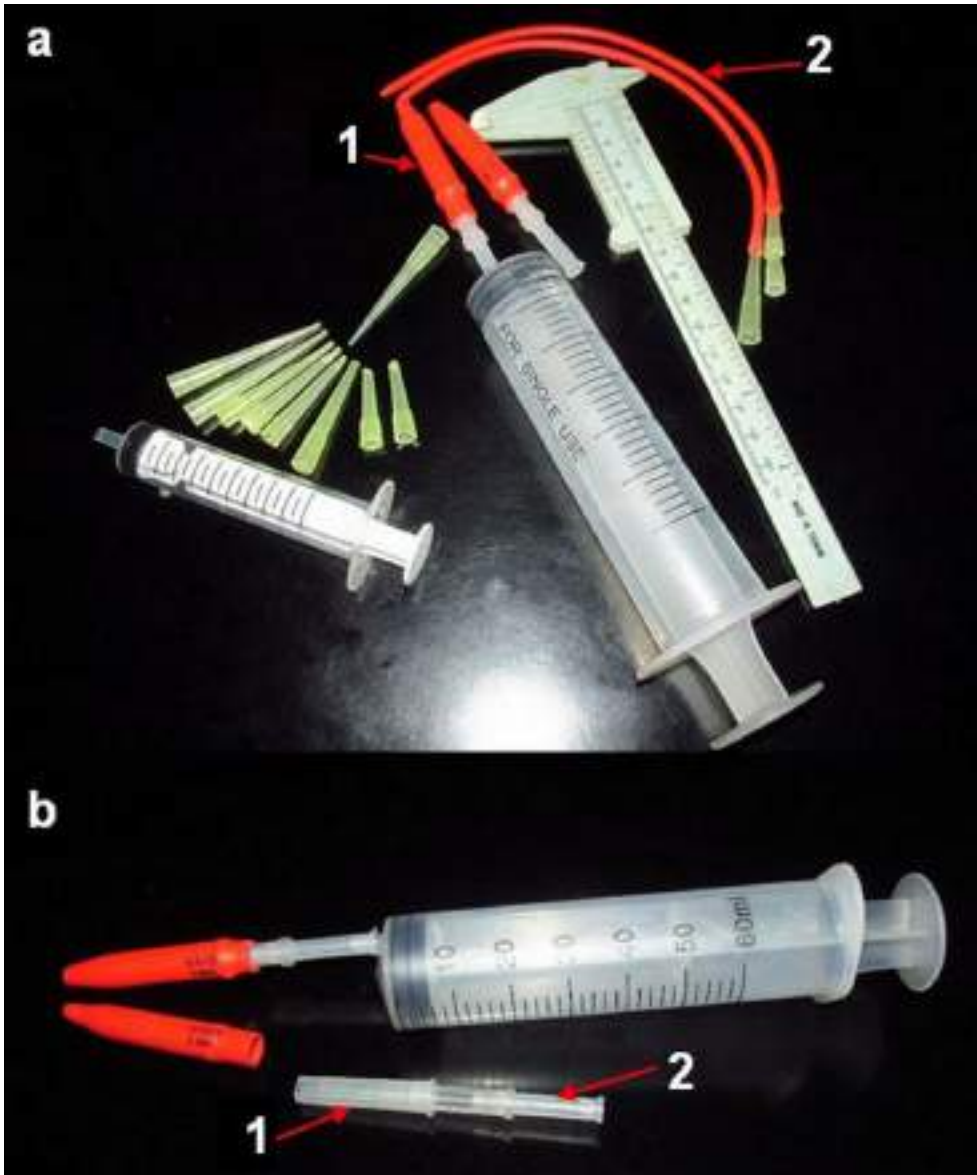
- Utilizar tips o puntas de micropipetas automáticas como cánula para realizar el “flushing”, especialmente a individuos pequeños. Las mismas se pueden acoplar a jeringas descartables. Es fundamental **Quitar el filo** de la punta de los tips usando fuego hasta lograr que la punta quede redondeada y suave. De no hacerlo, el filo del tip en su formato original es extremadamente peligroso debido a que las probabilidades de perforar el tubo digestivo del ejemplar analizado son muy altas. Este procedimiento transforma el tip en una cánula de punta esférica (**Figura 4.5.2a,b**). Otra ventaja importante de usar tips previamente desafilados es, aparte de ser una opción muy económica, que pueden acoplarse unas sobre otras para lograr la longitud deseada (**Figura 4.5.2c**). La exposición al fuego debe realizarse durante un segundo o menos, hasta lograr la punta adecuada sin obstruir el orificio. Se puede soplar desde el extremo opuesto para que el flujo de aire impida que el plástico reblandecido cierre por completo el orificio de salida. En general, el orificio de entrada de los tips tiene un diámetro demasiado grande para acoplarse ajustado al extremo de salida (pivote) de las jeringas descartables comunes, ese problema se soluciona cortando aproximadamente 5mm de la base de los tips, con la finalidad de disminuir su diámetro, logrando así un acople perfecto (**Figura 4.5.2d,e**). Es importante remarcar, que los tips son útiles en anuros pequeños (*Pseudopaludicola* spp., *Physalaemus* spp., *Adenomera* spp., *Leptodactylus latinasus*, *Elachistocleis* spp., y otros de porte similar). Para anuros de mayor tamaño, debido a que el volumen del tubo digestivo es mucho mayor, deben usarse cánulas que permitan un flujo de agua suficientemente abundante como para estimular la regurgitación.
- Para realizar lavados estomacales de anuros de gran tamaño (*Rhinella diptycha*; *Leptodactylus luctator*; *Leptodactylus laticeps*, otros) se recomienda usar el extremo posterior de una sonda NELATON® de goma roja. El ensamble con el orificio de salida de la jeringa (pivote) deberá adaptarse mediante tubos de diámetro variable encastrables entre sí. En la **Figura 4.5.3a,b** se observan encastres hechos con capuchones de agujas hipodérmicas y un tubo Eppendorf perforado. Para este tipo de anuros deberán usarse jeringas de 60 ml, o de ma-



**Figura 4.5.2.** a- Tips para micropipetas con puntas modificadas por calor (la flecha marca el tip original sin modificaciones); b- Detalles de las puntas modificadas comparadas con la punta original (flecha); c- Tips modificados y encastrados formando una cánula única de mayor longitud; d- Tip original sin modificar la base no encastra adecuadamente en el pivote de la jeringa y e- Tip con base cortada y diámetro modificado con calor encastrando adecuadamente en la jeringa. Foto: E. Schaefer.

por volumen, a los fines de que la descarga de agua sea suficiente para estimular la regurgitación. En algunos casos será necesario descargar más de una jeringa completa.

- Independientemente del tamaño del ejemplar a analizar, una vez colocada la cánula en la boca, el individuo estudiado deberá ubicarse boca abajo y, sin presionar excesivamente, dejar que el peso del animal facilite la lenta inserción de la cánula dentro del tubo digestivo. De ser necesario, el operario podrá ejercer un mínimo empuje en dirección a la cánula a medida que va descargando agua. La aplicación del líquido deberá realizarse de manera continua pero sin exceso de fuerza. El objetivo es llenar el estómago de agua sin dañarlo. Durante este procedimiento, el animal debe ser sostenido boca abajo, siempre sujetado por la mano menos hábil del operario, mientras que la jeringa con la cánula es sostenida y accionada con su mano hábil. La sugerencia de mantener al ejemplar estudiado boca abajo se debe a que la fuerza de gravedad facilita el proceso de regurgitación del bolo alimenticio.



**Figura 4.5.3.** a- Equipo básico de cánulas para anuros de pequeño, mediano y gran porte; (1-extremo posterior de sonda Nelaton con encastrés; 2- Extremo anterior de sonda Nelaton®; b- Extremo posterior de sonda Nelaton adaptado a jeringa de 60 ml para flushing a especies de tamaño grande (1- Capuchón de aguja hipodérmica; 2-Eppendorf perforado). Foto: E. Schaefer.

#### 4.5.2.2 Identificación y medición de las presas

##### 4.5.2.2a -Larvas

Cada ítem debe ser identificado con la mayor precisión taxonómica posible, y ser cuantificado de acuerdo con la técnica descrita por Hill et al.<sup>(89)</sup>. En el caso de las algas, se pueden utilizar portaobjetos o cámaras de sedimentación, donde se colocarán las muestras de las alícuotas obtenidas y se analizarán bajo un microscopio óptico o invertido, según corresponda, normalmente a un aumento de 400x. El cálculo de la densidad de algas puede hacerse siguiendo a Villafañe y Reid<sup>(90)</sup>. La técnica de contar (e identificar) al menos

un centenar de taxa dominantes o ítems tróficos<sup>(91)</sup>, permitirá obtener también la frecuencia relativa de cada especie/ítem consumido. La identificación de presas animales se realizará con la muestra de la alícuota colocada en portaobjetos o cámara de sedimentación, para proceder a su identificación y recuento bajo microscopio / lupa, normalmente con un aumento de 200x. En el caso del contenido animal, se recomienda la identificación de todos los ejemplares presentes en la muestra (todos los presentes en el cubreobjeto).

La identificación de los ítems debe basarse en bibliografía especializada de la región donde se lleve a cabo el estudio<sup>(92,93)</sup>. El análisis de los contenidos se puede analizar desde un enfoque taxonómico<sup>(37)</sup> o funcional<sup>(30)</sup>. En el segundo caso se puede utilizar las agrupaciones de base ecomorfológicas que realizaron Kruk et al.<sup>(94)</sup> para algas del fitoplancton (especies que se encuentran libres en la columna de agua). Sin embargo, estos grupos pueden ser adaptados también para algas perifíticas y fitobentónicas (especies adheridas a un sustrato como planta o que se encuentran en el fondo del cuerpo de agua). Por ejemplo: GF1: algas pequeñas (134  $\mu\text{m}^2$ ); GF2: algas con sílice y flagelo; GF3: algas filamentosas; GF4: algas medianas (791  $\mu\text{m}^2$ ); GF5: algas unicelulares flageladas; GF6: algas no flageladas con exoesqueletos silíceo; GF7: algas grandes coloniales con mucílago (3062  $\mu\text{m}^2$ ). De esta forma, una vez definidas las categorías taxonómicas o grupo funcional con las que se trabajará, se estimará la abundancia relativa o densidad de las mismas en el tracto de cada larva, la frecuencia de ocurrencia del ítem alimenticio en la población de larvas y el volumen de cada taxa. Para la estimación del volumen, bajo el microscopio se deben registrar las dimensiones medias de al menos, 30 especímenes por ítem considerado, para poder realizar su estimación a través de la forma geométrica que mejor representa la forma del cuerpo del taxa (formas celulares en el caso de las algas)<sup>(95)</sup>.

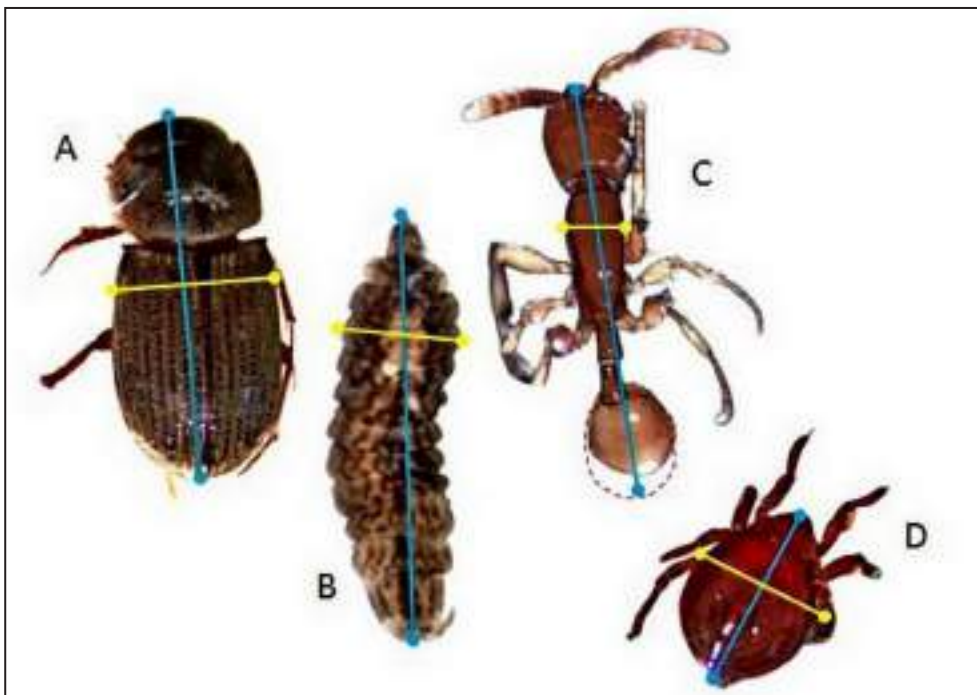
#### **4.5.2.2b -Adultos**

El contenido del estómago, intestino o ambos (contenido gastrointestinal) será colocado en una caja de Petri con un poco de agua y luego se irán separando las presas por grupo y tamaño. Cada una de ellas será identificada taxonómicamente hasta la resolución propuesta por el investigador, en función de los objetivos del trabajo. Debido a la diversidad de grupos que normalmente conforman la dieta de los anfibios (insectos, colémbolos y otros hexápodos, miriápodos, arácnidos, crustáceos, vertebrados, etc.), para su identificación deben utilizarse guías y claves taxonómicas de cada grupo y región estudiada. Por lo general, la mayor parte de los estudios clasifican los ítems alimentarios a nivel de Orden o Familia, siendo menos frecuentes

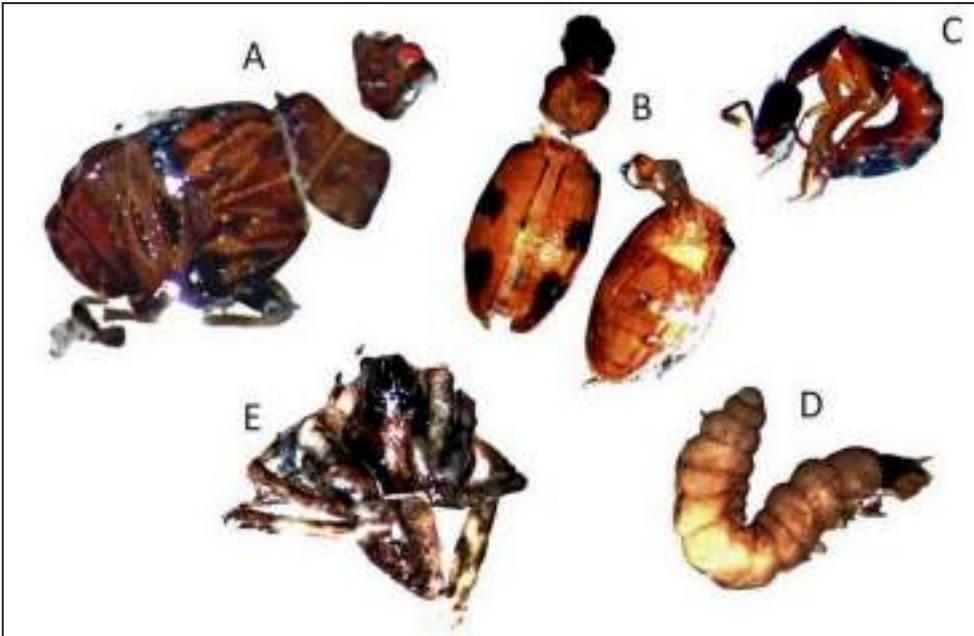


aquellos que logran determinar cada una a nivel de género o especie. Esto se debe a que, si bien los anuros ingieren sus presas enteras (**Figura 4.5.4a-d**), en muchas oportunidades se pierden estructuras clave para su correcta identificación durante el proceso de deglución y digestión (**Figura 4.5.5a,d**). Teniendo en cuenta posteriores correlaciones entre tipo de presas y tamaño del anfibio, algunos estudios incluyen la identificación de ítems alimentarios cuyo cuerpo presente más del 70% del cuerpo sin digerir, esto a los efectos de evitar sub o sobreestimaciones de aportes volumétricos y numéricos de cada uno de ellos y su correspondiente relación, errónea, con variables morfológicas del depredador. Otros, deciden identificar la mayor cantidad de presas posibles, para ello se sirven de la reconstrucción de ítems parcialmente digeridos (**Figura 4.5.5a.b**), o piezas clave para cada grupo (élitros, patas, alas, etc.) en base a ejemplares similares hallados completos en ese u otros contenidos estomacales.

Una metodología empleada para efectuar una estimación del tamaño de las presas parcialmente digeridas, es la de cotejar los restos encontrados en los tractos digestivos con presas completas colectadas mediante relevamientos de oferta alimentaria, en el mismo microhábitat en que se capturaron los anuros. De esta forma, en muchas ocasiones, pueden usarse las medidas (largo, ancho o volumen) de las presas colectadas como oferta trófica para inferir el tamaño de las encontradas en la dieta. En todo caso, siempre debe tenerse especial cuidado, principalmente en aquellos anuros generalistas en



**Figura 4.5.4. A-D:** Medición de largo (línea azul) y ancho (línea amarilla) de los ítems presa con diferentes tamaños y proporciones corporales. **C:** en línea punteada roja se muestra la estimación de la longitud real del cuerpo al acondicionar aquellos ejemplares recuperados en posiciones corporales que dificultan su medición. Foto: M. Duré.



**Figura 4.5.5.** Detalle de reconstrucción (A,B) y ejemplos de dificultad de medición por posturas corporales complejas (C-E) de los ítems presa recuperados de contenidos estomacales de anuros. Foto: M. Duré.

su alimentación, que presentan una alta diversidad de ítems alimentarios lo que complejiza su correcta identificación y cotejo con presas fragmentadas. Cuando el anfibio es especialista en algún tipo de presas, como hormigas o termitas, contar con la oferta trófica puede resultar de utilidad para reconstruir los fragmentos desarticulados de los tractos digestivos y asignar medidas de tamaño a esas presas ingeridas. Como se mencionó anteriormente, debe considerarse que al utilizar esta metodología se puede incurrir en una sobre estimación del volumen presente en un tracto digestivo, ya que en los mismos buena parte de las presas ya han sido digeridas o bien eliminadas (defecado), por lo que se desaconseja implementarlo si el objetivo del trabajo es establecer relaciones entre volumen por ítem o total por estómago con respecto al tamaño de los anuros.

La identificación de las presas se realizará bajo lupa estereoscópica y, en algunos casos, para presas muy pequeñas o para el reconocimiento de ciertas estructuras de valor taxonómico de las presas se utilizará microscopio óptico. Es importante limpiar bien cada ítem alimentario antes de proceder a su identificación y medición. Para algunas presas será necesario, además, realizar un trabajo meticuloso que incluye acomodar, desenvolver o reconstruir el cuerpo (**Figura 4.5.5a-e**) antes de su identificación. Para ello puede servirse de agua, pinceles, pinzas y agujas histológicas. Algunos ítems son recuperados en posiciones difíciles de medir (**Figura 4.5.5c-e**), por lo que se deberán tener especial cuidado al tomar su longitud y ancho (**Figura 4.5.4c**), unificando este procedimiento para todas las presas. Una vez identificadas y medidas, se volcará toda la información en planillas y el contenido de esto-

macal de cada ejemplar será acondicionado, fijado en alcohol 70% y guardado nuevamente en tubos eppendorf o recipientes adecuados a su volumen. Es fundamental que sean cuidadosamente rotulados con información básica como: especie, número de ejemplar/colecta, fecha y sitio de captura.

Para la obtención del largo y ancho de cada presa, se recomienda el uso de un calibre digital o escalas de medición incorporadas en oculares. Estas medidas se obtendrán sin considerar antenas, apéndices ni ornamentaciones<sup>(4,96)</sup>. En muchos estudios consideran el ancho máximo del cuerpo, lo que podría influir luego en una sobrestimación del volumen en aquellas presas que presentan formas triangulares o con abdómenes y tórax con marcada diferencia de tamaño. Por lo que se recomienda que, en esos casos, el investigador seleccione la porción del cuerpo cuyo ancho sea el más representativo en todo el ejemplar. Con la información de largo y ancho del cuerpo se calculará luego el volumen ( $\text{mm}^3$ ) por individuo con ayuda de fórmulas como la del esferoide/elipsoide (descrita en la **Parte II** de este Manual).

El desplazamiento de un líquido (agua) en una probeta es otra alternativa. Éste método puede ser desventajoso cuando se presentan presas pequeñas o estructuras (élitros) debido a la dificultad de romper la tensión superficial del agua, lo que resulta en una subestimación del volumen. En esos casos, una alternativa factible es agrupar todas las presas de cada taxón y estimar así el volumen total, luego dividirlo por el número de ejemplares sumergidos, y obtener de esta manera el volumen individual promedio para cada ítem presa.

Al determinar las presas sistemáticamente (tipo de presa/ítem alimentario), cuantitativamente (número y porcentaje numérico), morfométrica y volumétricamente (largo, ancho, volumen y su porcentaje) y establecer el número de tractos en los que aparece cada ítem sobre la muestra total analizada (frecuencia de ocurrencia) ya tendremos información fundamental para describir la estructura de la dieta. Un dato relevante a destacar es el número (o porcentaje) de tractos digestivos sin contenidos, ya que esta información, relacionada a la frecuencia de consumo de cada ítem presa, aportará luego información valiosa para establecer la estrategia empleada para la captura de las presas (forrajero activo o al acecho).

### **4.5.2.3 Estimación de la oferta de alimento**

#### **4.5.2.3a -Larvas**

Para el muestreo de la oferta trófica, deberán considerarse las diferentes comunidades acuáticas de las que obtienen su alimento: fitoplancton, perifiton, zooplancton, zoobentos y fitobentos, en réplicas por microhábitats.

Para asegurar su independencia, cada muestra debe ser tomada con cierta distancia una de otra (p.e. 5 m, siempre y cuando las dimensiones del cuerpo de agua lo permitan). Las muestras de fitoplancton pueden ser recolectadas con una botella Ruttner de 100 ml y luego fijadas con Lugol (disolución de yodo molecular I<sub>2</sub> y yoduro potásico KI en agua destilada) acidificado (1%). Las algas del perifiton pueden ser obtenidas de diferentes secciones sumergidas de las macrófitas más abundantes del sitio (tallos y hojas). Para ello, se procederá a cortar porciones de tallos y hojas sumergidas colonizadas por perifiton, las cuáles serán transportadas al laboratorio en bolsas con agua destilada. En el laboratorio, la comunidad perifítica será separada del sustrato mediante el raspado por medio de una hoja de afeitar sobre una bandeja colectora. Se traspasará el perifiton a un recipiente con tapa donde fue fijado con lugol acidificado<sup>(91)</sup>. Para la toma de muestras de zooplancton se podrá emplear un tubo muestreador rígido diseñado para ser utilizado en mesocosmos y en cuerpos de agua someros<sup>(97)</sup>, o cualquier recipiente para extraer agua de la columna. El agua (volumen conocido) deberá ser filtrada empleando una red de 55µm de abertura de malla, para la colecta del zooplancton. Las muestras pueden ser fijadas con formaldehído al 4% y teñidas con eritrosina. Para analizar la composición y abundancia del zoobentos se deben extraer muestras del sedimento; por ejemplo, con ayuda de un muestreador tubular o "Corer" de diámetro conocido. Las muestras serán filtradas con un tamiz de 200 µm de abertura de malla y fijadas en formaldehído al 10%. Los invertebrados deberán ser teñidos con eritrosina para una mejor observación y extraídos manualmente del sedimento bajo lupa (a 10x), para luego conservarlos en etanol al 70%. Por último, para analizar la composición y abundancia del fitobentos, pueden utilizarse dispositivos artificiales (p.e. baldosas cerámicas blancas lisa de 20 cm<sup>2</sup>), ubicadas sobre el fondo del cuerpo de agua donde se reproducen los anfibios, para su colonización. Los mismos deberán permanecer sumergidos al menos durante un mes. Luego se recolectarán y se analizarán en laboratorio las algas y otros organismos que colonizan el sustrato, refiriendo siempre las abundancias a la superficie analizada (p.e. ind/ml, ind/cm<sup>2</sup>) para poder estimar densidades y analizar<sup>(98)</sup>.

#### **4.5.2.3b -Adultos / postmetamorfos**

Para el muestreo de la oferta trófica, debe considerarse el microhábitat de forrajeo de la o las especies de anfibios bajo estudio. Cada técnica utilizada tiene ventajas y desventajas por lo que resulta complejo elegir un único método cuando se trabaja con ensambles de varias especies de anuros que se alimentan en distintos estratos o microhábitats. Entre las más utilizadas se encuentran las trampas de caída, redes, aplicación de insecticidas, redes

acuáticas<sup>(99)</sup>, trampas de luz o pegajosas. En cualquier caso, la/s técnica/s de muestreo de la oferta trófica utilizada/s, deben colectar de manera no selectiva (según su abundancia relativa en el microhábitat donde forrajea el anuro) todos los taxones identificados en la dieta de los anfibios. Por ejemplo, para especies “trepadoras” como los hílidos, que suelen alimentarse sobre la vegetación palustre, macrófitas o vegetación herbácea y arbustiva que rodea los cuerpos y cursos de agua, puede seleccionarse una metodología de recorrido de transectas barriendo con red entomológica sobre el microhábitat donde se capturaban los anfibios. Los muestreos con red entomológica pueden ser utilizados para obtener información cuali-cuantitativa para comparar comunidades de insectos<sup>(100,101)</sup>. Para que los datos sean representativos de la oferta trófica de las especies “trepadoras”, se puede avanzar a través de la transecta golpeando con el aro de la red la vegetación palustre y macrófitas donde sean colectados los anfibios, y describiendo con la misma una figura de ocho acostado. Los muestreos pueden realizarse durante un espacio temporal predeterminado de manera de estandarizar el esfuerzo. Esta metodología es ampliamente utilizada en los trabajos de ecología alimentaria de anfibios en los que se evalúa la selectividad trófica<sup>(8,13,15,16,56)</sup>. Para estimar la oferta de alimento de especies de anfibios que suelen alimentarse sobre el sustrato (ej. leptodactílidos, bufónidos, microhílidos, etc.) se deben muestrear las presas potenciales que deambulan por ese microhábitat. Un método sugerido para esta tarea es la utilización de trampas de caída<sup>(14,56,102,103)</sup>, donde se obtiene gran variedad de artrópodos edáficos o del mantillo y epi-edáficos o marchadores.

## Bibliografía

1. Stebbins, R.C. & Cohen, N.W. 1995. A Natural History of Amphibians. Princeton University Press, New Jersey.
2. Toft, C.A. 1980. Feeding ecology of thirteen syntopic anurans in a seasonal tropical environment. *Oecologia* 45: 131-141.
3. Flowers, M.A. & Graves B.M. 1995. Prey selectivity and size-specific diet changes in *Bufo cognatus* and *B. woodhousii* during early postmetamorphic ontogeny. *Journal of Herpetology* 29: 608-612.
4. Parmelee, J.R. 1999. Trophic ecology of a tropical anuran assemblage. *Scientific papers, Natural History Museum, The University of Kansas* 11: 1-59.
5. Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2002. Preliminary studies of food habits of *Lysapsus limellus* (Anura, Pseudidae) in lentic environments of Parana river, Argentina. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* 101: 53-58.
6. Attademo, A.M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R. 2005. Amphibians occurring in soybean and implications for biological control in Argentina. *Agriculture, Environment and Ecosystems* 106: 389-394.
7. Peltzer, P.M.; Attademo, A.M.; Lajmanovich, R.C.; Junges, C.M.; Beltzer, A.H. & Sanchez, L.C. 2010. Trophic dynamics of three sympatric anuran species in soybean agroecosystem from Santa Fe Province, Argentina. *Herpetological Journal* 20: 261-269.
8. López J.A.; Scarabotti, P.A. & Ghirardi, R. 2015. Amphibian trophic ecology in increasingly

- human-altered wetlands. *Herpetological Conservation and Biology* 10: 819-832.
9. Basso, N. 1990. Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuros. *Cuadernos de Herpetología*. Series Monográficas N° 1.
  10. Lajmanovich, R.C. 1996. Dinámica trófica de juveniles de *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia: Anura), en una isla del Paraná, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 10: 11-23.
  11. Hirai, T. & Matsui, M. 1999. Feeding Habits of the pond frog, *Rana nigromaculata*, inhabiting rice field in Kyoto Japan. *Copeia* 1999: 940-947.
  12. Hirai, T. & Matsui, M. 2000. Ant specialization in diet of the narrowmouthed toad, *Microhyla ornata*, from Amamioshima Island of the Ryukyu Archipelago. *Current Herpetology* 19: 27-34.
  13. Hirai, T. & Matsui, M. 2000. Myrmecophagy in a Ranid Frog *Rana rugosa*: Specialization or weak avoidance to ant eating? *Zoological Science* 17: 459-466.
  14. Hirai, T. & Matsui, M. 2000. Feeding habits of the Japanese Tree Frog, *Hyla japonica*, in the reproductive season. *Zoological Science* 17: 977-982.
  15. Hirai, T. & Matsui, M. 2001. Food habits of an endangered Japanese frog, *Rana porosa brevipedata*. *Ecological Research* 16: 737-743.
  16. Hirai T. & Matsui M. 2001. Food partitioning between two syntopic ranid frogs, *Rana nigromaculata* and *R. rugosa*. *Herpetological Journal* 11: 109-115.
  17. Kupfer, A.; Nabhitabhata, J. & Himstedt, W. 2005. From water into soil: trophic ecology of a caecilian amphibian (Genus *Ichthyophis*). *Acta Oecologica* 28: 95-105.
  18. López, J.A.; Scarabotti, P.A.; Medrano, M.C. & Ghirardi, R. 2009. Is red spotted green frog (*Hypsiboas punctatus*, Anura: Hylidae) selecting its preys? Prey availability importance when analyzing trophic selectivity. *Revista de Biología Tropical* 57: 847-857.
  19. Lima, P.A. 1998. The effects of size on the diets of six sympatric species of post metamorphic litter anurans in central Amazonia. *Journal of Herpetology* 32: 392-399.
  20. Lima, A.P. & Magnusson, W.E. 1998. Partitioning seasonal time: interactions among size, foraging activity and diet in leaf-litter frogs. *Oecologia* 116: 259-266.
  21. Hirai, T. 2002. Ontogenetic change in the diet of the pond frog, *Rana nigromaculata*. *Ecological Research* 17: 639-644.
  22. Daly, J.W.; Garraffo, H.M.; Spande, T.F.; Yeh, H.J.; Peltzer, P.M.; Cacivio, P.; Baldo, J.D. & Faivovich, J. 2008. Indolizidine 239Q and Quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). *Toxicon* 52: 858-870.
  23. Vaira, M.; Akmentins, M.S. & Lavilla, E.O. (eds.). 2018. Plan de Acción para la conservación de los Anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 32 (supl. 1): 1-56.
  24. Lajmanovich, R.C. 1997. Alimentación de larvas de anuros en ambientes temporales del sistema del río Paraná, Argentina. *Doñana Acta Vertebrata*, 24: 191-202.
  25. Lajmanovich, R.C. 2000. Interpretación ecológica de una comunidad larvaria de anfibios anuros. *Interciencia* 25: 71-79.
  26. Echeverría, D.D. & Conforti, V. 2000. Euglenoids living in the intestines of microhylid tadpoles of Argentina. *Alytes* 18: 81-89.
  27. Arias, M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2002. Diet of the giant tadpole *Pseudis paradoxa platensis* (Anura, Pseudidae). *Phyllomedusa, Journal of Neotropical Herpetology* 1: 97-100.
  28. Vera Candiotti, F.; Lavilla, E. & Echeverría, D. 2004. Feeding mechanisms in two treefrogs, *Hyla nana* and *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae). *Journal of Morphology* 26: 206-224.
  29. Vera Candiotti, F. 2005. Morphology and feeding in tadpoles of *Ceratophrys cranwelli* (Anura: Leptodactylidae). *Acta Zoologica* 86: 1-11.
  30. Antoniazzi, A.E.; López, J.A.; Lorenzón, R.E.; Saigo, M.; Devercelli, M.; Maneyro, R. & Marchese, M. 2020. Trophic ecology of tadpoles in floodplain wetlands: combining gut contents, selectivity and stable isotopes to study feeding segregation of syntopic species. *Hydrobiologia* 847: 3013-3024.
  31. Lajmanovich, R.C. 1994. Contribución al conocimiento de la alimentación de larvas de la rana criolla *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Leptodactylidae) en el Paraná medio, Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 29: 55-61.
  32. Lajmanovich, R.C. & Faivovich, J. 1998. Dieta larval de larvas de *Phyllomedusa tetraploidea* Pombal & Haddad, 1992 en la provincia de Misiones, Argentina. *Alytes* 15: 7-14.
  33. Echeverría, D.D.; Volpedo, A.V. & Mascitti, V.I. 2007. Diet of tadpoles from a pond in Iguazú National Park. *Gayana* 71: 8-14.

34. Vera Candioti, F. 2007. Anatomy of anuran tadpoles from lentic water bodies: systematic relevance and correlation with feeding habits. *Zootaxa* 1600: 1-175.
35. Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Book Company, New York.
36. Díaz-Paniagua, C. 1985. Larval diets related to morphological characters of five anuran species in the biological reserve of Doñana (Huelva, Spain). *Amphibia-Reptilia* 6: 307-322.
37. Rossa-Feres, D.C.; Jim, J. & Fonseca, M.G. 2004. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). *Revista Brasileira de Zoologia* 21: 745-754.
38. Dutra, S.L. & Callisto, M. 2005. Macroinvertebrates as tadpole food: importance and body size relationships. *Revista Brasileira de Zoologia* 22: 923-927.
39. Inger, R.F. 1986. Diet of tadpoles living in a Bornean rain forest. *Alytes* 5: 153-164.
40. Kupferberg, S.J.; Marks, J.C. & Power, M.E. 1994. Effects of variation in natural algal and detrital diets on larval anuran (*Hyla regilla*) life history traits. *Copeia* 1994: 446-457.
41. Kupferberg, S.J. 1997. Facilitation of periphyton production by tadpole grazing: functional differences between species. *Freshwater Biology* 37: 427-439.
42. Schiesari, L.; Werner, E.E. & Kling, G.W. 2009. Carnivory and resource-based niche differentiation in anuran larvae: implications for food web and experimental ecology. *Freshwater Biology* 54: 572-586.
43. Asrafuzzaman, S.; Mahapatra, S.; Rut, J. & Sahoo, G. 2018. Dietary assessment of five species of anuran tadpoles from northern Odisha, India. *Journal of Threatened Taxa* 10: 12382-12388.
44. Dalu, T.; Weyl, O.L.F.; Froneman, P.W. & Wasserman, R.J. 2015. Trophic interactions in an austral temperate ephemeral pond inferred using stable isotope analysis. *Hydrobiologia* 768: 81-94.
45. Schalk, C.M.; Montaña, C.G.; Winemiller, K.O. & Fitzgerald, L.A. 2017. Trophic plasticity, environmental gradients and food-web structure of tropical pond communities. *Freshwater Biology* 62: 519-529.
46. Vera Candioti, F. 2006. Ecomorphological guilds in anuran larvae: an application of geometric morphometric methods. *Herpetological Journal* 16: 149-162.
47. Haad, M.B.; Vera Candioti, F. & Baldo, D. 2011. Shape variation in lentic and lotic tadpoles of *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 46: 91-99.
48. Toft, C.A. 1981. Feeding ecology of Panamanian Litter Anurans: Patterns in diet and foraging mode. *Journal of Herpetology* 15: 139-144.
49. Toft, C.A. 1985. Resource partitioning in amphibians and reptiles. *Copeia* 1985: 1-21.
50. Toft, C.A. 1995. Evolution of diet specialization in poison dart frogs (Dendrobatidae). *Herpetologica* 5: 202-216.
51. Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2000. Dieta de *Hyla nana* (Anura: Hylidae) en charcas temporarias del Río Paraná, Argentina. *Boletín de la Asociación Española de Herpetología* 11: 71-73.
52. Duré, M.I. & Kehr, A.I. 2004. Influence of microhábitat on the trophic ecology of two leptodactylids from northeastern Argentina. *Herpetologica* 60: 295-303.
53. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C. & Cacivio, P.M. 2000. Food habits of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Anura, Hylidae) in temporary ponds of Chaco, Argentina. *Bulletin de la Société Herpétologique de France* 93: 5-11.
54. Duré, M.I.; Schaefer, E.F.; Hamann, M.I. & Kehr, A.I. 2004. Consideraciones ecológicas sobre la dieta, reproducción y el parasitismo de *Pseudopaludicola boliviana* (Anura: Leptodactylidae) de Corrientes, Argentina. *Phyllomedusa* 3: 121-131.
55. Duré, M.I.; Kehr, A.I. & Schaefer, E.F. 2009. Niche overlap and resource partitioning among five sympatric bufonids from northeastern Argentina. *Phyllomedusa* 8: 27-39.
56. Attademo, M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2007. Feeding habits of *Physalaemus biligonigerus* (Anura, Leptodactylidae) from soybean field of Córdoba Province, Argentina. *Russian Journal of Herpetology* 14: 1-6.
57. Attademo, A.M.; Cejas, W.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich R.C. 2007. Phenology in diet of *Chaunus arenarum* (Anura: Bufonidae) in a soybean field of Córdoba province, Argentina. *Revista Española de Herpetología* 21: 41-48.
58. López, J.A.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2002. *Hyla punctata* (NCN). Diet. *Herpetological Review* 33: 125-126.

59. López, J.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich R. 2005. Dieta y solapamiento del subnicho trófico de nueve especies de leptodactílidos en el Parque General San Martín (Argentina). *Revista Española de Herpetología* 19: 19-31.
60. López J.A.; Arias, M.M.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2005. Dieta y variación morfométrica de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Leptodactylidae) en tres localidades del centro-este de Argentina. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 16: 32-39.
61. López, J.A.; Ghirardi, R.; Scarabotti, P.A. & Medrano, M.C. 2007. Feeding ecology of *Elachistocleis bicolor* (Anura, Microhylidae) in a riparian locality of Middle Paraná river. *Herpetological Journal* 17: 48-53.
62. Johnson, D.H. 1980. The comparison of usage and availability measurements for evaluating resource preference. *Ecology* 61: 65-71.
63. Lawlor, L.R. 1980. Overlap, similarity, and competition coefficients. *Ecology* 61: 245-251.
64. Basso, N. 1990. Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuros. Cuadernos de Herpetología. Series Monográficas N° 1.
65. Lajmanovich, R.C. 1994. Hábitos alimentarios de *Bufo paracnemis* (Amphibia Bufonidae) en el Paraná medio, Argentina. *Revue D'Hydrobiologie Tropicale* 27: 107-112.
66. Lajmanovich, R.C. 1995. Relaciones tróficas de bufónidos (Anura: Bufonidae) en ambientes del río Paraná, Argentina. *Alytes* 13: 87-103.
67. Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 1999. Análisis trófico de dos poblaciones de *Scinax nasicus* Cope, 1862 (Anura: Hylidae), Argentina. *Alytes* 16: 84-96.
68. Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2001. *Hyla raniceps* (NCN). Diet. *Herpetological Review* 32: 247-248.
69. López, J.; Peltzer, P. & Lajmanovich, P. 2004. *Physalaemus riograndensis* (NCN). Diet. *Herpetological Review* 34: 360.
70. Vera Candiotti, F. & Lajmanovich, R.C. 1998. Contribución al conocimiento de la alimentación de larvas de *Phyllomedusa hypochondrialis azurea* (Amphibia: Hylidae) en ambientes temporales de la provincia de Santa Fe, Argentina. *Boletín de la Sociedad Biológica de Concepción* 69: 87-93.
71. Do Prado, V.H.; Fonseca, M.G.; De Almeida, F.V.; Junior, O.N. & Rossa-Feres, D.D.C. 2009. Niche occupancy and the relative role of micro-habitat and diet in resource partitioning among pond dwelling tadpoles. *South American Journal of Herpetology* 4: 275-285.
72. Schriever, T.A. & Williams, D.D. 2013. Ontogenetic and individual diet variation in amphibian larvae across an environmental gradient. *Freshwater Biology* 58: 223-236.
73. Bionda, C.; Luque, E.; Gari, N.; Salas, N.; Lajmanovich, R. & Martino, A. 2013. Diet of tadpoles of *Physalaemus biligonigerus* (Leiuperidae) from agricultural ponds in the central region of Argentina. *Acta Herpetologica* 8: 141-146.
74. Shaffer, H.B.; Alford, R.A.; Woodward, B.D.; Richards, S.J.; Altig, R.G. & Gascon, C. 1994. Quantitative Sampling of Amphibian Larvae: 130-141. En: Heyer, R.W. et al., (eds.) *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution, Washington D.C.
75. Close, B.; Banister, K.; Baumans, V.; Bernoth, E.M.; Bromage, N.; Bunyan, J.; Erhardt, W.; Flecknell, P.; Gregory, N.; Hackbarth, H.; Morton, D. & Warwick, C. 1997. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory animals* 31: 1-32.
76. Santos, F.J.M.; Protazio, A.S.; Moura, C.W.N. & Junca, F.A. 2015. Diet and food resource partition among benthic tadpoles of three anuran species in Atlantic Forest tropical streams. *Journal of Freshwater Ecology* 31: 53-60.
77. Antoniazzi C.E. 2018. Larvas de anuros: posición trófica y efecto en la estructuración de las comunidades acuáticas de los humedales. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, de la Universidad Nacional de Córdoba.
78. Altig, R. & Johnston, G.F. 1989. Guilds of anuran larvae: Relationships among developmental modes, morphologies and habits. *Herpetological Monographs* 2: 81-109.
79. Torres-Ruiz, M.; Wehr, J.D. & Perrone, A.A. 2007. Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *Journal of the North American Benthological Society* 26: 509-522.
80. Caut, S.; Angulo, E.; Díaz-Paniagua, C. & Gomez-Mestre, I. 2013. Plastic changes in tadpole trophic ecology revealed by stable isotope analysis. *Oecologia* 173: 95-105.



81. Post, D.M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.
82. Fry, B. 2007. Stable Isotope Ecology. Springer Science & Business Media, New York.
83. Altig, R.; Whiles, M.R. & Taylor, C.L. 2007. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshwater Biology* 52: 386-395.
84. Lajmanovich, R.C.; Emiliani, F. & Peltzer, P.M. 2001. Bacterias coliformes y otras bacterias de interés sanitario en larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1887 (Anura, Bufonidae) en Santa Fe (Argentina). *Alytes* 18: 197-208.
85. Wang, X.; Bo, X.; Yao, Q.; Wu, M. & Wang, H. 2019. The effect of fluorine exposure on morphological indicators and intestinal microbial community in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Ecological Indicators* 98: 763-771.
86. Evariste, L.; Barret, M.; Mottier, A.; Mouchet, F.; Gauthier, L. & Pinelli, E. 2019. Gut microbiota of aquatic organisms: a key endpoint for ecotoxicological studies. *Environmental Pollution* 248: 989-999.
87. Xie, L.; Zhang, Y.; Gao, J. & Li, X., Wang, H. 2020. Nitrate exposure induces intestinal microbiota dysbiosis and metabolism disorder in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Environmental Pollution* 264: 114712.
88. Solé, M.; Beckham, O.; Pelz, B.; Kwet, A. & Wolf, E. 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.
89. Hill, B.H.; Stevenson, R.J.; Herlihy, A.T.; McCormick, F.H.; Kaufmann, P.R. & Johnson, C.B. 2000. Use of periphyton assemblage data as an index of biotic integrity. *Journal of the North American Benthological Society* 19: 50-67.
90. Villafañe, V.E. & Reid, F.M.H. 1995. Métodos de Microscopia para la Cuantificación del Fitoplancton: 169-185. *En: Alveal, K.; Ferrario, M.E.; Oliveira, E.C. & Sar, E. (eds.). Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Chile.*
91. Baffico, G.D. & Úbeda, C.A. 2006. Larval diet of the frog *Alsodes gargola* (Leptodactylidae: Telmatobinae) and some ecological considerations on its role in alpine and mountain aquatic environments in Patagonia. *Amphibia-Reptilia* 27: 161-168.
92. Lopretto, E.C. & Tell, G. 1995. Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio. Ediciones Sur. Argentina.
93. Bellinger, E.G. & Sigeo, D.C. 2010. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
94. Kruk, C.; Huszar, V.L.M.; Peeters, E.T.H. M.; Bonilla, S.; Costa, L.; Lurling, E.T.H. M.; Reynolds, C.S. & Scheffer, M. 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology* 55: 614-627.
95. Hillebrand, H.; Dürselen, C.D.; Kirschtel, D.; Pollinger, U. & Zohary, T. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403-424.
96. Magnusson, W.E.; Lima, A.P.; Alves Da Silva, W.; Carmozina, D.E. & Araujo, M. 2003. Use of geometric forms to estimate volume of invertebrates in ecological studies of dietary overlap. *Copeia* 2003: 13-19.
97. Paggi, A.C.; Fernández, H.R. & Domínguez, E. 2001. Diptera: Chironomidae: 167-193. *En: Hernández, H.R. & Domínguez, E. (eds.). Guía Para la Determinación de los Artrópodos Bentónicos Sudamericanos. Investigaciones de la UNT, Serie.*
98. Lajmanovich, R.C. & Fernández, V.C. 1995. Alimentación de larvas de *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia: Bufonidae) en ambientes del río Paraná, Argentina. *Boletín del Museo de Historia Natural de Chile* 45: 7-18.
99. Pianka, E.R. 1973. The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 53-74.
100. Hayward, K.J. 1971. Guía para el Entomólogo Principiante. Universidad Nacional de Tucumán. Fundación e Instituto Miguel Lillio, Tucumán.
101. Janzen, D.H. 1973. Sweet simples of tropical foliage insects: description of study sites, with data on species abundances and size distribution. *Ecology* 54: 658-708.
102. Bennett, D.P. & Humphries, D.A. 1978. Introducción a la Ecología de Campo. España.
103. Peña, L.E. 1998. Introducción al Estudio de los Insectos de Chile. Impresos Universitaria. Santiago de Chile.

## 4.6 ESTUDIOS EXPERIMENTALES

**Mariana Pueta<sup>1,2</sup>, Fabián G. Jara<sup>3</sup>, Marcelo F. Bonino<sup>1</sup> & M. Gabriela Perotti<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratorio de Ecología, Biología Evolutiva y Comportamiento de Herpetozoos, INIBIOMA (CONICET—UNComa), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Centro Regional Universitario Bariloche- Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina.*

<sup>2</sup> *Departamento de Biología General, (CRUB-UNComa), Centro Regional Universitario Bariloche-Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina.*

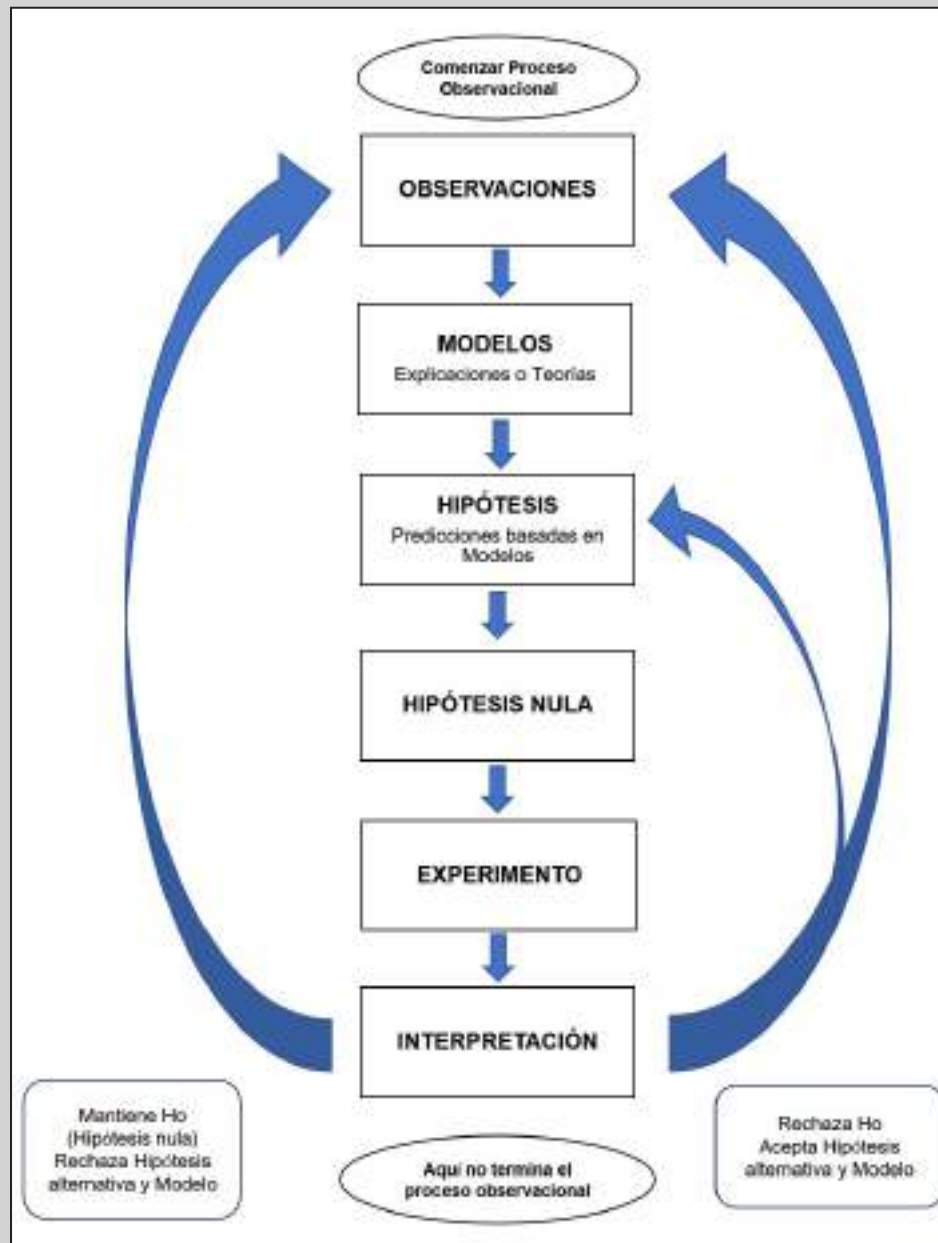
<sup>3</sup> *Grupo de Ecología de Macroinvertebrados Acuáticos, INIBIOMA (CONICET—UNComa), Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Centro Regional Universitario Bariloche- Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina.*

Las investigaciones en biología y ecología comienzan con la observación de ciertos patrones o fenómenos que despiertan curiosidad. Estas observaciones pueden variar en escala, desde escalas muy grandes y extensas (paisaje) a escalas muy locales (una comunidad); también, pueden ser de largo o de corto plazo. Si los patrones observados se relacionan con procesos naturales reales, pueden constituir entonces modelos que explican un fenómeno biológico observado. Dicho fenómeno podrá ser validado a través de experimentos siguiendo un diseño experimental (**Caja 4.6.1**)<sup>(1,2)</sup> (Ver también **Sección 2 Diseño de Muestreo** en este manual).

El diseño de experimentos rigurosos permite identificar relaciones causa y efecto y umbrales de respuesta mediante una cuidadosa manipulación de varios factores de interés, mientras se controlan otros factores que podrían confundir los resultados o la interpretación de los mismos<sup>(3,4)</sup>. En general, un experimento es un procedimiento utilizado para verificar, refutar o validar una o más hipótesis; normalmente, un experimento se puede ejecutar por uno o más de los siguientes motivos: (a) determinar las principales causas de variación en una variable respuesta medida, (b) identificar condiciones que dan lugar a una respuesta máxima o mínima, (c) comparar las respuestas obtenidas en diferentes escenarios de variables controlables, (d) obtener un modelo matemático/biológico para predecir respuestas futuras<sup>(5)</sup>.

En un contexto biológico, el término modelo a menudo se refiere a organismos o especies que sirven como una plataforma ampliamente utilizada para la investigación experimental. En anfibios, el enfoque experimental ha generado evidencias para una mejor comprensión de la fisiología, biología evolutiva, ecología y comportamiento de estos organismos. Además de su valor intrínseco como grupo de vertebrados, los anfibios se han destacado como modelo animal en la investigación biológica y biomédica, en áreas como la fisiología y la biología del desarrollo, principalmente. Un ejemplo de la importancia que han tenido los anfibios, como organismos empleados en el aporte de nuevo conocimiento a través de la experimentación biomédica, se observa a través de la contribución de varios premios Nobel en fisiología y medicina que han involucrado la experimentación con anfibios como animales de laboratorio, lo que ha aportado a innumerables tratamientos y terapias para humanos, así como grandes avances en la comprensión de los principios básicos de genética, fisiología, bioquímica y comportamiento animal<sup>(6)</sup>. También los anfibios son utilizados como modelo para abordar paradigmas fundamentales en ecología, por ejemplo, aspectos relacionados a competencia intra- e inter-específica, interacción depredador-presa, parasitismo, entre otros<sup>(7-10)</sup>. En las últimas décadas los anfibios han resultado ser modelos sumamente adecuados para el estudio de diferentes problemáticas tanto a

Caja 4.6.1 - Esquema generalizado de los componentes lógicos de un programa de investigación. Adaptado de Underwood<sup>(1)</sup>



escala global como regional, como el estudio de estresores antropogénicos tales como la pérdida de hábitat, la contaminación <sup>(11,12)</sup>, citando solo un par de ejemplos de Argentina), la introducción y/o translocación de especies que

pueden resultar invasoras (ejemplo en Argentina:<sup>13</sup>), las enfermedades emergentes (<sup>14</sup>; en Argentina<sup>15-17</sup>), y el cambio climático global<sup>(18-23)</sup>. También los anfibios han constituido un modelo de estudio en enfoques de biología evolutiva del desarrollo (“Evo-Devo”)<sup>(24)</sup> con abundantes estudios en Argentina como, variación y diversificación morfológica (e.g.<sup>25-28</sup>), desarrollo músculo-esqueleto (e.g.<sup>29</sup>).

La experimentación en biología debe incluir un diseño experimental adecuado y un uso apropiado de análisis estadísticos en un marco de prueba de hipótesis (<sup>30,31</sup>; ver también **Sección 2, Diseño de Investigación** de este Manual). Por lo general, luego de formulada la pregunta o hipótesis a testear, en un experimento se debe poder identificar factores o variables independientes (tratamientos o condiciones) que se vinculan con las causas que queremos estudiar y variables respuesta o dependientes (características o rasgos a medir en los individuos experimentales) que se relacionan con los efectos a estudiar. En términos generales, la limitación más importante sobre una correcta interpretación del resultado de un experimento se debe a la dificultad de diferenciar el efecto de un tratamiento del efecto de otros factores no controlados en el diseño, lo cual puede conducir a una confusión de diferencias entre tratamientos. El experimento más simple consiste en variar una sola condición (la variable independiente) y medir una o más variables respuesta, mientras se mantienen constantes todas las demás condiciones<sup>(31)</sup>. Los efectos de variar la condición (efecto del tratamiento) se evalúan por comparar la/las variables respuesta medidas para un grupo de sujetos (o unidades experimentales) que suele denominarse grupo de tratamiento o grupo experimental, con otro grupo de individuos (o unidades experimentales) denominados grupo control<sup>(3,31)</sup>. El control es de suma importancia en todo experimento y es uno de los puntos más importantes del enfoque experimental<sup>(3,30)</sup>. Idealmente, los sujetos o unidades experimentales deben ser asignados aleatoriamente a los grupos experimentales y al control y tratados de manera idéntica, excepto con respecto a la variable independiente en estudio<sup>(31)</sup>. Diseños con muchos tratamientos o factores combinados deben usarse con cuidado, especialmente porque en los estudios biológicos la interacción entre efectos es común y además porque resulta complicado luego analizar las interacciones entre los factores. En el caso de trabajar con más de un tipo de variable independiente o tratamiento, el diseño experimental debe ser lo suficientemente adecuado para poder establecer causas principales y/o interacciones de dichos tratamientos sobre la variable respuesta. En este sentido al aumentar el número de tratamientos se incrementarán los grupos experimentales y con ello será necesario incrementar el número de réplicas para poder obtener conclusiones valederas.

La mayoría de los estudios experimentales en anfibios se han realizado con estados embrionarios o larvales ya que son más fáciles de mantener en condiciones experimentales que los juveniles o adultos, asimismo esto puede depender mucho de cada especie o de la pregunta o hipótesis que se formula<sup>(32,33)</sup>. Los experimentos pueden realizarse puertas adentro ya sea en un área experimental de laboratorio o en incubadoras o cámaras tipo “Walk-in” (espacios completos adecuados con condiciones que puedan ser controladas, como temperatura, fotoperíodo), o pueden realizarse al aire libre. Al aire libre, pueden realizarse en ámbitos más “naturales”, ya sea en tanques y/o recipientes en los exteriores de un predio o laboratorio o en clausuras (mesocosmo) colocadas directamente en los humedales en el caso de estadios embrionarios y larvarios (ver **Figura 4.6.1**), o sitios terrestres habitados por juveniles y adultos de las especies bajo estudio. Un mesocosmo es un sistema experimental (clausura) al aire libre que examina el entorno natural en condiciones en las que pueden controlarse ciertas variables y puede definirse como un recinto experimental de entre 1 a varios miles de litros de capacidad<sup>(34,35)</sup>. En el caso de larvas de anfibios es aconsejable contar con recipientes relativamente pequeños (de entre 1 a 5 litros de capacidad). Para experimentos simulando sistemas acuáticos lénticos, los mesocosmos son una herramienta fundamental, especialmente si los experimentos son de mediano o largo plazo ya que permiten generar condiciones ambientales intermedias entre experimentos en microcosmos más pequeños y la mayor complejidad biológica de los sistemas naturales, en los que suelen no poder identificarse las relaciones mecanicistas<sup>(34,35)</sup>. Recipientes más pequeños y sin la complejidad ambiental de un mesocosmo acuático se utilizan en experimentos a corto plazo o para la evaluación de ciertas preguntas puntuales de experimentos más complejos. La experimentación con juveniles o adultos de anfibios es más compleja dado los requerimientos de mantenimiento para asegurar el bienestar de los animales. En general se utilizan terrarios con vegetación natural, humedad constante o una fuente de agua y provisión de alimento<sup>(36-40)</sup>. En muchos casos estos experimentos complementan estudios a campo, son de corta duración y es una gran ventaja la cercanía del lugar experimental y los sitios de colecta<sup>(37,40-42)</sup>. Mesocosmos terrestres para mantener anfibios en estadios post-metamórficos, juveniles o adultos se suelen utilizar en experimentos relacionados con temáticas de disturbios ambientales de origen antrópico, como contaminantes<sup>(20,34,43,44)</sup>, y también cuando se plantean preguntas teóricas relativas a estudios morfológico-funcionales, fisiológicos, por nombrar solo algunas temáticas de estudio (e.g.<sup>45</sup>).



**Figura 4.6.1.** Mesocosmos colocados en ambientes naturales (clausuras), en este caso empleados en estudios de interacciones tróficas que incluyen anfibios. Estas clausuras permiten el intercambio de agua con el exterior facilitando la alimentación de las larvas de anuros. Foto: F. Jara.

#### 4.6.1 Métodos, técnicas y protocolos previos y durante los ensayos experimentales

##### i) Consideraciones y protocolos para minimizar exposición y transmisión de patógenos. Uso y desinfección del material que se emplea en el campo

El trabajo de campo con anfibios en cualquiera de los estadios de desarrollo de su ciclo de vida implica, en general, tener contacto, ingreso y manipulación con ambientes acuáticos de distinto tipo, tanto lóticos como lénticos. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones y recomendaciones. Se desarrollan brevemente, a modo de recordatorio, ciertas pautas de cuidado, ya que este apartado también está desarrollado en la **Sección 4.10 Registro de hongos. Protocolos en campo y laboratorio** de este Manual.

- **Consideraciones generales**

Es importante tener en cuenta que resulta conveniente tener conjuntos o grupos de elementos y equipo de muestreo menor (redes-bateas-baldes, etc.) que posibiliten su utilización, indefectiblemente, SOLO en la localidad de estudio SIN INTERCAMBIO entre otras localidades.

En el caso que el equipo sea reutilizable y que no pueda ser replicado para su uso individual en distintos sitios, ya sea por su costo o por su tamaño (botas-Waders-aparatos multiparamétricos del tipo de registro de oxígeno disuelto, pH, conductividad, etc.), es imprescindible que se siga un protocolo de

desinfección cada vez que se termina con la visita a un sitio de estudio, para evitar translocación de organismos (e.g.: algas) o transmisión y dispersión de hongos, bacterias u otros patógenos.

- **Elementos de desinfección y tratamiento del material de muestreo empleado**

A continuación, se presentan una serie de pautas de cuidado y desinfección de los elementos y el material de muestreo (**Tabla 4.6.1**; ampliada de la **Sección 4.10, Registro de hongos. Protocolos en campo y laboratorio**); dichas pautas constituyen tanto elaboración de los autores de esta Sección por experiencias propias, como recopilación de información de otras publicaciones<sup>(46-48)</sup> y están enfocadas principalmente a minimizar la transmisión y dispersión de enfermedades presentes en especies de anuros de Argentina y la región como: quitridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*), ranavirus<sup>(15)</sup>, oomicetes<sup>(16,17,49-53)</sup>; y también considerando la dispersión de otros organismos considerados invasores, recientemente detectados, como el alga “Didymo” (*Didymosphenia geminata*), que ya está presente en diferentes cuerpos de agua de Argentina (e.g.: ambientes fluviales y lacustres a lo largo de la Patagonia Andina desde Neuquén a Tierra del Fuego)<sup>(48,54)</sup>.

De acuerdo a lo anteriormente presentado, resulta imperativo cumplir con dichas recomendaciones cuando se trabaja con anfibios, además constituye una responsabilidad promulgarlas en otros grupos de investigación cuyas tareas estén asociadas a muestreos y trabajo de campo en ambientes acuáticos lóticos o lénticos. A partir del trabajo conjunto con diferentes organismos nacionales, provinciales y municipales, se diseñó un protocolo que derivó en una resolución emitida por la Administración de Parques Nacionales, sobre la importancia de estas prácticas (Resolución Nro. 000774, 2010-**Apéndice 4.6.1**). También es importante tener en cuenta todas estas pautas cuando se trabaja entre áreas antropizadas y áreas prístinas. Por ejemplo, los ambientes acuáticos urbanos están muy impactados, muchos de los cuales reciben una gran variedad de sustancias químicas, bacterias, etc. que podrían ser transportadas a aquellos humedales más prístinos o ubicados en áreas protegidas o mejor conservadas.

## ii) Consideraciones sobre registro de datos ambientales y colecta de material biológico (adultos, larvas y huevos) en ambientes naturales

- **Consideraciones generales**

Para el estudio de anfibios en un contexto en el que se va a trabajar siguiendo un diseño experimental es necesario tener claro como primer paso, cual es la pregunta, objetivo o hipótesis a estudiar. Asumiendo que la pregunta está



PROPÓSITO	DESINFECTANTE	CONCENTRACIÓN	TIEMPO	PATÓGENO
Desinfección equipo tipo quirúrgico (pinzas, tijeras, etc.)	Etanol	70%	1 minuto	Quitridio Ranavirus
	Agua caliente	100 °C	10 minutos	Oomycetes ( <i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Scoliolegnia</i> )
Desinfección equipo de colecta y recipientes de colecta	Hipoclorito de Sodio (Lavandina de uso doméstico)	4%	15 minutos	Quitridio Ranavirus
		2%	mínimo 1 minuto	<i>Didymo</i>
	Secar completamente		3 horas o más	Quitridio
	Calor	60 °C	5 minutos	Quitridio
			15 minutos	Ranavirus
			20 minutos	<i>Didymo</i>
		37 °C	4 horas	Quitridio
Esterilización con RUv		1 minuto	Ranavirus (solamente)	
Enjuague con agua hervida	100 °C	varios enjuagues	Oomycetes ( <i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Scoliolegnia</i> )	
Desinfección de botas/wader	Hipoclorito de Sodio (Lavandina de uso doméstico)	4%	15 minutos	Quitridio <i>Didymo</i> Oomycetes ( <i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Scoliolegnia</i> )
		2%	por lo menos 1 minuto	<i>Didymo</i>
	Secar completamente		3 horas o más	Quitridio <i>Didymo</i>
Desinfección de telas o prendas usadas en el campo	Agua caliente	60 °C o más	5 minutos	Quitridio
			1 minuto	<i>Didymo</i>
			15 minutos	Ranavirus
			varios enjuagues	Oomycetes ( <i>Saprolegnia</i> , <i>Achlya</i> , <i>Scoliolegnia</i> )

**Tabla 4.6.1.** Métodos de desinfección de material de campo cuando se trabaja en ambientes acuáticos (las especies de Oomycetes que se citan infectan anfibios con distribución en Argentina<sup>(16,83)</sup>; alga invasora *Didymo*<sup>48</sup>).

formulada, el paso siguiente requiere revisar la metodología completa de colecta que se va a emplear, esto incluye considerar la solicitud de permisos de trabajo teniendo en cuenta todas las jurisdicciones que correspondan (Nacional, Provincial, Municipal, ver **Sección 5**) y realizar un listado, revisión y chequeo de todo el equipo necesario para el trabajo que se realice en la naturaleza.

Una vez establecido todo el material y equipo necesario para el estudio, se debe chequear todo aquel que requiera calibración, baterías, uso de memo-

ria, actualización de software u otro requerimiento particular (aireadores, heladeras portátiles con conexión a baterías, linternas, pH-metros, oxímetro, termómetros digitales, cámaras fotográficas, notebooks, teléfonos celulares, dataloggers, uso de lápiz para evitar que las anotaciones no se borren con el contacto con el agua, es recomendable también usar papel que pueda mojarse y no romperse como papel de tela, etc.).

Algo importante a tener en cuenta en relación a los organismos que se van a coleccionar es la posibilidad de exposiciones previas de dichos organismos con ciertos estímulos que puedan influir de manera no controlada en los experimentos. A los organismos que no han sido expuestos a ciertos factores de interés suele denominárselos individuos “naïve” o “no expuestos”. Un ejemplo típico está relacionado con la capacidad de los embriones de detectar estímulos químicos desde estadios muy tempranos del desarrollo<sup>(55)</sup>. Entonces, en un experimento que, por ejemplo, estudia el efecto de claves químicas de depredadores sobre el comportamiento y morfología de renacuajos, la opción más adecuada es llevar anfibios adultos al laboratorio (machos y hembras reproductivos) y estimular su reproducción en el laboratorio para la obtención de huevos fecundados. Sin embargo, esto a veces puede resultar logísticamente complicado, por lo que una opción muy utilizada también es coleccionar embriones en estadios tempranos (gástrula), para asegurar que los individuos a utilizar en el experimento no han tenido experiencia previa con dichas claves químicas, no han llegado a “oler” estímulos del depredador. De esta forma, al finalizar el experimento y comparar grupo experimental y grupo control, los resultados podrán asociarse al tratamiento aplicado y podrán descartarse los efectos de exposición previa. También en larvas de anfibios como en adultos podemos coleccionar organismos no expuestos a un factor a estudiar. Por ejemplo, si se quiere estudiar el efecto de una especie exótica sobre larvas o adultos de anfibios, bastará con coleccionar individuos de sitios donde se conozca que históricamente no habita dicha especie exótica<sup>(56,57)</sup>.

- **Localización y colecta de muestras**

1) *Huevos/masas de huevos*. El conocimiento detallado, si es posible, del modo reproductivo de la/las especies a estudiar facilitará el diseño de muestreo de huevos o masas de huevos en el campo, tanto para ensayos que se realicen en el laboratorio como en el campo. Esto es, conocer uno o más aspectos como, el periodo del año en que se desarrolla la actividad reproductiva, los sitios o microhábitats que eligen para la oviposición las especies, las características de los huevos y el tipo de ovipostura (**Figura 4.6.2**), la tasa y duración del desarrollo, estadio y tamaño a la eclosión, y tipo de cuidado parental si lo hay (ver **Sección 3.1 Relevamiento de oviposturas y embriones** de este Ma-

nual para más detalles). En caso de ensayos experimentales en el laboratorio, las masas de huevos pueden ser trasladadas en bolsas tipo “Ziploc”® o en botellones plásticos.

2) *Larvas*. Las larvas pueden hallarse en diferentes tipos de hábitats, desde cuerpos de agua someros, lagunas más profundas, arroyos, ríos y todos ellos también podrán variar en su complejidad; por ejemplo, fondos con rocas, troncos, o vegetación densa. Esta diversidad de ambientes y su complejidad hace que, al momento de monitorear y coleccionar las larvas de anfibios deban emplearse diferentes técnicas; por ejemplo, el uso de redes permite barridos de la columna de agua en cuerpos de agua someros y perímetros de lagunas más profundas con poca vegetación. El uso de trampas embudo (Figura 4.6.3A, B) resulta efectivo en hábitats profundos o con cierta complejidad (presencia de piedras o rocas, troncos, o en el caso de presentar vegetación muy densa, cuando es difícil el uso de redes), y el empleo de cercos que suele ser efectivo para lagunas de gran superficie y cierta profundidad (Figura 4.6.3C; ver Sección 3.2 **Relevamiento de renacuajos** de este Manual para más detalles).



**Figura 4.6.2.** Tipos de ovipostura. **A.** *Pleurodema thaul*- cordones gelatinosos adheridos a vegetación de la columna de agua; **B.** *Pleurodema bufoninum*- cordones gelatinosos dispersos entre vegetación de fondo de humedales someros; **C.** *Rhinella papillosa*- cordones gelatinosos dispersos en el fondo de humedales rocosos; **D.** *Batrachyla* sp.- huevos individuales ubicados en “nidos” entre la vegetación húmeda. Foto A: F. G. Jara; Fotos B, C y D: M. G. Perotti.



**Figura 4.6.3.** Empleo de trampas y cercos en lagunas rocosas y profundas en Laguna Blanca, Neuquén. **A** y **B:** Trampas embudo para captura de renacuajos. **C:** Clausura con redes en laguna profunda<sup>(83)</sup>. Fotos **A** y **B:** M. G. Perotti; Foto **C:** S. Ortubay, tomada de<sup>84</sup>

Es importante, de existir conocimiento previo, tener en cuenta los comportamientos de las larvas de la/s especies de estudio ya que pueden ser relevantes al momento de su colecta o muestreo en los hábitats naturales. Por ejemplo, debemos considerar si tienen hábitos diurnos o nocturnos, si se movilizan de manera solitaria o gregaria, y que tipo de micro-ambientes frecuentan. En nuestra experiencia el uso de ciertos elementos resulta muy adecuado para el traslado de larvas al laboratorio, como el uso de botellones/recipien-

tes plásticos, con tapa, con aireación mediante aireadores transportables y teniendo en cuenta que dichos recipientes deben estar completos de agua para evitar movimientos bruscos dentro de la botella/recipiente durante el traslado.

3) *Adultos*. La inspección de potenciales sitios de reproducción de anfibios requiere de una serie de visitas. Para aquellas especies con hábitos diurnos, resulta más sencilla su detección, colecta y realización de ensayos tanto en el campo, como en el laboratorio. Sin embargo, en su gran mayoría, los anfibios presentan hábitos y actividad nocturna, hecho que puede dificultar su detección (ver **Sección 3.3 Relevamiento de postmetamórficos** de este Manual para más detalles). Dependiendo del sitio a muestrear, la visita nocturna debe ser bien planificada pues puede resultar desaconsejada por factores externos al estudio biológico en sí mismo (por ejemplo, en zonas urbanas donde la seguridad es un aspecto que hay considerar). Por lo que una alternativa puede ser la localización de huevos o masas de huevos, como un método indirecto adecuado de detección de actividad de adultos. Lo más recomendable es trasladar los adultos en cajas plásticas con aireación y papel o algodón humedecido.

### **iii) Consideraciones para el montaje y elementos para su ejecución en el campo y en condiciones controladas en el laboratorio.**

Antes de iniciar cualquier experimento se necesita definir claramente el objetivo o pregunta de manera de definir exactamente como se realizará el diseño experimental. Esto permitirá calcular, por ejemplo, la cantidad mínima necesaria de unidades experimentales para poder obtener resultados confiables (ver **Sección 2 Diseño de Muestreo**).

Por lo tanto, en esta sección el objetivo es describir en detalle aspectos prácticos a la hora de montar un experimento o ensayo experimental, tratando de aportar información útil y práctica, particularmente cuando los recursos de tiempo, de espacio o de equipamiento puedan resultar escasos. Estas recomendaciones permitirán llevar adelante los estudios propuestos, basados en una pregunta específica (hipótesis) y utilizando un diseño experimental apropiado.

## **1) Adecuación y mantenimiento de los organismos**

1.1. *Huevos*. En general, la extracción en la naturaleza de huevos o masas de huevos involucra ciertos cuidados en su transporte al laboratorio. Es muy importante tener en cuenta que las oviposturas o conjunto de huevos/em-

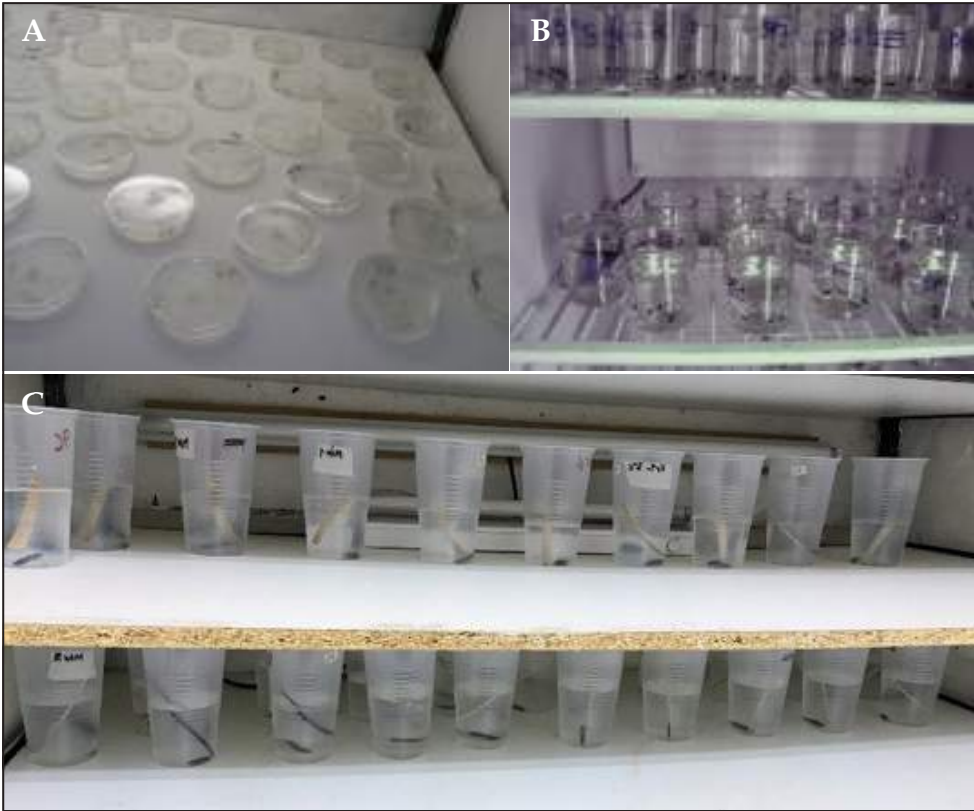
briones deben sufrir la menor alteración posible durante su manipulación y transporte, ya que los movimientos bruscos, impactos mecánicos sobre los huevos, hipoxia, pueden ocasionar mortandad y además pueden interferir en el tiempo de desarrollo<sup>(58)</sup>. También el incremento drástico de la temperatura de los huevos durante el traslado de los mismos puede generar altas tasas de mortalidad por lo que trasladar los mismos en recipientes refrigerados es la mejor opción.

Para su mantenimiento en el laboratorio, previo al montado de los ensayos experimentales, las bateas o piletas de gran capacidad (500 L) resultan adecuadas, ya que posibilitan suficiente espacio. Se debe tener en cuenta la ubicación de las mismas, evitando áreas donde reciban sol directo que pueda generar un rápido incremento de la temperatura. También, es importante que el agua sea de clorinada como se explica más adelante (ver en “**Acondicionamiento de las unidades experimentales**”). Cuando se encuentran en el exterior es importante considerar cubrir con tul o malla mosquitera las piletas de mantenimiento y cría, para que de esta manera se evite el ingreso de aves o insectos depredadores y al mismo tiempo permita el ingreso de la luz solar que es muy importante para el desarrollo de huevos y larvas. El agua de estos contenedores con huevos debe ser monitoreada regularmente, así como el estado de los huevos y considerar que, si hay evaporación, deberá reponerse la cantidad evaporada.

El empleo de recipientes como vasos y capsulas de Petri (**Figura 4.6.4A**) suelen ser útiles en el montado de unidades experimentales (réplicas) cuando se trabaja con huevos/embriones de anuros, donde se puede ubicar un número establecido de los mismos, que dependerá de la pregunta y el diseño experimental. Muchas veces, el material de vidrio específico de laboratorio (vasos de precipitado) es costoso, por lo que puede ser reemplazado por otros recipientes, por ejemplo, porta-velas de vidrio (**Figura 4.6.4B**) o vasos de plástico (recipientes plásticos, en general de 500 ml o de menor capacidad; **Figura 4.6.4C**), aunque es recomendable el uso de vidrio para evitar descartar plásticos al final de los ensayos y como hábito de cuidado del ambiente.

En casos particulares como la determinación del número de huevos en la ovipostura, existen herramientas y métodos sencillos:

**a. Detección y conteo de oviposturas.** Hay especies que resultan más sencillas de estudiar como las que suelen ubicar sus huevos en cordones o masas gelatinosas en las orillas de humedales y lagunas, ya sea libres o adheridas a la vegetación sumergida, ya que son fácilmente detectables a simple vista. Otras especies ubican las oviposturas debajo de troncos, en cavidades de troncos o suspendidas o formando nidos sobre vegetación (**Figura 4.6.2D**).

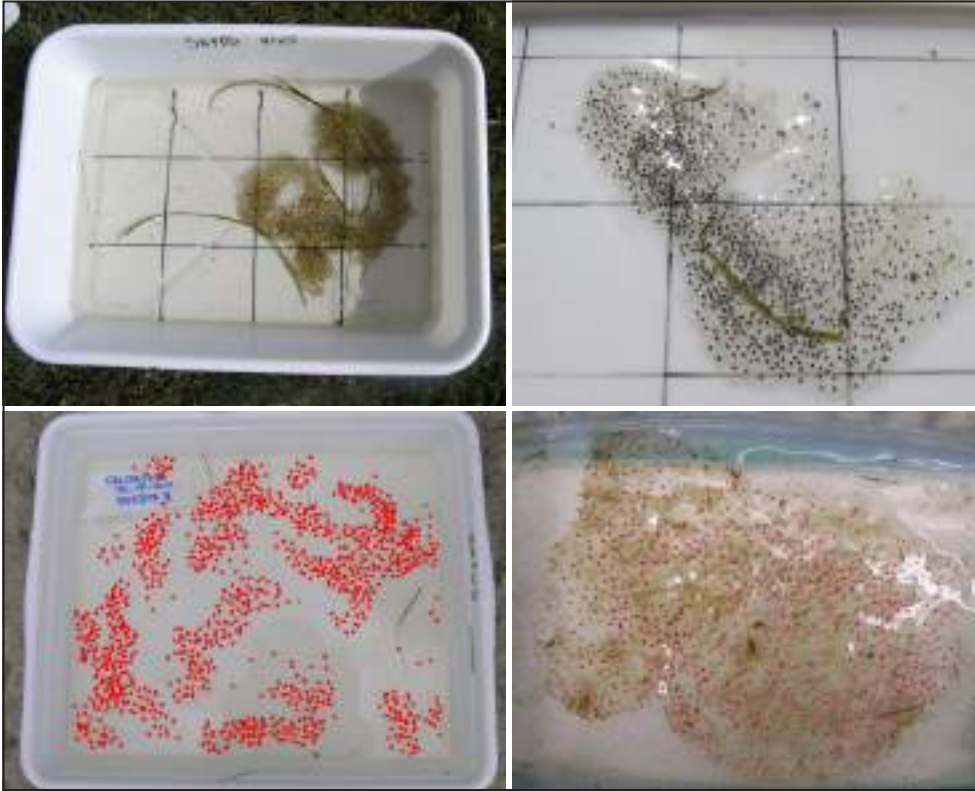


**Figura 4.6.4.** A. Uso de Cápsulas de Petri; B. Uso de porta-velas de vidrio; C. Vasos plásticos. Fotos: M. G. Perotti.

En todos los casos es conveniente recorrer los ambientes, el perímetro completo del sitio de estudio en el caso de lagunas someras, marcar las oviposturas con algún tipo de identificación (plástico, tela), de manera de identificar y realizar conteos precisos a lo largo de sucesivos muestreos o visitas.

**b. Conteo de huevos.** Respecto al conteo de huevos en ambientes naturales y en el laboratorio en especies con diferentes modos reproductivos, se recomiendan a continuación una serie de métodos posibles a realizar en el campo (conteo a simple vista) y otros combinando otras herramientas en el laboratorio, como análisis de fotografías, uso de lupa, etc., dependiendo del modo reproductivo

**c. Conteo de huevos a simple vista (“ojo desnudo”) en el campo.** Un método simple es el empleo de bateas blancas graduadas o cuadrículadas que puedan estar inmersas en la columna de agua, de manera de alterar lo menos posible a la masa de huevos (**Figura 4.6.5**, panel superior). De esta manera, el fondo blanco permite mejor visibilidad y distinción de los huevos como unidades para su conteo; así mismo la graduación facilita también el conteo. Por otro lado, se debe considerar, en caso que se desee optimizar el tiempo de trabajo de campo, realizar fotografías de dichas oviposturas en las bateas para su posterior conteo en el laboratorio. En algunos casos las oviposturas



**Figura 4.6.5.** Panel superior, recipientes graduados. Panel inferior, marcas por conteo a través de software ImageJ. Fotos: M. G. Perotti.

son terrestres y estas se sitúan en el suelo húmedo del bosque que circunda los humedales (**Figura 4.6.6A**). Este es el caso de algunas especies del género *Batrachyla* (e.g. *B. taeniata* y *B. leptopus*<sup>59</sup>) en este caso los huevos son puestos a fines del verano sobre el suelo, o bien semienterrados y cubiertos por detritus orgánicos (**Figura 4.6.6B**). Para contar el tamaño de puesta en estos casos es necesario recurrir a pinceles pequeños para ir removiendo de a poco la capa de sedimento y así ir colectando con una espátula o cuchara todos los huevos que componen la puesta.

**d. Conteo de huevos en el laboratorio:** los huevos de anfibios pueden contarse a “ojo desnudo”, o como se señaló anteriormente, a través de fotografías realizadas en el sitio de estudio. En el caso del conteo de huevos mediante fotografías deben considerarse ciertas pautas: debe procurarse una fotografía en la que la mayor parte de la imagen se encuentre en foco (para ello una toma cenital es lo recomendado), una iluminación adecuada, homogénea, evitando sombras. En la medida de lo posible, si la cámara lo permite, utilizar modalidad manual, tomando nota de la distancia focal, sensibilidad ISO y velocidad de obturación. Lo ideal es unificar las condiciones lumínicas y parámetros para todas las fotografías.





**Figura 4.6.6.** Ejemplo de especies que colocan sus huevos en tierra. **A.** zonas secas aledañas al humedal donde *Batrachyla taeniata* y *B. leptopus* depositan los huevos; **B.** huevos de *B. taeniata* semienterrados por detritus. Fotos: F. G. Jara.

Para el procesamiento de datos, en este caso el conteo de huevos de una fotografía, una herramienta muy versátil y muy usada es el software libre “ImageJ” (<https://imagej.nih.gov/ij/>; **Figura 4.6.5** panel inferior).

1.2. *Larvas*. Basados en nuestra experiencia y la de otros investigadores (e.g.:<sup>60</sup>, <https://www.ieu.uzh.ch/en/research/ecology/change/labprotocols.html>), las larvas no se mantienen saludables cuando se crían y mantienen por tiempo prolongado dentro del laboratorio, con luz artificial y en recipientes de menos de 1 L de capacidad. Contrariamente y en general, se mantienen en buenas condiciones si son criadas en piletas o contenedores en el exterior del laboratorio, cuidando la ubicación de las piletas, las condiciones del agua, la incidencia de luz y la protección por ingreso de depredadores u otros organismos. Cuando el experimento requiere el empleo de recipientes pequeños que típicamente se usan dentro del laboratorio o la cámara incubadora, como alternativa estos recipientes pueden ubicarse en un recinto al aire libre (e.g.: Gazebo) que permite ciertas variaciones ambientales naturales en luz y temperatura y dónde puede llevarse a cabo el experimento (**Figura 4.6.7**).

Para el mantenimiento de las larvas, se debe establecer un protocolo sistematizado de alimentación, que dependerá del tipo de pregunta formulada para el experimento o ensayo, y de la especie y de la velocidad con la que se pretende que las larvas crezcan. Si el recipiente de mantenimiento lo permite, es importante evaluar la velocidad a que las larvas dejan de tener comida disponible para reponerla. Si los recipientes son muy chicos se recomienda extraer el excedente del alimento y renovar el agua frecuentemente para evitar que el agua pierda sus cualidades. Recomendamos como alimento una mezcla de algas/fitoplancton y proteína brindada por comida para peces, para lo cual, utilizamos uno o dos tipos de microalgas de fácil cultivo (e.g., *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp., entre otras), en combinación con comida para peces de agua dulce (VitaFish®)<sup>61</sup>. En el caso de mesocosmos con mucho sustrato y fitoplancton dicha mezcla puede administrarse como suplemen-



**Figura 4.6.7.** Carpa gazebo ubicada en el jardín del laboratorio. Foto: M. Pueta.

taria ya que permite asegurar la presencia de suplemento proteico. Asimismo, los recipientes pequeños pueden necesitar de limpieza diaria del fondo con un “limpiafondo” que puede realizarse con una manguera pequeña (como las típicas mangueras empleadas con aireadores en peceras). Cabe destacar que si los renacuajos son carnívoros habrá que reemplazar el alimento vegetal por invertebrados acuáticos o bien larvas de otros anuros de los cuales se alimenta.

El uso de pipetas automáticas o micropipetas de hasta 1000  $\mu\text{L}$  (**Figura 4.6.8**) suele ser de mucha utilidad a la hora de establecer una alícuota similar para todos los sujetos experimentales. Dichas pipetas son muy útiles también para la manipulación de cualquier estímulo experimental de fase líquida, por ejemplo, claves químicas.

1.3. *Adultos.* Para el mantenimiento de juveniles o adultos de anfibios suelen utilizarse terrarios (acuarios) de vidrio o cajas plásticas. En todos los casos es deseable que los recintos estén ubicados en lugares con mínimo disturbio para ayudar a minimizar el estrés de los animales. Los recintos más simples y que suelen usarse en situaciones de mantenimiento a corto plazo, son recintos con un sustrato de toallas de papel con humedad constante y algún tipo de refugio<sup>(38,39,41)</sup>. Lo óptimo sería mantenerlos en un recinto con vegetación natural y cierta complejidad ambiental que incluya zonas con agua, refugios, rocas, etc.<sup>(36,40,62)</sup>. Los alimentos más utilizados son gusanos, moscas



**Figura 4.6.8.** Pipeta automática.  
Foto: V. H. Meneses

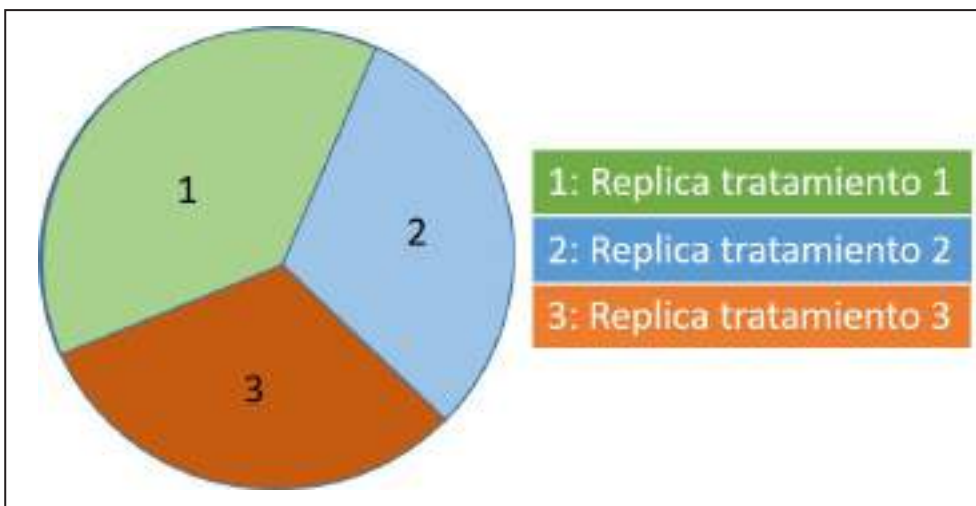
de la fruta (*Drosophila* sp.) o pequeños grillos<sup>(36-40)</sup>. La densidad de animales por recinto no solo dependerá del tamaño del mismo sino también del objetivo de estudio y de las interacciones sociales que entre ellos puedan suceder (e.g.: intercambio de estímulos químicos, agresión)<sup>(41,62)</sup>. Si el mantenimiento es en un lugar cerrado debe sistematizarse y controlarse el ciclo de luz-oscuridad y la temperatura adecuada según la época del año y/o el objetivo del estudio. En el caso de experimentos en mesocosmos terrestres, estos recintos suelen también ser los de mantenimiento y suelen estar contruidos de plástico, o de tela plástica y malla metálica o de aluminio. En muchos casos los mesocosmos para mantenimiento y experimentación con anfibios adultos se hacen utilizando sólo paredes artificiales y aprovechando el suelo natural, en esos casos se debe tener en cuenta la profundidad de dichas paredes para evitar que los anfibios escapen cavando, y en todos los casos es aconsejable algún tipo de cobertura semitransparente para que los anfibios no puedan escapar ni ser atacados por depredadores.

## 2) Montado de experimentos

En general, para montar un experimento se recomienda tener en cuenta la ubicación de las unidades experimentales (réplicas) tanto en exterior como

en interior (laboratorio), ya que se necesita controlar las variables que podrían, si no son controladas, producir resultados y conclusiones erróneas. Por ejemplo, estas variables podrán ser: la luz (diferencias en la exposición al sol y la sombra; diferencias en la intensidad de iluminación, en el caso de uso de estantes en un laboratorio o incubadora o cámara “Walk-In”), la inclinación del terreno, etc. Vamos a dar un ejemplo: supongamos un experimento en que buscamos determinar si el volumen de agua (experimentos conocidos como efectos del hidroperíodo) afecta atributos en las larvas de anfibios. Si nuestra metodología consiste en modificar el volumen de agua (modificar el hidroperíodo) en nuestras unidades experimentales, y las mismas se encuentran a la intemperie, éstas deberán estar alojadas debajo de un techo o invernadero para evitar que las precipitaciones alteren nuestros tratamientos y poder nosotros controlar la variación del hidroperíodo deseada en nuestro diseño experimental.

Cuando se trabaja con mesocosmos, en cámaras incubadoras o habitaciones adecuadas con control de variables como temperatura y luz (cámara Walk-In) con estanterías donde se ubicarán las réplicas del experimento, es conveniente planear el empleo de bloques aleatorios donde los tratamientos se distribuyan al azar en cada bloque (un bloque puede ser un estante en el laboratorio; un área en el terreno que contenga representados los distintos tratamientos; un contenedor o pileta compartimentada). Cada bloque entonces contendrá una réplica de cada tratamiento. Por ejemplo, en la **Figura 4.6.9** se muestra un esquema de una pileta donde se ha tabicado de manera de representar en dicha unidad (bloque) tres tratamientos. Podría ser un bloque donde cada compartimento representa un tipo de estímulo (1-químico, 2-visual, 3-sin estímulo) por parte de los depredadores empleando jaulas en los mesocosmos (ver a continuación ejemplo de estimulación visual y química de depredadores). De esta



**Figura 4.6.9.** Ejemplo de Pileta compartimentada a modo de bloque.

manera, durante el procesamiento de datos, el análisis estadístico en bloques permitirá eliminar el sesgo (la confusión), si es que existe, por ejemplo, por la ubicación de las unidades experimentales en ambientes que no son totalmente homogéneos en sus condiciones (diferente exposición a la luz).

Muchas veces es necesario readecuar las incubadoras para permitir introducir aireadores que brinden oxígeno para los recipientes de trabajo y de esta manera controlar también esta variable (oxigenación de los recipientes) que podría introducir sesgo a los experimentos. Los recipientes de hasta un litro pueden adquirirse como insumos de vidrio para laboratorio o en cotillones en el caso de vasos plásticos de hasta un litro. Las piletas de mantenimiento o los mesocosmos de experimentación pueden ser de fibra de vidrio o lona similar a las piletas Pelopincho®, o bebederos para animales de granja. Los mesocosmos acuáticos medianos también se pueden armar a partir de recipientes plásticos fáciles de adquirir (palanganas; **Figura 4.6.10**).



**Figura 4.6.10.** Piletas de mantenimiento con marcos que permiten montar filtros o mallas y distintos tipos de mesocosmos acuáticos ubicados en el exterior del laboratorio. Fotos: M. G. Perotti, F. Jara.

## Acondicionamiento de las unidades experimentales

-Previamente al armado de un experimento, todos los recipientes que vayan a emplearse tanto nuevos como reciclados, tendrán que ser lavados adecuadamente para retirar cualquier resto de alimento u olores que alteren el comportamiento de los animales experimentales, deben eliminarse los rótulos viejos, así como tener en cuenta el protocolo de desinfección explicado en el apartado anterior.

-Luego, los recipientes o mesocosmos deben ser llenados con agua en caso de trabajar con embriones y larvas, o poner una mínima cantidad de agua en caso de trabajar con adultos. En general se observan dos variantes en los trabajos publicados, una es directamente colocar agua declorinada (eliminando el cloro que pudiera contener, si es agua de red), que puede obtenerse teniendo recipientes de gran volumen donde se deje el agua el tiempo necesario para la evaporación por completo del hipoclorito de sodio (24-48 hs). La otra variante es con agua filtrada del humedal de donde provienen los animales experimentales. En el caso de trabajar con mesocosmos, la opción de utilización de agua filtrada del ambiente original facilita que los mesocosmos rápidamente desarrollen fitoplancton, facilitando la alimentación de los animales y permitiendo un ambiente con condiciones más similares al natural. Tanto en acuarios como en mesocosmos puede agregarse un fondo o sustrato, que puede ser hojarasca o sedimento de las lagunas, plantas acuáticas o bien plantas artificiales confeccionadas con plástico, etc. (**Figura 4.6.11**). No es recomendable el uso de agua filtrada del humedal en el caso de trabajar con estímulos químicos naturales, ya que el filtrado no elimina dichos estímulos. Por otro lado, cuando se introduzcan elementos provenientes del ambiente natural habrá que controlar que no contengan ninguna especie animal como caracoles, sanguijuelas, larvas o adultos de insectos depredadores, etc.

Los mesocosmos terrestres se construyen típicamente incluyendo el suelo natural en su instalación; sin embargo, las jaulas o tanques sobre el suelo también pueden usarse para manipulaciones terrestres con la adición de sustratos y condiciones ambientales apropiadas<sup>(34)</sup>. Los mesocosmos terrestres pueden ser muy complejos y costosos ya que se debe proporcionar suficiente espacio para que los animales realicen actividades terrestres críticas como alimentarse, excavar e invernar y al mismo tiempo permitir contar con suficientes réplicas<sup>(34,44)</sup>. Finalmente, en algunos casos, tanto en larvas de anfibios como en adultos es posible llevar a cabo diseños experimentales completos con preguntas sencillas directamente a campo, pero limitando las variables a controlar<sup>(34,42,62-66)</sup>.



**Figura 4.6.11.** Diferentes elementos como jaulas plásticas o complejidad simulando vegetación. Foto: M. G. Perotti.

-Una vez que los recipientes o los mesocosmos están acondicionados podremos proceder a distribuir los tratamientos entre las unidades experimentales. Lo más adecuado es rotular colocando solo un código a cada unidad y de esta manera tendremos la mínima información a la hora de registrar los datos en cada réplica (doble ciego). Este tipo de metodología ayuda a disminuir sesgos introducidos por el observador<sup>(31)</sup>. Es importante que, en la planilla final, al lado de cada código de la unidad experimental, se coloque a qué tratamiento ha sido asignado, además de toda la información que sea necesaria posteriormente en el análisis de datos.

-Proceder a alojar a los animales experimentales. Es muy importante saber con cuántos animales experimentales se cuenta para poder asignar, por un lado, igual número de réplicas por tratamiento y por otro, igual cantidad de

individuos por réplica, (excepto que se pretenda medir efectos de la densidad de individuos). En el caso de experimentos de corto plazo realizados en recipientes de 1 L o menos, y cuando existen problemas en la cantidad de individuos disponibles para desarrollar el experimento, es preferible trabajar con uno o pocos individuos por recipiente y muchas réplicas, que trabajar con pocas réplicas y varios o muchos individuos por réplica. De esta manera, el mayor número de réplicas dará resultados más confiables. Es importante también tener en cuenta que, si se trabaja con varios individuos por réplica, deberá considerarse la variable a medir como un promedio de los individuos por réplica, ya que, si se consideran como datos individuales dentro de la misma réplica incurrirá en “pseudoreplicación”<sup>(67)</sup> (consultar también **Sección 2 Diseño de Muestreo**). Si la cantidad de individuos por réplica/mesocosmo supera los diez individuos, en general se recomienda hacer recuentos y asegurarse que el número de individuos sea igual en todas las réplicas.

Los individuos deben provenir de diferentes oviposturas (diferentes progenitores-camadas) de una población, para controlar el efecto genético/parental que podría llevar a errores o sesgos en la interpretación de los resultados. También si se quiere medir o controlar el efecto materno o de camada en el diseño, se debe tener en cuenta el origen (camada o masa original de huevos) de los individuos experimentales. En caso de querer medir efectos sobre diferentes poblaciones será necesario coleccionar oviposturas de estas diferentes poblaciones y mantenerlas separadas.

En el caso de cubrir las piletas o mesocosmos con tela semitransparente (tela o malla mosquitera) que impida la colonización por otros animales o la actividad de depredadores, se debe tener en cuenta que esta cobertura permita la observación por parte del experimentador.

Finalmente, como los anfibios presentan variaciones interanuales en la reproducción, es probable que la disponibilidad en la cantidad de huevos/embriones, larvas o adultos también varíe de un año a otro, por lo que siempre hay que tener en cuenta estas variaciones antes de llevar a cabo un experimento. Si se quiere simular la densidad en condiciones naturales, habrá que medir la densidad en la naturaleza para poder obtener una densidad por área o volumen y luego adaptar esa densidad a las réplicas.

### **Complejización ambiental en las réplicas/mesocosmos**

Otra consideración importante es el uso de elementos o dispositivos experimentales dentro de los mesocosmos que sean necesarios para llevar a cabo adecuadamente el experimento. En todos los casos dichos elementos y su



distribución espacial deben ser similares en todas las réplicas, con la sola variación del efecto a evaluar. Por ejemplo, al evaluar efectos indirectos de los animales depredadores sobre las larvas de anfibios, es decir, cuando se quiere evaluar el efecto de estímulos que indican peligro ya sea químicos y/o visuales no debería verse afectada la supervivencia de las larvas por depredación directa. Para esto, el uso de jaulas para mantener al depredador es muy adecuado, por lo general se confeccionan en plástico, de manera sencilla, ya sea perforando botellas y cubriendo uno de sus extremos con tela mosquitera; o directamente construidas con malla plástica (**Figura 4.6.11**). En experimentos que incluyen el uso de jaulas, es necesario que todos los mesocosmos contengan al menos una (incluidos los controles). Este aspecto es muy importante para evitar resultados confusos como puede ser el efecto de presencia de un elemento diferente (jaula) en los mesocosmos. Un ejemplo práctico con el uso de jaulas sería que, los mesocosmos que correspondan al tratamiento que considere un efecto indirecto del depredador (químico y visual) contengan una jaula con un depredador vivo, mientras que los mesocosmos “control” contengan las jaulas vacías. Otro ejemplo de mayor complejidad experimental podría ser el caso de querer separar el efecto de estimulación visual del de estimulación química, entonces podrían asignarse mesocosmos con jaulas con depredador vivo, otros con jaulas con una imitación de depredador (confeccionado con material inocuo, e.g.: moscas de pesca) y mesocosmos “control” con jaulas vacías.

### **Consideraciones para estudios comportamentales**

El desarrollo de experimentos que involucren la medición de una o más variables comportamentales requiere de ciertas consideraciones específicas que se suman a todas las consideraciones experimentales que se han explicado previamente. Un punto crítico al momento de desarrollar un experimento con registro de variables asociadas a rasgos de la conducta es que estas pueden ser moduladas a corto plazo por el ambiente circundante, los disturbios sensoriales, la subjetividad del observador, las experiencias previas de los animales, el bienestar de los animales en cautiverio, etc. Por lo tanto, las variables de disturbio introducidas por el ambiente experimental o el experimentador deben ser minimizadas o controladas.

Cuando una variable conductual sea registrada alternadamente por más de un observador, es necesario establecer un criterio conjunto para dicho registro; lo más apropiado es realizar correlaciones entre registros de los distintos observadores, lo que se denomina fiabilidad inter observador. Estas correlaciones son más fáciles de realizar cuando se cuenta con filmaciones

de los animales desde las cuales luego se evaluarán los comportamientos. Sin embargo, en experimentos donde no se puede filmar y las observaciones de comportamiento son por observación directa, se pueden realizar pruebas piloto previas a las experimentales y generar dicha fiabilidad. Lo ideal en el registro de conductas es filmar, de esta manera el disturbio generado por el experimentador es mínimo y, además, al quedar el registro fílmico, se pueden registrar varias variables desde una misma filmación que por observación directa podría ser muy complicado. Otra ventaja de filmar las evaluaciones de comportamientos, es poder hacerlo sobre más de una unidad experimental a la vez si el tamaño del recipiente de experimentación no es muy grande. Sin embargo, en mesocosmos acuáticos grandes, al aire libre y con complejidad ambiental puede ser más pertinente la observación directa que las filmaciones, ya que el reflejo en la superficie del agua es muy difícil de evitar en las filmaciones. Una recomendación útil al momento de hacer observaciones directas, tanto en mesocosmos montados directamente en sitios naturales como en zonas externas al laboratorio, es el uso de lentes polarizados, que por sus características de filtrado de la luz permiten ver más fácilmente a través de la columna de agua; además, a la hora de planificar el trabajo, tener en cuenta que los días ventosos dificultan la observación de comportamientos bajo el agua, haciendo casi imposible la observación debajo de la superficie del agua. En el análisis de videos, ya sea para análisis de trayectorias, velocidad de desempeño locomotor, entre otros, existen varios software libres, por ejemplo Tracker®, <https://physlets.org/tracker/> que se ha utilizado con éxito en estudios de desempeño<sup>(68)</sup>. Para la toma de tiempos en ciertos comportamientos también se puede usar directamente un cronómetro digital mientras se reproducen los videos. Recomendamos el libro de Martin y Bateson<sup>(31)</sup> como una guía básica de protocolos de observación y registro de comportamientos.

Los disturbios sensoriales deben ser tenidos en cuenta de acuerdo al estudio de los anfibios y la pregunta planteada. Por ejemplo, olores ambientales pueden ser de alto disturbio en el estudio con estímulos químicos entre adultos de anfibios. O, las vibraciones en terreno (el acercamiento brusco de un observador a un mesocosmo) pueden ser muy disruptivas para la evaluación de movimiento en renacuajos. Además, cuando las evaluaciones de comportamiento requieren que los animales sean trasladados de su lugar de mantenimiento al recinto experimental, se debe siempre prever un tiempo de adaptación al nuevo recinto. Para experimentos de comportamiento de corto plazo y especialmente si las evaluaciones de conducta se realizan sobre un individuo por vez, es recomendable trasladar a los individuos de su lugar de mantenimiento principal (e.g.: pileta) a nuevos recipientes que sean similares a los empleados en las evaluaciones y mantenerlos allí uno o dos días

previos al comienzo del experimento. Siempre que se pueda, es ideal que dichos recipientes de mantenimiento a corto plazo y los de evaluación sean de materiales y tamaños similares.

El tiempo o la hora del día en el cual se generan los registros conductuales es sumamente importante y debe mantenerse a lo largo de todo el experimento y en la replicación de experimentos similares para que sean comparables. Las condiciones de temperatura y fotoperiodo pueden ser controladas en el caso de trabajar dentro de un laboratorio o ser aleatoriamente distribuidas si se trabaja al aire libre. Igualmente, como mencionáramos antes, en el caso de alta heterogeneidad ambiental, es importante considerar el trabajo en bloques experimentales. Un caso especial a tener en cuenta es el estudio de rasgos asociados a comportamientos reproductivos en adultos de anfibios, como selección de vocalizaciones o discriminación de estímulos químicos; en general estos experimentos deben realizarse durante la noche mediante filmaciones con cámaras en modo nocturno<sup>(37,40)</sup>. En el caso de no poder realizar experimentos durante la noche, una alternativa para experiencias en laboratorio es revertir el ciclo de luz oscuridad para que el investigador pueda trabajar de día, pero se debe tener en cuenta el biorritmo y que los animales estén adecuados fisiológicamente al modo nocturno<sup>(37)</sup>.

En el caso de estudios donde la variable respuesta implica orientación espacial de los anfibios, por ejemplo, en estudios de elección de estímulos, se debe tener en cuenta la lateralización motora o de procesamiento visual en anfibios, lo cual implica un sesgo innato en ciertos casos, o modulado por experiencias previas en otros, en cuanto a la orientación de las repuestas hacia “izquierda” o “derecha”<sup>(69-71)</sup>. La forma más común de controlar el sesgo de laterización es alternando la orientación (frente-contrafrente) de los distintos individuos experimentales al comenzar pruebas de preferencia o, alternar el lugar de ubicación de los estímulos. En experimentos de selección, ubicación espacial o preferencia, también deben mantenerse controladas las claves contextuales (e.g.: la sala de experimentación) ya que los anfibios adultos podrían orientarse por otras claves contextuales distintas a las que se quieren evaluar<sup>(72)</sup>. Por ejemplo, si la sala experimental tiene paredes heterogéneas, se puede establecer un perímetro alrededor del recinto experimental con una cortina de tela o plástico de color uniforme.

En algunas situaciones experimentales se debe tener en cuenta si la variable comportamental a registrar depende de cierto estado motivacional y/o fisiológico de los sujetos experimentales. Por ejemplo, si se quiere evaluar qué región del cuerpo de un renacuajo es preferida para ataques directos de un insecto depredador se debería privar de alimento al depredador por algunas

horas (dependiendo de cada especie y tiempo de digestión) para asegurarse la motivación para atacar<sup>(73)</sup>. También, si se quiere evaluar la conducta de ramoneo o alimentación de renacuajos en función de ciertos estímulos contextuales se debería privar de alimento a los renacuajos un tiempo previo a la evaluación para asegurar que están motivados para alimentarse<sup>(74)</sup>.

En estudios de aprendizaje y conducta es muy importante el uso de animales “naïve” o sin experiencia previa con ciertos estímulos de interés. En el caso de renacuajos y estudios de aprendizaje relacionado a estímulos químicos naturales es muy importante lo que mencionáramos previamente sobre la colecta de embriones en estadio de gástrula. El uso de animales naïve es excluyente si se quiere investigar si un comportamiento es innato o puede ser modulado por aprendizaje<sup>(75)</sup>. Asimismo, en la búsqueda de capacidades de aprendizaje, si no se trabaja con animales naïve no se podrán separar los efectos de mecanismos de aprendizaje previos (inhibición latente, habituación, sensibilización) de los resultados que se obtengan en el experimento<sup>(76)</sup>. Una excepción es cuando se estudian capacidades de aprendizaje en contextos nuevos o con estímulos novedosos o artificiales, por ejemplo, el aprendizaje por discriminación de geometría en anuros adultos<sup>(72)</sup>. Otras características de las larvas de anfibios a tener en cuenta particularmente en estudios de aprendizaje y dependiendo del tipo de estudio a desarrollar es el aprendizaje social. Por ejemplo, existe evidencia de transmisión social del reconocimiento de depredadores en larvas de anfibios, incluso en especies que no son gregarias<sup>(77,78)</sup>. En este sentido, cuando se evalúan respuestas conductuales y particularmente capacidades de aprendizaje individual con estímulos plausibles de aprendizaje social, es aconsejable realizar las evaluaciones con réplicas conformadas por un solo sujeto experimental.

Hay varias características de los estudios de comportamiento y de los de aprendizaje que hace que los grupos control en el diseño no sean como los típicos grupos control que hemos mencionado previamente (en el que sólo se altera el tratamiento en estudio). Asimismo, un resultado de mediciones de una conducta en función de un tratamiento dado tiene que poder asociarse exclusivamente con la pregunta experimental y no así con disturbios ambientales o la metodología experimental. Mencionaremos algunos ejemplos de controles experimentales específicos y algunos ejemplos de controles internos en el trabajo experimental. Por ejemplo, los grupos control en experimentos de aprendizaje se diseñan en base al mecanismo de aprendizaje que se quiera evaluar (e.g.: condicionamiento pavloviano, habituación-sensibilización, etc.) y están ampliamente explicados en la literatura; sin importar con qué especie animal o con qué estímulos se trabaje, esos grupos control deben estar presentes en el diseño experimental<sup>(75,77,79)</sup>. La alta variabilidad indivi-

dual en conductas como la locomoción en larvas de anfibios hace que sea muy útil incorporar comparaciones de locomoción interindividual para generar la variable respuesta final, por ejemplo, comparar la locomoción (tiempo, frecuencia, etc.) durante la exposición a un estímulo con la locomoción previo a la exposición a dicho estímulo<sup>(61,75,79)</sup>. En el estudio de la importancia de señales visuales o químicas en anuros adultos el uso de moldes o *dummies* es una forma de controlar ciertas características muy variables de los anuros vivos que, para reducirlas en el diseño, se requeriría de un número muy alto de réplicas. Por ejemplo, para evaluar el peso de claves visuales de machos (e.g.: saco vocal) en la elección de pareja por una hembra en un test de doble elección, Taylor y colaboradores<sup>(62,81)</sup> construyeron un molde de anuro macho con saco vocal expansible y lo colocaron junto a un reproductor de vocalizaciones. Con el molde se controlaban otras variables asociadas a un individuo vivo (tamaño, color, motivación, etc.) y el control propiamente del experimento lo constituía otro reproductor localizado del lado contrario y sin molde de anuro macho junto a él<sup>(62,81)</sup>. En otro caso, para evaluar el rol de ciertas secreciones glandulares de machos en la elección de una hembra, Brunetti y colaboradores (resultados no publicados) construyeron moldes de anuros machos que colocaban junto a reproductores de vocalización y que bañaban con secreciones glandulares o con agua (grupo control). De esta forma el comportamiento de la hembra sólo podía tener como factor de cambio las secreciones y no alguna otra clave asociada a un macho adulto vivo.

### **Consideraciones cuando se estudian aspectos relativos al incremento de la radiación ultravioleta (RUV) y a enfermedades infecciosas**

Desde los años '90 se ha comenzado a poner énfasis en estudios relativos al efecto del cambio climático, el incremento de la RUV y diferentes enfermedades emergentes que han demostrado afectar la biología y ecología de los anfibios, disminuyendo poblaciones e incluso ocasionando la desaparición de especies, particularmente, en ambientes naturales “prístinos” donde hay poco impacto humano.

#### **Radiación Ultravioleta**

Los estudios experimentales que buscan evaluar el efecto de la RUV sobre embriones o larvas de anfibios pueden ser desarrollados tanto en incubadoras o cámaras tipo “Walk-in”, o pueden realizarse en el exterior con incidencia de radiación solar natural. Es recomendable seguir algunas pautas indicadas en varios apartados que fueron desarrollados anteriormente, a saber:

- Minimizar la manipulación de los individuos
- Mantener la asepsia y cuidado de las condiciones del agua empleada durante el desarrollo experimental

En el caso del trabajo experimental en el laboratorio es recomendable:

- Limitar el tiempo de exposición del personal que manipula el set experimental bajo incidencia de RUV al mínimo necesario.
- Asegurar el empleo de gafas adecuadas por parte de todo el personal que participe en la manipulación de organismos bajo lámparas e incubadoras que emitan RUV

En cuanto a equipamiento, en el caso de estudios de RUV en laboratorio existen incubadoras acondicionadas con iluminación UV y PAR (con lámparas UV-A: radiación entre 315 y 400 nanómetros; UV-B: radiación entre 280 y 315 nanómetros; y espectro visible o radiación fotosintéticamente activa (PAR): radiación entre los 400 y los 700 nanómetros) (e.g. Incubadora Sanyo MLR-5®; **Figura 4.6.12A**). Pueden usarse lámparas especiales como lámparas fluorescentes del tipo Spectroline X-15-B (Spectronics Corp.®, y en el caso de lámparas con el espectro visible (PAR) por ejemplo, Philips daylight, TLT 40W/54RS® (**Figura 4.6.12B**)<sup>(82)</sup>.

También, en caso de realizar experimentos de RUV con luz natural (radiación solar), es usual para bloquear RUV el empleo de placas de policarbonato que son testeadas con espectroradiómetro de manera de tener un control de la cantidad de luz que estas placas están filtrando y en función de la necesidad de filtrar mayor o menor intensidad de RUV (**Figura 4.5.12C**)<sup>(82)</sup>.

### Enfermedades Emergentes

El efecto deletéreo de estas enfermedades en el normal desarrollo del ciclo de vida de los anfibios, considerados centinelas de calidad ambiental o bioindicadores, puede estudiarse a través del trabajo experimental. Para ello es importante, además de tener presentes los protocolos para minimizar la exposición y transmisión de patógenos durante el muestreo (**Tabla 4.6.1**), seguir ciertos protocolos al momento del montado de este tipo de experimentos.

A continuación, explicamos nuestra experiencia con la manipulación y montado de experimentos para el estudio del Oomycetes sobre embriones de anfibios. Dicha experiencia corresponde a estudios en especies de mohos acuáticos presentes en ambientes del bosque ecotonal del norte patagónico como *Saprolegnia* sp., *Achlya* sp., *Scoliolegnia* sp. (Oomycetes). Las pautas y recomendaciones a seguir serán:



**Figura 4.6.12.** Experimentación con embriones y larvas de anfibios. **A.** Laboratorio, empleo de Incubadora *ad hoc* Sanyo MLR-5; **B.** Uso de lámparas UV-PAR en incubadora (Spectroline X-15-B); **C.** Exterior, uso de placas de policarbonato (empleada como filtro en experimentos de radiación ultravioleta con luz natural). Fotos: M. G. Perotti.

- Mantener asepsia en todos los recipientes a emplear en los ensayos experimentales; para ello y evitando la contaminación de hongos provenientes del campo, es aconsejable que los recipientes sean de vidrio, tratados en estufa y secados.
- Las oviposaduras y/o larvas colectadas a campo, deben ser lavadas en laboratorio, con la menor manipulación posible y previamente al montado del experimento según la siguiente metodología:

- El agua proveniente de los respectivos ambientes de colecta de los anfibios debe ser hervida por al menos 10 minutos para asegurar la mortalidad de esporas y micelio de potenciales mohos acuáticos. Posteriormente, el agua se deja enfriar para luego lavar mediante varios enjuagues los embriones y/o larvas de anfibios a emplear en el ensayo<sup>(17,47)</sup>.

## Bibliografía

1. Underwood, A. 1991. The logic of ecological experiments: a case history from studies of the distribution of macro-algae on rocky intertidal shores. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 71: 841-866.
2. Underwood, A.J. 1997. *Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance*. Cambridge University Press, New York.
3. Cooke, S.J.; Birnie-Gauvin, K.; Lennox, R.J.; Taylor, J.J.; Rytwinski, T.; Rummer, J.L.; Franklin, C.E.; Bennett, J.R. & Haddaway, N.R. 2007. How experimental biology and ecology can support evidence-based decision-making in conservation: avoiding pitfalls and enabling application. *Conservation Physiology* 5: cox043.
4. Clobert, J.; Chanzy, A.; Le Galliard, J-F.; Chabbi, A.; Greiveldinger, L.; Caquet, T.; Loreau, M.; Mougin, C.; Pichot, C.; Roy, J. & Saint-André, L. 2018. How to integrate experimental research approaches in ecological and environmental studies: AnaEE France as an example. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6: 43.
5. Dean, A.; Voss, D. & Dragulji, D. 2017. *Design and Analysis of Experiments*. Second Edition. Springer International Publishing AG.
6. Burggren, W.W. & Warburton, S. 2007. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR Journal* 48: 260-269.
7. Heyer, W.R.; McDiarmid, R.W. & Weigmann, D.L. 1975. Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics. *Biotropica* 7: 100-111.
8. Morin, P.J.; Lawler, S.P. & Johnson, E.A. 1990. Ecology and breeding phenology of larval *Hyla andersonii*: the disadvantages of breeding late. *Ecology* 71: 1590-1598.
9. Formanowicz Jr., D.R. 1986. Anuran tadpole/aquatic insect predator-prey interactions: tadpole size and predator capture success. *Herpetologica* 42: 367-373.
10. Wilbur, H.M. 1997. Experimental ecology of food webs: complex systems in temporary ponds. The Robert H. Mac-Arthur Award lecture. *Ecology* 78: 2279-2302.
11. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Teglia, C.M.; Martinuzzi, C.; Curi, L.; Culzoni, M.J. & Goicoechea, H.C. 2017. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 51: 114-123.
12. Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Martinuzzi, C.S.; Attademo, A.M.; Bassó, A. & Colussi, C.L. 2019. Insecticide pyriproxyfen (Dragón®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. *Chemosphere* 220: 714-722.
13. Ortubay, S.; Cussac, V.; Battini, M.; Barriga, J.; Aigo, J.; Alonso, M.; Macchi, P.; Reissig, M.; Yoshioka, J. & Fox, S. 2006. Is the decline of birds and amphibians in a steppe lake of northern Patagonia a consequence of limnological changes following fish introduction? *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems* 16: 93-105.
14. Blaustein, A.R.; Urbina, J.; Snyder, P.W.; Reynolds, E.; Dang, T.; Hoverman, J.T.; Han, B.; Olson, D.H.; Searle, C. & Hambalek, N.M. 2018. Effects of emerging infectious diseases on amphibians: a review of experimental studies. *Diversity* 10: 1-49.
15. Fox, S.; Greer, A.; Torres-Cervantes, R. & Collins, P. 2006. First case of ranavirus associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 87-92.
16. Ghirardi, R.; Perotti, M.G.; Steciow, M.M.; Arellano, M.L. & Natale, G.S. 2010. Potential distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Argentina: implications in amphibian conservation. *Hydrobiologia* 659: 111-115.




17. Perotti, M.G.; Basanta, M.D.; Steciow, M.; Sandoval-Sierra, J. & Diéguez-Uribeondo, J. 2013. Early breeding protects anuran eggs from *Saprolegnia* infection. *Austral Ecology* 38: 672-679.
18. Carey, C. & Alexander, M.A. 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link?. *Diversity and Distributions* 9: 111-121.
19. Beebee, T.J.C. & Griffiths, R. 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125: 271-285.
20. Hopkins, W.A. 2007. Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR Journal* 48: 270-277.
21. Lips, K.R.; Diffendorfer, J.; Mendelson, J.R. & Sears, M.W. 2008. Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology* 6: e72.
22. Alton, L.A. & Franklin, C.E. 2017. Drivers of amphibian declines: effects of ultraviolet radiation and interactions with other environmental factors. *Climate Change Responses* 4: 6.
23. Perotti, M.G.; Bonino, M.F.; Ferraro, D. & Cruz, F.B. 2018. How sensitive are cold temperate tadpoles to climate change? The use of thermal physiology and niche model tools to assess vulnerability. *Zoology* 127: 95-105.
24. Hall, B.K. 1992. *Evolutionary Developmental Biology*. Chapman & Hall, London.
25. Fabrezi, M. 2011. Heterochrony in growth and development in anurans from the Chaco of South America. *Evolutionary Biology* 38: 390-411.
26. Fabrezi, M.; Quinzio S.I.; Goldberg, J.; Cruz, J.C.; Pereyra, M.C. & Wassersug, R.J. 2016. Developmental changes and novelties in ceratophryid frogs. *EvoDevo* 7:5.
27. Quinzio, S. & Fabrezi, M. 2012. Ontogenetic and structural variation of mineralizations and ossifications in the integument within Ceratophryid frogs (Anura, Ceratophryidae). *Anatomical Records* 295: 2089-2103.
28. Quinzio, S. & Fabrezi, M. 2014. The lateral line system in anuran tadpoles: neuromast morphology, arrangement, and innervation. *Anatomical Records* 297:1508-1522.
29. Abdala, V. & Ponssa, M.L. 2012. Life in the slow lane: the effect of reduced mobility on tadpole limb development. *Anatomical Records* 295: 5-17.
30. Underwood, A.J. 2009. Components of design in ecological field experiments. *Annales Zoologici Fennici* 46: 93-111.
31. Martin, P.R. & Bateson, P.P.G. 2007. *Measuring Behaviour: An Introductory Guide*. Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
32. Stebbins, R.C. & Cohen, N.W. 1997. *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press. Princeton.
33. McDiarmid, W. & Altig, R. 2000. *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. University of Chicago Press, Chicago, USA.
34. Boone, M.D. & James, S.M. 2005. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. *Applied Herpetology* 2: 231-257.
35. Stewart, R.I.A.; Dossena, M.; Bohan, D.A.; Jeppesen, E.; Kordas, R.L.; Ledger, M.E.; Meerhoff, M.; Moss, B.; Mulder, C.; Shurin, J.B.; Suttle, B.; Thompson, R.; Trimmer, M. & Woodward, G. 2013. Mesocosm Experiments as a Tool for Ecological Climate-change Research: 71-181. *En. Woodward, G. & O'Gorman, E.J. (eds.). Advances in Ecological Research*. The Netherlands: Academic Press, Elsevier Ltd Elsevier, Amsterdam.
36. Forester, D.C. & Wisnieski, A. 1991. The significance of airborne olfactory cues to the recognition of home area by the dart-poison frog *Dendrobates pumilio*. *Journal of Herpetology* 25: 502-504.
37. Pfennig, K.S. 2000. Female spadefoot toads compromise on mate quality to ensure conspecific matings. *Behavioral Ecology* 11: 220-227.
38. Houck, L.D.; Palmer, C.A.; Watts, R.A.; Arnold, S.J.; Feldhoff, P.W. & Feldhoff, R.C. 2006. A new vertebrate courtship pheromone, PMF, affects female receptivity in a terrestrial salamander. *Animal Behaviour* 73: 315-320.
39. Chouinard, A.J. 2012. Rapid onset of mate quality assessment via chemical signals in a woodland salamander (*Plethodon cinereus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66: 765-775.
40. Brunetti, A.E.; Taboada, C. & Faivovich, J. 2014. The reproductive biology of *Hypsiboas punctatus* (Anura: Hylidae): male territoriality and the possible role of different signals during female choice. *Salamandra* 50: 215-224.
41. Byrne, P.G. & Keogh, J.S. 2007. Terrestrial toadlets use chemosignals to recognize conspecifics.

- pecifics, locate mates and strategically adjust calling behavior. *Animal Behaviour* 74: 1155-1162.
42. de Assis, V.R.; Navas, C.A.; Mendonça, M.T. & Gomes, F.R. 2012. Vocal and territorial behavior in the Smith frog (*Hypsiboas faber*): Relationships with plasma levels of corticosterone and testosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology* 163: 265-271.
  43. Rohr, J.R. & Palmer, B.D. 2005. Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1253-1258.
  44. Hopkins, W.A.; DuRant, S.E.; Staub, B.P.; Rowe, C.L. & Jackson, B.P. 2006. Reproduction, embryonic development, and maternal transfer of contaminants in the amphibian *Gastrophryne carolinensis*. *Environmental Health Perspective* 114: 661-666.
  45. Bredeweg, E.M.; Morzillo, A.T.; Thurman, L.L. & Garcia, T.S. 2019. The integrative effects of behavior and morphology on amphibian movement. *Ecology and Evolution* 9: 1278-1288.
  46. Phillott, A.D.; Speare, R.; Hines, H.B.; Skerratt, L.F.; Meyer, E.; McDonald, K.R.; Cashins, S.D.; Mendez, D. & Berger, L. 2010. Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 175-185.
  47. Ruthig, G.R. 2009. Water molds of the genera *Saprolegnia* and *Leptolegnia* are pathogenic to the North American frogs *Rana catesbeiana* and *Pseudacris crucifer*, respectively. *Diseases of Aquatic Organisms* 84: 173-178.
  48. Betancourt, R.F.; Baffico, G. & Beamud, S.G. 2017. Alga didymo. Una pequeña gran invasora. *Desde la Patagonia Difundiendo Saberes* 14: 28-34.
  49. Ghirardi, R.; Lescano, J.N.; Longo, M.S.; Robledo, G.; Steciow, M. & Perotti, M.G. 2009. Chytridiomycosis in Argentina. First record in *Leptodactylus gracilis* and a new record in *Leptodactylus ocellatus*. *Herpetological Review* 40: 175-176.
  50. Bardier, C.; Ghirardi, R.; Levy, M. & Maneyro, R. 2011. First case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetological Review* 42: 65-66.
  51. Ghirardi, R.; Levy, M.G.; López, J.A.; Corbalán, V.; Steciow, M.M. & Perotti, M.G. 2014. Endangered amphibians infected with the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in austral temperate wetlands from Argentina. *The Herpetological Journal* 24: 129-133.
  52. Ghirardi, R.; Levy, M.G.; López, J.A.; Steciow, M.M. & Perotti, M.G. 2014. *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting anurans in a protected area from Santa Fe province, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 28: 29-31.
  53. Arellano, M.L.; Natale, G.S.; Grilli, P.G.; Barrasso, D.A.; Steciow M.M. & Lavilla, E.O. 2017. Hostpathogen relationships between the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and tadpoles of five South American anuran species. *The Herpetological Journal* 27: 33-39.
  54. Albariño R.J. & Añón Suárez, D.A. 2020. Invasiones biológicas en Patagonia: efectos del alga didymo sobre los macrocrustáceos nativos del Río Limay, Parque Nacional Nahuel Huapi. *Macroscofia* 10: 15-20.
  55. Hepper, P.G. & Waldman, B. 1992. Embryonic olfactory learning in frogs. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B* 44: 179-197.
  56. Kiesecker, J. & Blaustein, A. 1997. Population differences in responses of Red-Legged Frogs (*Rana aurora*) to introduced Bullfrogs. *Ecology* 78: 1752-1760.
  57. Melotto, A.; Manenti, R. & Ficetola, G.F. 2020. Rapid adaptation to invasive predators overwhelms natural gradients of intraspecific variation. *Nature Communications* 11: 3608.
  58. Warkentin, K.M. 2011. Plasticity of hatching in amphibians: evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and Comparative Biology* 51: 111-127.
  59. Jara, F.G.; Cuello M.E. & Úbeda, C. 2019. Afrontando el invierno: la rana de ceja corta se reproduce y desarrolla en condiciones climáticas adversas. *Macroscofia* 8: 16-21.
  60. Van Buskirk, J. 2012. <https://www.ieu.uzh.ch/en/research/ecology/change/labprotocols.html>
  61. Pueta, M.; Andaluz Arcos, N. & Perotti, M.G. 2017. El estado de alimentación de renacuajos de *Pleurodema thaul* (Anura: Leptodactylidae) modula la adquisición de un aprendizaje relacionado a riesgo de depredación. *Cuadernos de Herpetología* 31: 83-91.
  62. Taylor, R.C.; Buchanan, B.W. & Doherty, J.L. 2007. Sexual selection in the squirrel treefrog *Hyla squirella*: the role of multimodal cue assessment in female choice. *Animal Behaviour* 74: 1753-1763.

63. Petersen, J.; Cornwell, J. & Kemp, W. 1999. Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems. *Oikos* 85: 3-18.
64. Espinoza, R.E. & Quinteros, S. 2008. A hot knot of toads: Aggregation provides thermal benefits to metamorphic Andean toads. *Journal of Thermal Biology* 33: 67-75.
65. Ferrari, M.C.O.; Messier, F. & Chivers, D.P. 2008. Degradation of chemical alarm cues under natural conditions: risk assessment by larval woodfrogs. *Chemoecology* 17: 263-266.
66. Fordham, D.A. 2015. Mesocosms reveal ecological surprises from climate change. *PLoS Biology* 13: e1002323.
67. Hurlbert, S.H. 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs* 54: 187-211.
68. Bonino, M.F.; Cruz, F.B. & Perotti, M.G. 2020. Does temperature at local scale explain thermal biology patterns of temperate tadpoles? *Journal of Thermal Biology* 94: 102744.
69. Yamashita, M.; Naitoh, T. & Wassersug, R. 2000. Startle response and turning bias in *Micrrohyla* tadpoles. *Zoological Science* 17: 185-189.
70. Robins, A. 2005. Lateralized visual processing in anurans: New vistas through ancient eyes. *Bioscience* 1: 462-473.
71. Lucon-Xiccato, T.; Chivers, D.P.; Mitchell, M.D. & Ferrari, M.C.O. 2017. Prenatal exposure to predation affects predator recognition learning via lateralization plasticity. *Behavioral Ecology* 28: 253-259.
72. Sotelo, M.I.; Bingman, V.P. & Muzio, R.N. 2015. Goal orientation by geometric and feature cues: spatial learning in the terrestrial toad *Rhinella arenarum*. *Animal Cognition* 18: 315-323.
73. Perotti, M.G.; Pueta, M.; Jara, F.G.; Ubeda, C.A. & Moreno Azocar, D.L. 2016. Lack of functional link in the tadpole morphology induced by predators. *Current Zoology* 62: 227-235.
74. Pueta, M.; Cruz, F.B. & Perotti, M.G. 2016. Feeding regime and food availability determine behavioural decisions under predation risk in *Pleurodema thaul* (Anura: Leiuperidae) tadpoles. *The Herpetological Journal* 26: 61-64.
75. Pueta, M. & Perotti, M.G. 2016. Anuran tadpoles learn to recognize injury cues from members of the same prey guild. *Animal Cognition* 19: 745-751.
76. Domjan, M. 2003. Principios de Aprendizaje y Conducta. Thomson, Madrid.
77. Ferrari, M.C.O.; Messier, F. & Chivers, D.P. 2007. First documentation of cultural transmission of predator recognition by larval amphibians. *Ethology* 113: 621-627.
78. Crane, A.L.; Mathis, A. & McGrane C. 2012. Socially facilitated antipredator behavior by ringed salamanders (*Ambystoma annulatum*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66: 811-817.
79. Rankin, C.H.; Abrams, T.; Barry, R.J.; Bhatnagar, S.; Clayton, D.F.; Colombo, J.; Coppola, G.; Geyer, M.A.; Glanzman, D.L.; Marsland, S.; McSweeney, F.K.; Wilson, D.A.; Chun-Fang Wu, C-F. & Thompson, R.F. 2009. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiology of Learning and Memory* 92: 135-138.
80. Ferrari, M.C.O.; Brown, G.E.; Messier, F. & Chivers, D.P. 2009. Threat-sensitive generalization of predator recognition by larval amphibians. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63: 1369-1375.
81. Taylor, R.C.; Klein, B.A.; Stein, J. & Ryan, M.J. 2011. Multimodal signal variation in space and time: how important is matching a signal with its signaler? *The Journal of Experimental Biology* 214: 815-820.
82. Perotti, M.G. & Diéguez, M.C. 2006. Effect of UV-B exposure on eggs and embryos of the Patagonian frog *Pleurodema bufoninum* and evidence of photoprotection. *Chemosphere* 65: 2063-2070.
83. Basanta, M.D. 2011. Determinación, grado de infección y rol ecológico de hongos acuáticos (Oomycetes) en dos poblaciones de *Pleurodema thaul* (Anura, Leiuperidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional del Comahue.
84. Cuello, M.E.; Ubeda, C. & Perotti, M.G. 2005. La rana acuática de Laguna Blanca. *Revista de la Fundación Vida Silvestre Argentina* 93: 21-25.

## Apéndice 4.6.1

2010 - "Año del Centenario de la Revolución de Mayo"



Ministerio de Turismo  
Administración de Parques Nacionales  
Ley N° 22.351

000774

SAN CARLOS DE BARILOCHE, 16 NOV 2010

VISTO, la peligrosidad que las enfermedades "Quitridiomycosis" y "Ranavirosis" representan para las poblaciones de anfibios según consta en el informe que cursa por TIN° 5634/10, y

CONSIDERANDO:

QUE, en el Parque Nacional Nahuel Huapi aún no se ha detectado la mencionada enfermedad, ni tampoco casos de afecciones provocadas por otros agentes patógenos en las poblaciones de anfibios.

QUE, en el Parque Nacional Nahuel Huapi es reservorio de las únicas poblaciones del anfibio microendémico *Atelognathus nitoi* (rana del Challhuaco) y de otros endemismos regionales.

QUE, la ocurrencia de estas enfermedades pondrían en serio riesgo de extinción a las poblaciones de rana del Challhuaco y de las demás especies de anfibios.

QUE, en el Parque Nacional Nahuel Huapi existen los recursos humanos y operativos para garantizar la implementación de medidas tendientes a los cuidados necesarios para evitar que la "Quitridiomycosis" y la "Ranavirosis" ingresen y contagien a las mencionadas poblaciones.

QUE la medida que se adopta halla su sustento legal en las facultades conferidas por Decreto N° 1375/96.

Por ello,

EL INTENDENTE DEL PARQUE NACIONAL NAHUEL HUAPI  
DISPONE:

ARTICULO 1°.- APROBAR la implementación del protocolo "Como desinfectar el material de campo cuando se trabaja en humedales" el cual se adjunta como parte integrante de la misma.

2010 - "Año del Centenario de la Revolución de Mayo"



Ministerio de Turismo  
Administración de Parques Nacionales  
Ley N° 22.351

000774

**Informe: Quitridiomycosis**

Es una enfermedad exclusiva de los anfibios y es causada por el hongo quitridio (*Batrachochytrium dendrobatidis*). Afecta a la piel de sapos y ranas tanto en su etapa de renacuajo como de adulto. Produce lesiones graves en toda la superficie del cuerpo complicándose el cuadro de la enfermedad por la colonización de bacterias, todo lo cual altera la función de la piel como barrera contra toxinas y agentes de infección, en la respiración y en la circulación y mantenimiento del agua de los electrolitos. Los síntomas son aletargamiento, inapetencia y adelgazamiento, seguido por la muerte del individuo.

Esta enfermedad significa un serio riesgo para las poblaciones de anfibios, existiendo numerosos casos de extinciones locales causadas por ella, incluso en Argentina.

El hongo vive en el agua y puede ser transportado accidentalmente en equipos utilizados en cuerpos de agua.

El PNNH es reservorio de las únicas poblaciones del mundo del microendemismo *Atelognathus nitoi* (rana del chalhhuaco) y de poblaciones de endemismos regionales, por ello las acciones para la conservación de la rana del Chalhhuaco y de los anfibios en general es prioritaria y en este sentido se sugieren las siguientes

**recomendaciones:**

1. Evitar el intercambio de equipos para el combate de incendios a otras áreas, especialmente al Parque Nacional Laguna Blanca.
2. Aplicar obligatoriamente el protocolo "Como desinfectar el material de campo cuando se trabaja en humedales" (Sperare et al. 2004. Hygiene protocol for Harding amphibians in field studies), el cual se adjunta como anexo del presente.

Estas recomendaciones fueron sugeridas, y a nuestra solicitud por la Dra. M. Gabriela Perotti de Fotobiología (UN del Comahue-INIBIOMA-CONICET) y la Dra. Romina Ghirardi del Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET-UN del Litoral).

Susan Seijas  
Div. Manejo de Recursos  
Tº N° 5634/10

2010 - "Año del Bicentenario de la Revolución de Mayo"



Ministerio de Turismo  
 Administración de Parques Nacionales  
 Ley N° 22.351

000774

COMO DESINFECTAR EL MAETRIAL DE CAMPO CUANDO SE TRABAJA EN HUMEDALES  
 Protocolo según Speare et al. 2001

Propósito	Desinfectante	Concentración	Tiempo
Desinfección de equipo para combate de incendios y de calzado.	Lavandina doméstica (hipoclorito de sodio)	4%	15 minutos
Desinfección de ropa o telas	Agua caliente	60°C o más	15 minutos

## 4.7 TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS TERMO-FISIOLÓGICOS EN ANFIBIOS

**Eduardo Sanabria<sup>1,2,4</sup>, Lorena Quiroga<sup>1,4</sup>, Luciana Gordillo<sup>1,4</sup>, M. Gabriela Perotti<sup>3,4</sup> & Marcelo Bonino<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía Humanidades y Artes, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, San Juan, Argentina.

<sup>3</sup> Laboratorio de Ecología, Biología Evolutiva y Comportamiento de Herpetozoos, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), CONICET-UNCOMA, Bariloche, Río Negro, Argentina.

<sup>4</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

## La importancia de medir la temperatura corporal

Los organismos ectotermos están fuertemente influenciados por su ambiente térmico, ya que la transferencia de calor entre el organismo y el medio se realiza a través de la superficie de la piel por mecanismos de radiación, convección, conducción y evaporación<sup>(1-3)</sup>. Los primeros tres dependen del gradiente térmico que existe entre la piel y el ambiente, en cambio la pérdida de calor por evapotranspiración sólo depende de la presión de vapor que existe entre la piel y el ambiente<sup>(4)</sup>. La regulación de la temperatura en animales ectotermos, como así también la amplitud de su rango térmico<sup>(5)</sup>, limitan y modifican sus funciones fisiológicas y comportamentales.

Para aquellos animales que presentan como estrategia principal de ganancia energética la heliotermia, tiene especial importancia el patrón y diseño de colores que estos poseen, ya que son capaces de intercambiar calor con el medio, absorbiendo y reflejando la luz solar, manteniendo así el balance térmico requerido<sup>(5,6)</sup>. Por otro lado, muchos ectotermos termorregulan moviéndose entre distintos tipos de microhábitats durante el día y la noche, ajustando de esta manera su temperatura corporal y manteniéndose en un rango óptimo de temperatura<sup>(5,7-10)</sup>. Por ejemplo, la rana *Lithobates catesbeiana*, presenta un mecanismo termorregulador en el cual modifica su posición dentro de los cuerpos de agua, moviéndose desde las orillas (aguas poco profundas) hacia el centro de la laguna (aguas de mayor profundidad), a medida que transcurre la noche y la temperatura disminuye<sup>(11)</sup>. Este comportamiento, se debe a que el recurso energético varía en cantidad y calidad continuamente en el tiempo y espacio<sup>(12)</sup>. Asimismo, el beneficio de mantener una temperatura óptima está limitado por los costos metabólicos que demandaría seleccionar los diferentes ambientes térmicos<sup>(13)</sup>.

La intensidad de la termorregulación puede conceptualizarse como un continuo de estrategias que van desde la regulación activa de la temperatura corporal dentro un rango preciso (especies termorreguladoras), hasta especies que obtienen pasivamente la temperatura del ambiente (termoconformes). La diferencia entre ambas estrategias radica en los costos y beneficios que demanda la termorregulación<sup>(14)</sup>, donde el costo más evidente es el tiempo invertido. La estimación del grado en que las especies termorregulan se realiza mediante el cálculo de índices que integran distintas variables, como las temperaturas ofrecidas por el ambiente, el rango de temperaturas corporales en el campo y el rango de temperaturas preferidas por los individuos<sup>(15)</sup>.

Las temperaturas ofrecidas por un ambiente a microescala corresponden a la distribución nula de las temperaturas que los animales no termorreguladores podrían experimentar, y suelen tomarse con modelos que imitan las



características físicas (como tamaño y conductividad) de la especie en estudio<sup>(16)</sup>. Por otra parte, la temperatura selecta o temperatura preferida<sup>(17)</sup>, la cual se obtiene bajo condiciones de laboratorio, es aquella que los individuos seleccionan sin que existan las restricciones impuestas por el ambiente, y que en muchos casos no se aproxima a la que se obtiene en los registros de campo. La diferencia entre las temperaturas selectas en el laboratorio y las temperaturas registradas en el campo, pueden deberse a que en el laboratorio los costos externos que limitan la termorregulación no están presentes<sup>(18)</sup>. Además, los animales de vida nocturna poseen temperaturas de actividad más bajas que las que se obtienen generalmente en el laboratorio. Este desbalance entre las temperaturas selectas y de campo puede afectar potencialmente el escape de predadores, alimentación, entre otros<sup>(5,10)</sup>.

En anfibios, la termorregulación es principalmente conductual ya que hasta el momento no se ha demostrado la existencia de mecanismos fisiológicos que les permiten generar calor suficiente para elevar su temperatura corporal por encima de la del ambiente<sup>(19)</sup>. Desde el punto de vista ecológico, la selección del microhábitat puede influir en los procesos fisiológicos y en la dinámica de las poblaciones<sup>(20)</sup>. Por lo tanto, uno de los factores ecológicos más importantes que modulan la termorregulación en anfibios es la selección del microhábitat, ya que todo hábitat está formado por un mosaico espacial y temporal de factores bióticos y abióticos en estrecha relación; y debido a esta heterogeneidad ambiental, la ubicación exacta de un organismo determina su eficacia biológica inmediata<sup>(21)</sup>. En general, se considera que los ambientes terrestres son térmicamente más heterogéneos<sup>(22,23)</sup>. Los anfibios, según las etapas de su ciclo de vida, se encuentran ocupando/habitando, tanto ambientes terrestres como acuáticos. Estos ambientes difieren, por ejemplo, los ambientes acuáticos presentan menor heterogeneidad térmica a escalas espaciales pequeñas, respecto a los ambientes terrestres<sup>(24)</sup>, lo cual puede limitar la capacidad de termorregular de los organismos que allí viven. Por un lado, los animales pueden evitar activamente las temperaturas extremas (por ejemplo buscando refugios térmicos), incluyendo en esta categoría a gran número de pequeños mamíferos, reptiles, anfibios e insectos. Por otro lado, los animales pueden resistir las temperaturas impuestas por el ambiente a través de distintos mecanismos, tales como la dormancia diaria o estacional que permite resistir temperaturas adversas y disminuir la tasa de deshidratación<sup>(25)</sup>. En este marco, las preguntas que podemos abordar desde la fisiología térmica son muy amplias, por lo tanto, en el presente compendio intentaremos mostrar las técnicas metodológicas más utilizadas para responder algunas preguntas.

Técnicas comúnmente usadas para determinar parámetros termo-fisiológicos:

- Medición de la temperatura corporal de las especies en estudio
- Relevamiento de la temperatura ambiental a microescala (temperaturas operativas)
- Registro de los extremos térmicos de las especies en estudio
- Determinación de la temperatura seleccionada de las especies en estudio
- Técnicas para conocer la temperatura óptima y sus diferentes parámetros

### 4.7.1 Técnicas utilizadas para la medición de la temperatura corporal

#### 4.7.1a Obtención de la temperatura corporal de manera directa

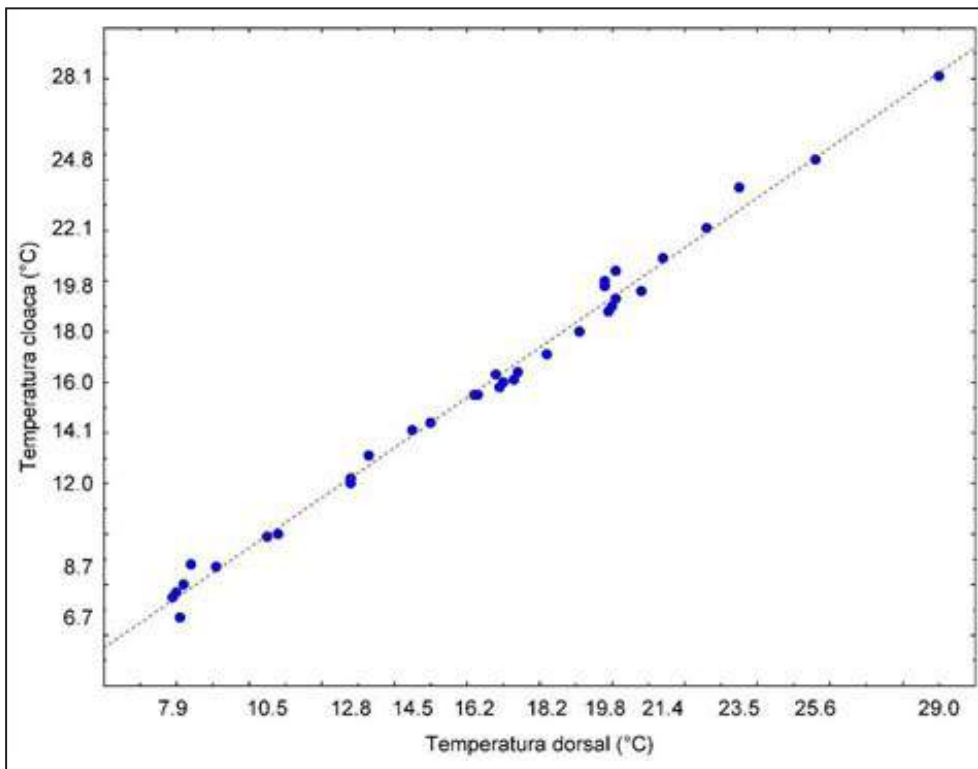
Muchos estudios clásicos tienen como denominador común la obtención de la temperatura corporal de los anfibios durante su actividad<sup>(26,27)</sup>. Los instrumentos utilizados son los termómetros de mercurio (**Figura 4.6.1A**), sin embargo, en la actualidad es más común el empleo de los termómetros electrónicos con una termocupla (**Figura 4.7.1B**). En algunos casos, también se pueden utilizar termómetros infrarrojos (**Figura 4.7.1C**), que no son de contacto directo.

Cuando se trata de anfibios adultos, para la obtención de temperatura corporal durante el periodo de actividad debemos tener en cuenta varias consideraciones. Que el proceso debe realizarse de manera rápida, tomando a los animales por la cabeza, minimizando de este modo el contacto y la transferencia de calor desde el operador al individuo, y descartando las mediciones de animales pequeños y de animales manipulados de manera prolongada. Se debe insertar el bulbo del termómetro de mercurio o la termocupla del termómetro electrónico en el interior de la cloaca del animal, lo cual varía de acuerdo al tamaño del animal y por convención se introduce una porción de la termocupla correspondiente a un 10% del largo hocico-cloaca. Luego debemos esperar que la lectura se estabilice y registrar la temperatura corporal. Este dato, es considerado la temperatura corporal de actividad<sup>(28-31)</sup>.

Las mediciones con termómetros infrarrojos (de no contacto), son comúnmente usadas en investigaciones de laboratorio y campo<sup>(30,32,33)</sup>. Es importante recalcar que antes de tomar los datos con termómetros infrarrojos debemos calibrar la medición, ya que lo que deseamos medir es la temperatura del cuerpo y no la de la piel. Para ello, se debe realizar un modelo lineal entre los valores de la temperatura de la cloaca y los de la piel para luego corregir



**Figura 4.7.1.** Termómetros comúnmente usados para registrar la temperatura corporal. A) Termómetro clásico de mercurio o alcohol. B) termómetro electrónico con termocupla, y C) termómetro infrarrojo el cual no necesita hacer contacto directo con el individuo para registrar la temperatura. Foto: E. Sanabria.

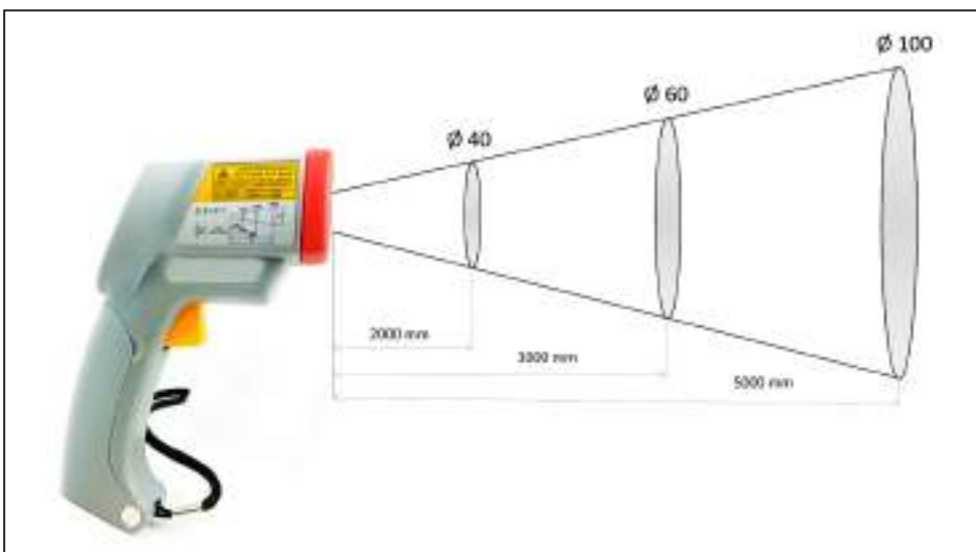


**Figura 4.7.2.** Calibración clásica de un termómetro infrarrojo de no contacto para estimar la temperatura de la cloaca de los sapos estudiados. El modelo matemático resultante es  $\text{Temperatura de cloaca} = -0.42 + 0.98 * \text{temperatura dorsal}^{(34)}$ .

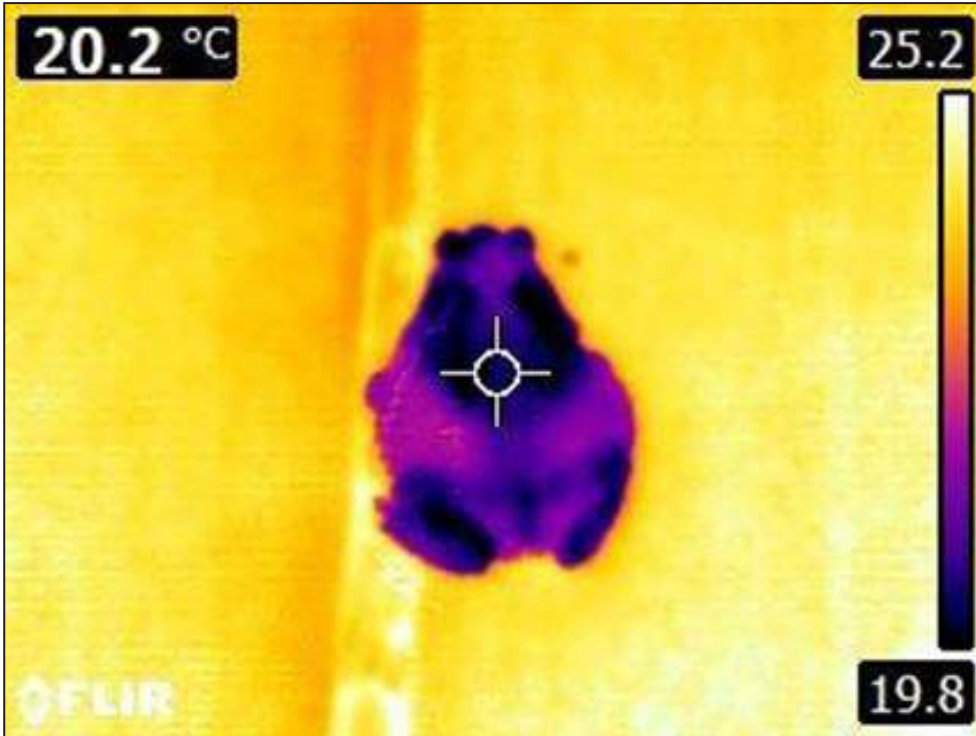
las mediciones (**Figura 4.7.2**). Deben seleccionarse algunos individuos de la especie a estudiar y medirse en ellos, simultáneamente la temperatura de la piel dorsal con un termómetro infrarrojo y la temperatura de la cloaca con un termómetro de mercurio o electrónico con termocupla. Luego se repite la operación bajo diferentes condiciones: si la especie en estudio es diurna los individuos se exponen al sol y a la sombra, con viento y sin viento (éste puede ser artificial), en lugares húmedos y secos, etc. Con estos datos se construye una regresión lineal que ajustará los valores de la temperatura de la piel a la de la cloaca<sup>(34)</sup>. Este método es menos invasivo y apropiado para animales pequeños ya que evita el contacto y manipulación por parte del investigador, disminuyendo el error en las lecturas por efecto de transferencia de calor<sup>(35)</sup>.

Es importante tener en cuenta que los termómetros infrarrojos tienen una relación distancia-superficie que debemos considerar al momento de medir la temperatura. Estos termómetros no establecen una medida lineal, es decir, mientras más alejamos el termómetro de la superficie a la cual deseamos medir la temperatura, la lectura obtenida será mayor (**Figura 4.7.3**).

Por último, existen cámaras térmicas, que pueden ser de video o fotográficas. Las más conocidas son de la marca comercial FLIR®, que nos brindan una imagen con escalas de colores donde a cada pixel de la imagen se le asigna un valor de temperatura (**Figura 4.7.4**). Es importante tener en cuenta que, dependiendo del objetivo de nuestro estudio, tenemos que elegir el número adecuado de pixeles que posee la cámara térmica, ya que esto nos dará una mejor resolución de los datos a la hora de analizarlos. Es evidente que a medida que las características del equipo implican un incremento en el número de pixeles, el coste de estos instrumentos aumenta exponencialmente.



**Figura 4.7.3.** En esta figura podemos observar la relación entre la superficie de medición y la distancia al objeto a medir. Cada equipo tiene en sus especificaciones la relación de medición en sus características de fábrica. Las más típicas son 6:1 y 12:1. Gráfico: E. Sanabria.



**Figura 4.7.4.** Ejemplo de una imagen térmica tomada con una cámara térmica FLIR®. Individuo de *Rhinella arenarum* durante la actividad nocturna, donde se puede observar que está notablemente más frío que el sustrato donde se encuentra. La barra a la derecha de la imagen muestra el rango de temperaturas que se observa en la foto (25.2 a 19.8°C). Foto: E. Sanabria.

En el caso particular que trabajemos con renacuajos, debido a su pequeño tamaño y su fragilidad, resulta virtualmente imposible su manipulación para tomar la temperatura con termómetros de bulbo o digitales provistos de termocupla. Debido a que las larvas de anuros en general tienen pequeño tamaño y a que el agua posee alta conductancia térmica, se comportan de manera isoterma respecto a su ambiente circundante<sup>(36)</sup>. Entonces, la temperatura del agua alrededor de los renacuajos puede considerarse un buen predictor de su temperatura corporal<sup>(36,37)</sup>. En este sentido para estimar la temperatura corporal de larvas, pueden utilizarse termómetros de bulbo o termómetros digitales provistos de termocupla, midiendo la temperatura en el sitio en el que se localiza el ejemplar a monitorear, para ello debe asegurarse la identificación del sitio preciso donde se encuentra el mismo antes de generar un eventual comportamiento de escape.

#### 4.7.1b Determinación de la temperatura corporal de manera indirecta (radio telemetría)

A pesar de que esta técnica nos permite obtener la temperatura corporal de los ejemplares estudiados, sin manipulación y durante largos periodos de tiempo, es poco común que se emplee debido a los altos costos que implica.

En primer lugar, se debe seleccionar el equipamiento adecuado para realizar el trabajo, el cual consta de dos grupos: el equipo receptor y el emisor. El primero se compone de una antena direccional tipo *Yagi* y una base receptora que nos permite decodificar la información recibida (**Figura 4.7.5A**). Las unidades emisoras (**Figura 4.7.5B**) emiten señales en muy alta frecuencia (VHF), que corresponden a una serie de pulsos que cambian su frecuencia en el tiempo dependiendo de la temperatura corporal. Las emisoras presentan en su interior el circuito emisor, una antena y una batería. La vida útil de una emisora depende del tamaño de la batería que posea, y por ende, esto determinará en cierto modo la duración de nuestro estudio. El peso de la emisora no debe superar el 10% del peso del animal en el que se colocará. Es importante aclarar que existe una relación entre el tamaño de la emisora y el tamaño del animal seleccionado, que durante el estudio debe respetarse<sup>(38)</sup>.

Mediante un procedimiento quirúrgico se colocan las emisoras en el interior del animal, y luego de la cicatrización y recuperación el individuo es liberado para comenzar el estudio (para más detalles ver<sup>39</sup>).

Los equipos son adquiridos en diferentes tipos de compañías que ofrecen soporte técnico y múltiples opciones de programas para análisis de datos. A continuación, se nombran algunas de empresas que comercializan estos equipamientos:



**Figura 4.7.5.** A) Equipo de radio telemetría estándar con el que se puede estimar la locación de los individuos y la temperatura corporal de los mismos. B) Unidad emisora con la cual se puede obtener, además, la temperatura corporal de los animales. Foto: E. Sanabria.

- Advanced Telemetry Systems <<http://www.atstrack.com/>>, Estados Unidos.
- Argos <<http://www.argos-system.org/?nocache=0.31222286930643306>>, Francia.
- AVM Instrument Company Inc. <<http://www.avminstrument.com/>>, Estados Unidos.
- Holohill <<http://www.holohil.com/>>, Canadá.
- Lotek Engineering, Inc. <<http://www.lotek.com/>>, Canadá.
- Telenax <<http://www.telenax.com/>>, México.
- Telonics <<http://www.telonics.com/>>, Estados Unidos.
- Wildlife Materials <<http://wildlifematerials.com/>>, Estados Unidos.

## 4.7.2 Técnicas de relevamiento de la temperatura ambiental

Los factores ambientales tienen un rol preponderante en la fisiología de los animales ectotermos. En los anfibios adultos terrestres hay dos variables (temperatura y humedad) que definen las estrategias que estos animales poseen en los diferentes ambientes que colonizan. Las variaciones entre la temperatura y la humedad colocan a los organismos en diferentes escenarios, donde el compromiso entre la termoregulación y la hidrorregulación debe mantenerse balanceado. En el caso particular de las larvas, las variables que dominan su desarrollo y supervivencia son la temperatura y el hidroperiodo (ver apartado sobre **Hidroperiodo**) de los sitios en los que se desarrollan. Dependiendo del objeto y escala de nuestro estudio debemos seleccionar cuidadosamente la técnica para medir la temperatura ambiental. Además, es muy importante la elección adecuada de la técnica para evitar errores de interpretación, o variaciones falsas en nuestros análisis estadísticos.

### 4.7.2a Medición clásica de la temperatura ambiental

Cuando investigamos acerca de la ecofisiología de los organismos y la relación que estos poseen con el medio ambiente, es importante saber que la temperatura ambiental tiene un rol preponderante. Los métodos clásicos para medir la temperatura ambiente son varios y se utilizan una serie de instrumentos manuales o automáticos, detallados a continuación.

### *i. Medición directa de la temperatura ambiental*

Consiste en medir directamente la temperatura ambiente donde se encuentra el animal con un termómetro de mercurio o un termómetro electrónico. En muchos estudios se discriminan dos tipos de medidas de temperatura ambiental. Una de ellas es la temperatura del aire, que generalmente se toma sobre el sustrato en el que se encuentra el animal (suelo desnudo, vegetación, roca). Para realizar esta medición se debe colocar el termómetro a 2 cm por encima del sustrato, aproximadamente; y cuando se estabiliza el lector de temperatura, se procede a tomar el dato.

Otra medida complementaria a la temperatura del aire, es la temperatura del sustrato, la cual se mide por contacto directo del termómetro o la termocupla con la superficie en la que se encuentra el animal. Estos datos ambientales son buenos predictores de las temperaturas corporales y sirven para realizar una aproximación de la estrategia termorreguladora de las especies/poblaciones estudiadas. Por otro lado, son buenos predictores de la situación térmica a microescala, siendo utilizadas como covariables en los análisis estadísticos cuando se quiere desestimar el efecto de las mismas.

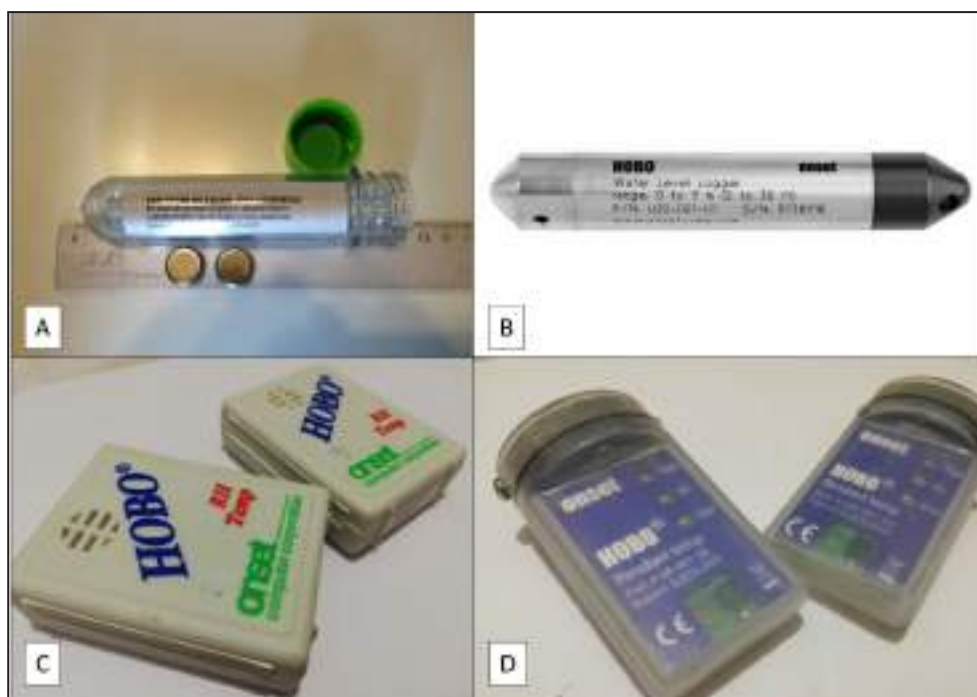
### *ii. Medición indirecta de la temperatura micro-ambiental*

En este caso se utilizan una serie de equipos que registran de manera automática las temperaturas ambientales, y generalmente se obtienen series de datos que nos permiten crear perfiles térmicos de los sitios estudiados.

Estos equipos comúnmente llamados “Data loggers” o “registradores de datos”, son pequeños termómetros automáticos que guardan los datos en una memoria interna. Las marcas comerciales más conocidas de estos equipos son Hobo®, iButton®, entre otros (**Figura 4.7.6A**).

Suele recomendarse colocar este tipo de equipos de a pares, por cada locación monitoreada, debido a que existe una alta probabilidad de perder la secuencia de datos. Muchas veces, los sellos de fábrica no son lo suficientemente buenos para sobrevivir a las inclemencias del tiempo, otras veces las baterías se desgastan antes de lo esperado debido a días fríos y las memorias electrónicas EPROM se borran debido a la falta de energía. Dado lo mencionado, una opción para garantizar la hermeticidad (crucial, si lo que se desea es tomar la temperatura dentro de cuerpos de agua) es colocar los mismos dentro de compartimentos estancos diseñados para ello. Alternativamente se pueden utilizar para tal fin receptáculos herméticos, como tubos de plástico con tapa, comercialmente denominados “envases pet preformados” (**Figura 4.7.6B**). Estos son de bajo costo, y han sido utilizados con éxito con iButton®, permaneciendo éstos intactos por más de un año en lagunas





**Figura 4.7.6.** A) Registradores de temperatura y su correspondiente receptáculo hermético (Foto. M. Bonino). B) registrador de nivel de agua (Foto. M. Bonino). C y D) Diferentes tipos de registradores utilizados para la colección de datos térmicos y de humedad en los sitios de muestreo. Fotos: E. Sanabria.

de alta montaña, incluso bajo el hielo<sup>(40)</sup>. Otros casos particulares para tener en cuenta son el vandalismo o eventos naturales atípicos, como aluviones que pueden ocasionar la pérdida del equipo. Una buena recomendación que puede disminuir la probabilidad de pérdida es, la utilización de etiquetas en las que figure la institución, y al menos un contacto para la devolución del dispositivo.

### iii. Hidroperiodo

Si bien este capítulo se centra en estudios térmicos, y debido a la importancia del hidroperiodo en estudios de campo en los que se censa la temperatura de humedales, hacemos una breve mención de su monitoreo. Además de la temperatura, el hidroperiodo es una variable que condiciona la supervivencia de las larvas y reclutamiento de juveniles de los anfibios en ambientes estacionales<sup>(41)</sup>, y puede influir fuertemente en otros aspectos importantes de su fenología, como la intensidad y duración de los eventos reproductivos<sup>(42,43)</sup>. Por ello esta variable suele ser de sumo interés para estudios que abordan distintos aspectos de la biología de los anfibios. El monitoreo del hidroperiodo puede ser costoso, en términos de esfuerzo, particularmente en lugares remotos y/o de difícil acceso. Por ejemplo, la opción de monitoreo remoto a través de imágenes satelitales no es posible cuando los humedales son de pequeño tamaño. Por ello, la utilización de dispositivos que pueden medir de modo automático la duración del hidroperiodo, podrían considerarse como la mejor opción. En este sentido, existen data loggers diseñados

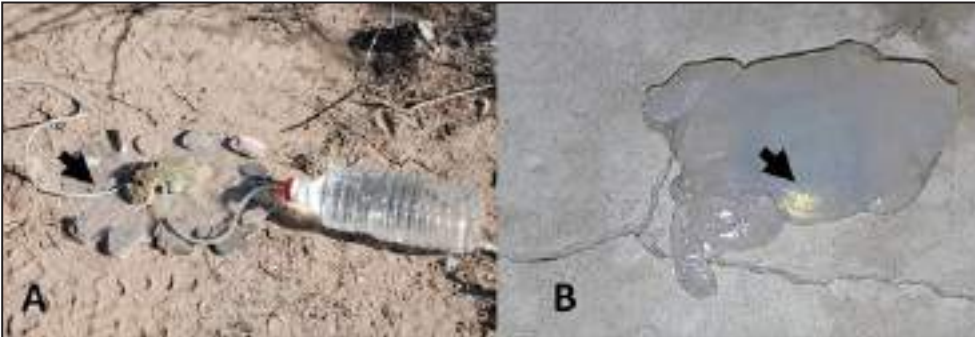
para tal fin (**Figura 4.7.6C**), que pueden ser programados y depositados en los sitios de interés. Estos sensores estiman la profundidad del agua a través de la diferencia de presión que genera el pelo (o la columna) de agua respecto a la presión atmosférica. Por ello debe considerarse que lo óptimo es colocar estos dispositivos de a pares. Esto es, uno se deposita en la parte más profunda del cuerpo de agua, y otro expuesto al aire en la misma área. Cuando no se cuenta con pares, o solo se cuenta con un data logger de estas características, una alternativa consiste en colocar el dispositivo disponible en el cuerpo de agua, y obtener la presión atmosférica de una estación meteorológica cercana a la ubicación de estudio. En este caso debe procurarse que las lecturas sean geográficamente cercanas, sincrónicas y que no haya errores de calibración entre dispositivos.

#### 4.7.2 Modelos físicos nulos en termofisiología

Los modelos físicos son una alternativa para mapear la heterogeneidad térmica de un ambiente a escala muy pequeña. Los mismos copian las características conductivas, convectivas y de radiación de un organismo en ausencia de funciones fisiológicas<sup>(18)</sup>. Los modelos de temperatura operativa se han utilizado para medir el ambiente térmico en múltiples organismos como insectos<sup>(44)</sup>, anfibios<sup>(9,45,46)</sup>, reptiles<sup>(47,48)</sup>, aves<sup>(49)</sup> y mamíferos<sup>(50)</sup>.

Los anfibios son organismos puramente ectotérmicos que dependen de la temperatura ambiental para elevar la temperatura del cuerpo<sup>(5)</sup>, y en el caso de los individuos adultos también dependen de la humedad relativa del ambiente para mantener el balance hídrico corporal<sup>(51)</sup>. En consecuencia, diversos aspectos de la fisiología, desarrollo y comportamiento de los anfibios dependen de la temperatura corporal. De este modo, los modelos físicos se convierten en una herramienta para entender el compromiso que existe entre las temperaturas ambientales y la termorregulación de anfibios, ya que las variaciones regionales en la topografía, velocidad del viento, cobertura de nubes y densidad vegetal, crean a nivel local heterogeneidad en las temperaturas operativas<sup>(18)</sup>.

La evaporación o pérdida de agua a través de la piel es un parámetro que modela la temperatura corporal de los anfibios<sup>(52)</sup>. Por este motivo se han propuesto diversos modelos nulos para medir la temperatura operativa en anfibios<sup>(53-55)</sup>; los mismos poseen como característica común la evaporación del agua a través del material del cual están contruidos (**Figura 4.7.7**). La construcción y calibración de los modelos nulos (**Figura 4.7.8**) es un paso fundamental en el estudio de las variaciones térmicas, ya que la temperatura operativa se define como “la temperatura obtenida de un objeto que no

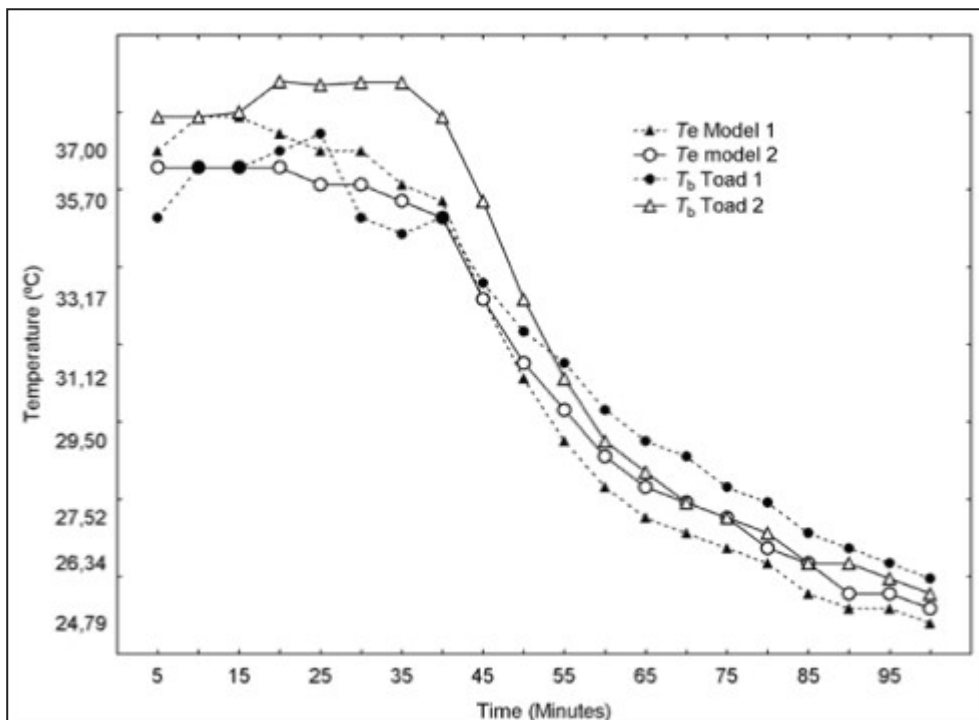


**Figura 4.7.7.** Modelos físicos nulos de dos especies de ranas del Desierto del Monte, **A)** Modelo de yeso de *Rhinella arenarum* con alimentación de agua para mantenerlo con humedad constante y conexión mediante sonda térmica conectada a registrador de datos externo tipo Hobo®<sup>(9)</sup>. **B)** Modelos de Agar-Agar, de la especie *Pleurodema nebulosum*, en el interior se puede ver el registrador de datos automático iButton® (Flecha). Foto: E. Sanabria.

posee capacidad para generar calor y que posee la forma, tamaño y propiedades térmicas de un animal”<sup>(56)</sup>. De este modo, es posible tener un panorama a escala muy pequeña de las variaciones térmicas ambientales desde la perspectiva del animal modelado<sup>(18)</sup>.

### 4.7.3 Técnicas para conocer los extremos térmicos de las especies en estudio

Los extremos térmicos están definidos como “los valores de temperatura a los cuales la actividad locomotora se altera y el animal pierde la habilidad de escape y si esta condición prevalece el animal muere”<sup>(57)</sup>. Existe una defini-



**Figura 4.7.8.** Calibración de los modelos de yeso con evaporación continua en *Odontophrynus occidentalis* del Desierto del Monte<sup>(10)</sup>. En la gráfica se observan las temperaturas de los animales utilizados para la calibración ( $T_b$ ) y la temperatura registrada en los modelos ( $T_e$ ).

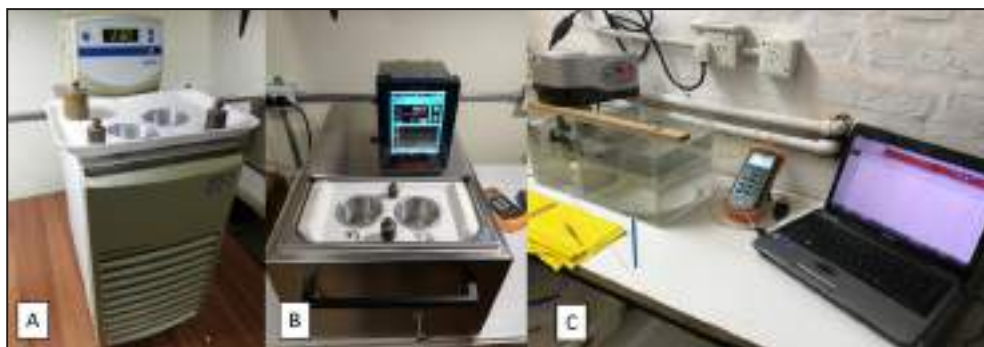
ción alternativa, en la cual se considera que un animal está ecológicamente muerto, es decir que se define el extremo térmico como el valor de temperatura en el que un animal manifiesta espasmos o simplemente la incapacidad de recuperar su postura normal luego de perderla al voltearse<sup>(3)</sup>.

Las temperaturas críticas máximas ( $TC_{m\acute{a}x}$ ) y mínimas ( $TC_{m\acute{i}n}$ ) son parámetros utilizados en numerosos estudios para definir el rango de tolerancia térmica de los animales<sup>(7,58)</sup>. Estos límites se relacionan con los rangos de distribución de las especies, disminuyendo conjuntamente con el aumento de la latitud como así también con la altitud<sup>(19)</sup>. Además, existen diversos estudios que han demostrado que los extremos térmicos están influenciados por factores tales como: el nivel de hidratación de los animales estudiados<sup>(59,60)</sup>, el estado nutricional<sup>(61)</sup>, el fotoperiodo<sup>(62-65)</sup>, la presencia de hormonas en sangre, como la melatonina que disminuye los valores de la  $TC_{m\acute{a}x}$ <sup>(66)</sup>, el estado reproductivo<sup>(67)</sup>, la presencia de contaminantes<sup>(68)</sup> y la presencia de depredadores<sup>(69,70)</sup>.

En general se espera una correspondencia entre los límites de tolerancia y las condiciones térmicas locales, observándose por ejemplo en especies de zonas frías  $TC_{m\acute{i}n}$  incluso por debajo de 0 °C, como es el caso de *Rana sylvatica*<sup>(71)</sup>. Esto es posible gracias a que estos animales poseen una serie de estrategias adaptativas para sobrevivir: 1) la generación metabólica de anticoagulantes (glucosa y glicerol), los cuales permiten disminuir el punto de congelamiento de los fluidos corporales; 2) la alteración de la calidad y la cantidad de agentes nucleantes de hielo en sus cuerpos, logrando disminuir el punto de congelamiento en especies que experimentan súper-enfriamiento, y 3) la tolerancia al congelamiento en especies que poseen la capacidad de sobrevivir con el 60-80% de los líquidos corporales en forma de hielo<sup>(72)</sup>.

Las  $TC_{m\acute{a}x}$  suelen ser menos variables geográficamente que las  $TC_{m\acute{i}n}$ , y su límite suele estar impuesto por el fuerte efecto que las altas temperaturas (cerca de 45 °C) tienen sobre la estabilidad de las proteínas y membranas biológicas<sup>(18)</sup>.

Entre la batería de técnicas disponibles, el método dinámico de Hutchinson<sup>(36,62)</sup> es considerado el más adecuado para la obtención de los límites de tolerancia térmica. En el mismo, los animales son expuestos a una rampa térmica, esto es calentamiento / enfriamiento gradual a una tasa constante. Los equipos utilizados son baños termostáticos que tienen la capacidad de calentar y enfriar los líquidos que se encuentran en él, brindando estabilidad y precisión en el control de la temperatura (**Figura 4.7.9**).



**Figura 4.7.9.** Diferentes tipos de baños termostáticos utilizados para medir la temperatura crítica máxima y mínima. **A y B)** son baños termostáticos frío - calor (Thermo Neslab -USA y Huber - Alemania) con un rango de temperaturas que varía entre los  $-16^{\circ}\text{C}$  a los  $100^{\circ}\text{C}$ . **C)** Termocirculador (Techne TE-10) incluido en pecera y en proceso de calentamiento de temperatura del agua (a una tasa fija de  $^{\circ}\text{C}/\text{tiempo}$ ), donde se aloja a un renacuajo de *Pleurodema thaul*<sup>(70)</sup>. La determinación de la tasa de cambio de temperatura y el registro de  $\text{TC}_{\text{max}}$  es posible mediante el uso del software en computadora asociada al termocirculador. Fotos A y B): E. Sanabria; C): M. G. Perotti.

A continuación, resumimos y describimos las técnicas y procedimientos comúnmente utilizadas para determinar las  $\text{TC}_{\text{máx}}$  y  $\text{TC}_{\text{mín}}$  en animales adultos y en larvas.

#### 4.7.3a Determinación de la temperatura crítica máxima ( $\text{TC}_{\text{máx}}$ )

El procedimiento comienza colocando los individuos dentro de los baños termostáticos que se encontrarán a la temperatura de incubación seleccionada por el investigador. Posteriormente comienza el incremento de temperatura a la tasa seleccionada (ver apartado 4.7.3c) hasta que los animales muestran espasmos musculares o en su defecto no pueden volcarse sobre sí mismos para incorporarse y tomar su posición normal, natural. En el caso particular de los renacuajos se considera que los individuos han alcanzado la  $\text{CT}_{\text{máx}}$  cuando éstos manifiestan espasmos musculares o nado desorganizado; en ese momento se registra la temperatura del agua ya que los renacuajos se comportan de manera isoterma respecto a su ambiente circundante (ver título 4.7.1a sobre la estimación de temperatura en renacuajos). En el caso de la obtención de la  $\text{TC}_{\text{máx}}$ , es posible el empleo de baños termostáticos (ej. Techne TE-10D; **Figura 4.7.9**), que nos permiten establecer las tasas de calentamiento del agua (incremento de temperatura de manera constante) y presentan la posibilidad de llevar un registro continuo de los cambios de la temperatura a través de un software (ThechneWorks PC software) que trabaja con el equipo conectado a una computadora. De este modo se puede controlar la tasa de cambio deseada en la temperatura, y registrar las temperaturas en tiempo real, y determinar  $\text{TC}_{\text{máx}}$ , es decir cuando el organismo registra descoordinación en sus movimientos. Este procedimiento es relativamente sencillo, pero hay que tener especial precaución y estar atentos a los signos que muestran los animales, ya que la  $\text{TC}_{\text{máx}}$  se encuentra a unos pocos grados de la temperatura letal<sup>(18)</sup>. Una vez determinada la  $\text{TC}_{\text{máx}}$  es necesario cerciorarse que los animales se recuperen, ya que si estos mueren posteriormente a la determinación de este parámetro, los valores deben ser descartados.

#### 4.7.3b Determinación de la temperatura crítica mínima ( $TC_{\min}$ )

Este método es similar al anterior, debemos prestar especial atención cuando testeamos especies que viven en latitudes altas o en alta montaña, ya que éstas poseen generalmente valores de  $TC_{\min}$  cercanos a  $0^{\circ}\text{C}$ . Igualmente que en la determinación de  $TC_{\max}$ , se considera que los ejemplares llegan a la  $TC_{\min}$  cuando no pueden volcarse sobre sí mismos cuando son colocados sobre sus espaldas (posición supina) o tomar su posición natural de nado en el caso de los renacuajos.

Esto es técnicamente complejo de determinar ya que los animales pueden mostrar superenfriamiento, y para ello se deben tener en cuenta los siguientes pasos. En el caso de trabajar con ejemplares de anfibios adultos se les debe vaciar la vejiga mediante la utilización de una sonda de silicona. Este procedimiento evita que el líquido almacenado en la vejiga urinaria se congele. La termocupla debe ser fijada al abdomen de los ejemplares mediante pegamento líquido (La gotita®, Poxipol, Argentina; **Figura 4.7.10A**). Es necesario que el monitoreo de la temperatura de los ejemplares sea constante. Para ello se emplean registradores de temperatura que permiten tomar la temperatura corporal de los ejemplares cada 1 segundo, una vez que los mismos se colocan en una cámara a una temperatura inicial que es igual a la temperatura de incubación (**Figura 4.7.10B**). En este tipo de estudios la tasa de disminución de la temperatura es menor que la clásicamente usada y son recomendadas tasas de  $0,5^{\circ}\text{C}/30\text{min}$  o menores<sup>(73)</sup>. Posteriormente, se comienza a monitorear las curvas de descenso de la temperatura de los ejemplares, hasta que aparece la curva exotérmica que se observa en los líquidos súper enfriados (**Figura 4.7.11**). La temperatura más baja justo antes de este fenómeno se denomina temperatura de cristalización<sup>(74)</sup>.

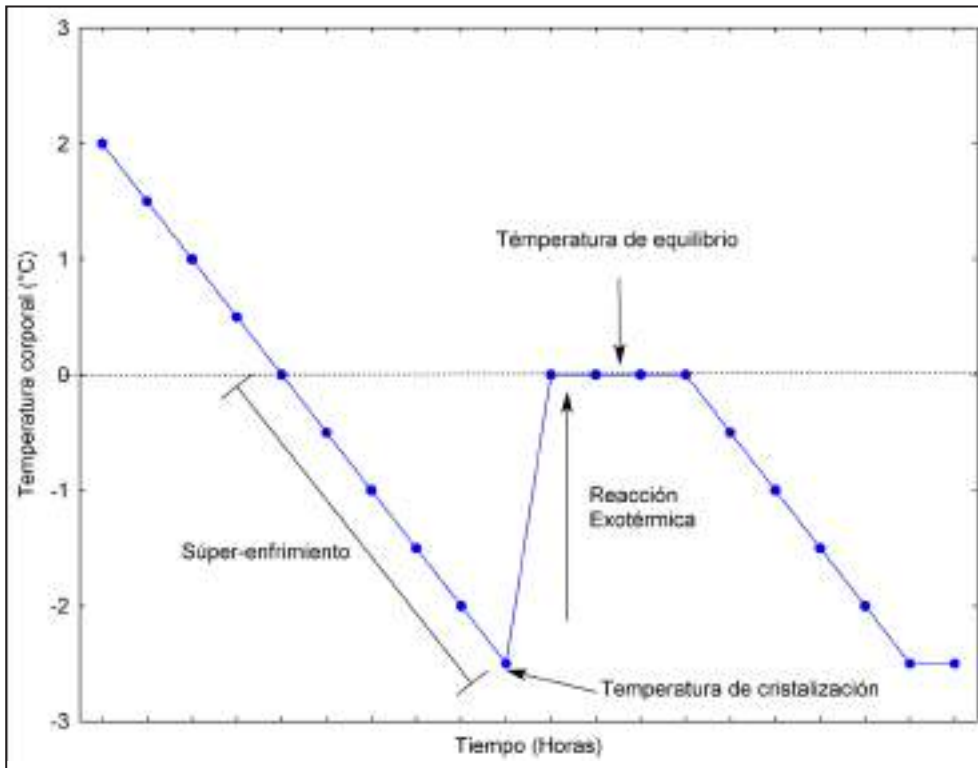
Para el caso particular de los renacuajos, una manera de obtener este parámetro, es montar el experimento en un freezer estándar ( $-18$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Para ello, los renacuajos deben ser colocados en recipientes individuales, (idealmente de vidrio para facilitar la observación de los mismos; **Figura 4.7.12**), con un volumen de agua tal que al colocarlo dentro del freezer se logre la rampa de descenso de temperatura deseada. Mediante un termómetro digital con termocupla, se puede chequear la temperatura con el freezer cerrado. Asimismo, es sumamente importante revisar cada 15 segundos el estado del renacuajo durante la última fase del experimento para garantizar la identificación precisa de la  $TC_{\min}$ . Este método es sencillo y factible, ya que muchos termómetros electrónicos cuentan con la posibilidad de incluir hasta 4 termocuplas a la vez, por lo que se pueden medir varios individuos al mismo tiempo, tomando los recaudos de seguimiento a temperaturas cercanas a la temperatura crítica.



**Figura 4.7.10.** Equipamiento utilizado para determinar las temperaturas críticas mínimas y punto de cristalización. **A)** Forma de anclar la termocupla para evitar gérmenes de cristalización. **B)** Cámaras para la disminución de la temperaturas. Las mismas permiten ver los ejemplares a medida que la temperatura disminuye y evaluar su condición<sup>(39)</sup>. Foto: E. Sanabria.

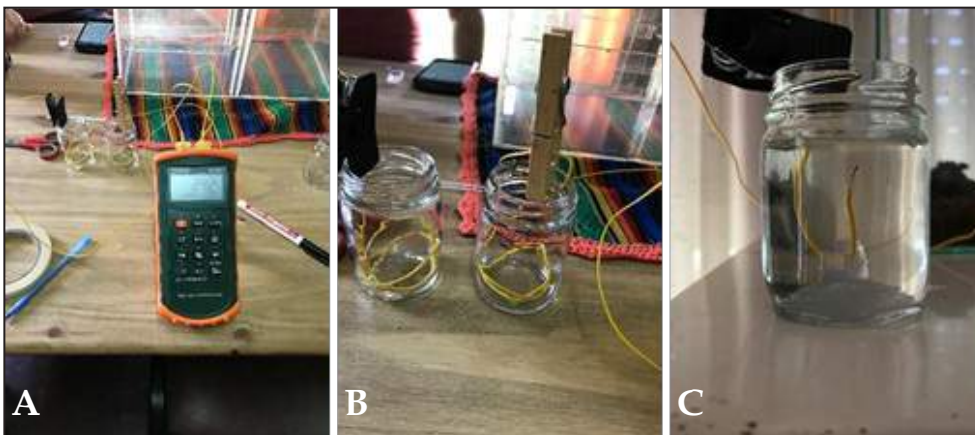
#### 4.7.3c Selección de la rampa térmica (tasa de calentamiento-enfriamiento)

Es importante tener en cuenta, además de la temperatura inicial de la rampa, la tasa de enfriamiento y calentamiento seleccionadas. En general, en el método dinámico de Hutchinson<sup>(36,62)</sup>, la tasa de cambio se suele ajustar en



**Figura 4.7.11.** Esquema de la secuencia de disminución de la temperatura, donde se puede observar la temperatura de cristalización ( $T_{cr}$ ), el ascenso brusco de la temperatura que se acerca a  $0^{\circ}\text{C}$  debido a la aparición de hielo en el organismo, la liberación de calor por este fenómeno (reacción exotérmica) y posteriormente una meseta que se denomina temperatura de equilibrio.

valores muy rápidos (entre  $0,5$  y  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), lo cual se justifica para evitar introducir sesgos en las estimaciones por mecanismos de aclimatación rápida (“hardening”), que puede generar  $TC_{\text{máx}}$  y  $TC_{\text{mín}}$  sobre o sub estimadas respectivamente<sup>(36,75)</sup>. Por otro lado, el empleo de tasas de calentamiento lentas tiene la ventaja de que puede simular un escenario natural de cambio de temperatura, y las estimaciones podrían ser generalizadas en un contexto más ecológico. Asimismo, tasas lentas, simulando las tasas de cambio térmico naturales, implican una mayor duración de los ensayos, lo que puede



**Figura 4.7.12.** A) Termómetro digital, B) termocuplas y C) recipiente empleado para registro de  $TC_{\text{mín}}$  en renacuajos. Fotos: M. G. Perotti.



introducir efectos colaterales (como estrés térmico acumulado, deshidratación, etc.) que inducirían respuestas muy heterogéneas y más difíciles de estandarizar<sup>(75)</sup>. En este sentido, la elección de un protocolo de tasas de calentamiento rápidas, que evite estos efectos distorsionadores y difíciles de controlar, se considera más adecuado en estudios con fines comparativos; de lo contrario, si nuestro interés se centra en conocer el efecto de la temperatura en poblaciones en condiciones naturales (que incluyan estos efectos), podríamos optar por una tasa lenta más realista.

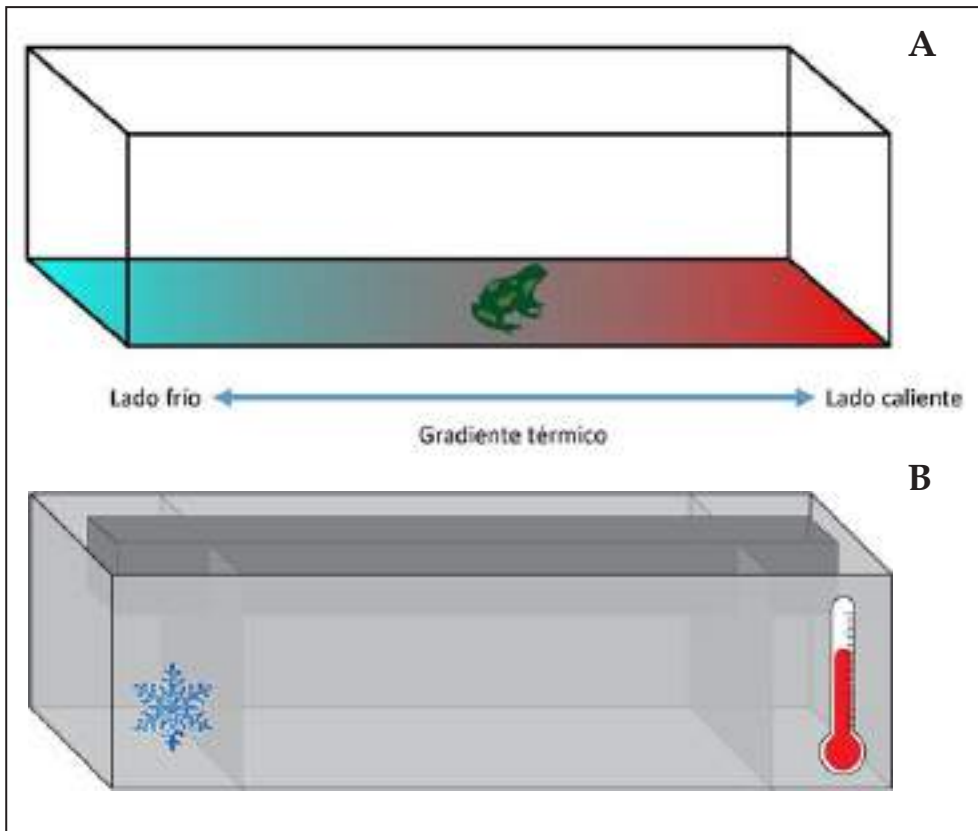
#### 4.7.4 Técnica para determinar la temperatura seleccionada

Como ya se mencionó, muchos anfibios termorregulan moviéndose entre distintos tipos de microhábitats durante el día y la noche, ajustando de esta manera su temperatura corporal y manteniendo un rango óptimo<sup>(5,7,8,11)</sup>. Asimismo, el beneficio de mantener una temperatura óptima está limitado por los costos metabólicos que demanda seleccionar los diferentes ambientes térmicos<sup>(13)</sup>, como así también los riesgos de predación y la pérdida de oportunidades, ya que si un animal gasta mucho tiempo en termorregular, no tendrá tiempo para otras actividades como la alimentación, reproducción, el balance hídrico, entre otras<sup>(5,18)</sup>. Por lo tanto, la principal diferencia entre poseer como estrategia la termorregulación o la termoconformidad son los costos y beneficios que demanda a cada una de las especies. Ser termorregulador o termoconforme son los extremos de un continuo de estrategias, ya que a menudo las especies poseen combinaciones de estas que varían con las estaciones o hábitat utilizados, riesgo de predación, balance hídrico, entre otros<sup>(14,76,77)</sup>.

Con el fin de conocer la temperatura seleccionada o preferida de los anfibios en ausencia de las presiones de predación e interacciones con otros individuos, sumado a un ambiente térmico que brinde todo el espectro térmico que la especie pueda requerir, se utiliza la técnica de gradientes térmicos (**Figura 4.7.13**).

En principio podemos definir a un gradiente térmico lineal, como toda superficie que posibilite un degradé de temperaturas entre dos extremos (caliente y frío). Las temperaturas que se encuentran en los extremos son temperaturas cercanas a las temperaturas críticas máximas y mínimas.

Los gradientes para organismos terrestres generalmente son cajas de madera, vidrio, yeso, entre otros materiales; esto depende del tamaño de la especie a estudiar. Para anfibios anuros de mediano tamaño y no saltadores, los gradientes rondan los 2 metros de largo. Es esencial colocar carriles longitudinales dentro del terrario (gradiente) para individualizar los ejemplares,



**Figura 4.7.13.** A) Esquema de un gradiente térmico lineal en medio terrestre de un solo carril. En los extremos, encontramos las temperaturas mínimas máximas del gradiente y entre estas se produce un gradiente lineal de temperaturas donde el animal selecciona. B) Esquema de un gradiente térmico en medio acuático. Esquema: E. Sanabria.

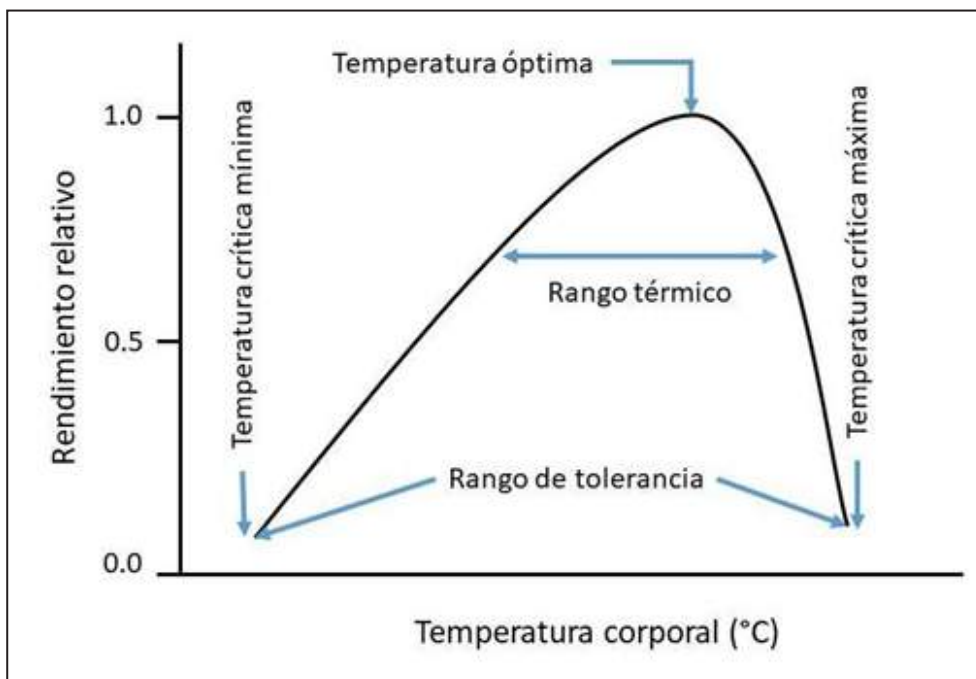
evitando de ese modo las interacciones entre los individuos. Una precaución que es importante tener en cuenta, es mantener el suelo húmedo para evitar la desecación de los animales, ya que esto puede variar la selección térmica. Para el caso de organismos acuáticos, como el caso de las larvas, la construcción de un gradiente lineal suele ser más complicado, dado que cualquier turbulencia o movimiento en el medio acuático puede modificar rápidamente la temperatura en dicho gradiente. Existen distintos diseños de construcción de gradientes acuáticos, como los sistemas de contracorriente, que suelen tener varios metros de longitud. En este apartado nos referiremos a un diseño simple que funciona para organismos de pequeño tamaño como son los renacuajos. El diseño básico consiste en una canaleta de aproximadamente 1 m de largo (metálica para que sea buena conductora de la temperatura) colocada en un baño térmico compartimentado (**Figura 4.7.13B**). En un extremo del baño se coloca hielo, y en el otro, calefactores de acuario; de este modo se generan los extremos de temperatura en el baño, y dentro de la canaleta metálica se establece un gradiente por conducción.

Una vez colocados los animales en el gradiente y previo a un tiempo de aclimatación en él, se inicia con la toma de los datos térmicos. Estos pue-

den hacerse de la manera clásica con termómetro de mercurio o electrónico (véase apartado 4.7.1a), o de manera automática. Es ideal que las temperaturas seleccionadas se registren en el mismo periodo de actividad en que los animales están activos en la naturaleza para evitar cambios en la selección térmica debido a los ciclos circadianos. Por otro lado, es vital que, si los animales son nocturnos, estos registros se hagan en total oscuridad para evitar perturbaciones. En el caso de trabajar en plena oscuridad se ha documentado que el empleo de la luz roja o la utilización de cámaras de visión nocturna, colocadas sobre los gradientes, serían las más adecuadas para este fin (Sañabria, E. datos no publicados).

#### 4.7.5 Técnicas para conocer la temperatura óptima y sus diferentes parámetros

La sensibilidad térmica es el grado en que capacidades biológicas determinadas (velocidad, resistencia, digestión, crecimiento) están influenciadas por la variación de la temperatura<sup>(78-81)</sup>. La sensibilidad térmica se describe frecuentemente con una curva, conocida como curva de rendimiento o desempeño de un organismo en función de la temperatura<sup>(82-84)</sup>. Estas curvas tienen una forma asimétrica, con tendencia a tener su centro desplazado hacia la derecha, donde el rendimiento evaluado cae rápidamente (Figura 4.7.14).



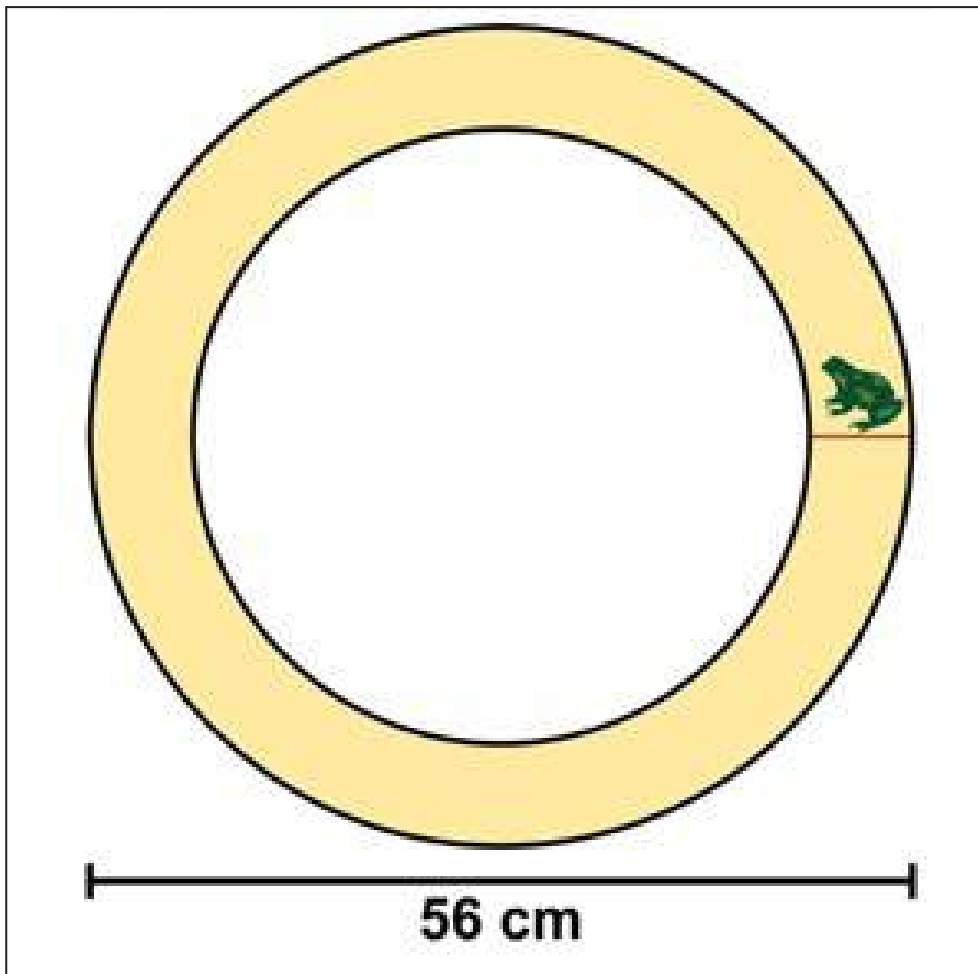
**Figura 4.7.14.** Curva teórica del rendimiento locomotor de un organismo. Temperatura crítica mínima ( $TC_{\min}$ ), Temperatura crítica máxima ( $TC_{\max}$ ), Rango de tolerancia térmica, amplitud del rendimiento térmico (Rango térmico), temperatura óptima (Top), temperatura a la cual el rendimiento medido para dicho organismo es máximo.

Para construir estas curvas generalmente se mide una misma función biológica, por ejemplo la locomoción, a diferentes temperaturas. Generalmente, como punto de partida, se colocan los individuos a la temperatura blanco del ensayo (pudiendo emplearse incubadoras) y se los mantiene a dicha temperatura aproximadamente 1 hora.

Si nuestro objetivo es crear curvas de rendimiento locomotor en adultos, utilizamos un terrario de forma circular (**Figura 4.7.15**), que nos permite mantener la base a la misma temperatura a la que vamos a realizar el ensayo. Posteriormente colocamos el ejemplar en él, y lo ayudamos a caminar dando suaves toques con un pincel en la zona posterior y contamos el número de vueltas que da el individuo en un determinado tiempo. Estos pasos se repiten con todos los individuos y en todas las temperaturas que hemos seleccionado para construir la curva de rendimiento locomotor. Esta técnica conocida como locomoción forzada es comúnmente usada en los estudios de Titon y colaboradores<sup>(65)</sup>, para determinar cómo afecta la deshidratación a las capacidades locomotoras de los anfibios estudiados.

Para evaluar el rendimiento locomotor y construir las curvas con renacuajos, debemos realizar estos ensayos en acuarios, que pueden ser lineales o circulares, en los que se inducirá la natación de los individuos. Un diseño simple consiste en una canaleta de acrílico que constituye “la pista”, inmersa en un acuario de mayor tamaño, que funciona como baño térmico (ver **Figura 4.7.16A**). La temperatura de cada ensayo estará dada por la temperatura del agua, pudiendo utilizarse calefactores de acuario u otros dispositivos provistos con un termostato para mantener la temperatura constante. Para la obtención de la velocidad de natación puede o bien, utilizarse una pista que contenga sensores led y un circuito temporizador conectado a una computadora<sup>(37)</sup>, o realizarse filmaciones en plano cenital y luego obtener las velocidades mediante algún programa de videoanálisis. Para esta última alternativa existen varios software de acceso libre, por ejemplo Tracker© (**Figura 4.7.16B**, <https://physlets.org/tracker/>). Es importante tomar algunos recaudos, ya que facilitarán luego el procesado de los videos para obtener la estimación de las velocidades de natación. En primer lugar, debe procurarse una buena iluminación homogénea evitando la proyección de sombras y reflejos. Otro aspecto importante es utilizar un fondo que contraste con el color de los ejemplares, lo que facilitará que el software logre identificar a los mismos. Finalmente, debe procurarse que, en el campo de imagen, dentro de la pista, no haya objetos que puedan confundir e interferir con el seguimiento del individuo por parte del software.

De este seguimiento se obtendrán una serie de puntos de los que se puede extraer la velocidad de natación máxima alcanzada a cada temperatura, los cuales serán utilizados para ajustar una curva de rendimiento o desempe-



**Figura 4.7.15.** Ejemplo de un terrario circular para la determinación del rendimiento locomotor en anfibios de tamaño medio (~10 cm LHC). Esquema: E. Sanabria.

ño. Las  $TC_{\text{máx}}$  y  $TC_{\text{mín}}$  serán las temperaturas utilizadas como extremos para la construcción de dichas curvas, en las que la velocidad de locomoción es igual a 0 cm/s.

También, podemos crear curvas de rendimiento a través de otras funciones biológicas como el crecimiento (M. Tejedo y colaboradores, datos no publicados) la carga parasitaria (Piñeiro y colaboradores, datos no publicados), entre otros.

Es importante destacar que las curvas de rendimiento nos dan mucha información, ya que no solo nos permiten conocer la temperatura óptima para una determinada función biológica, sino también variables como la amplitud del rendimiento estudiado, pudiendo definir, de esta manera, si la especie en estudio es especialista o generalista en esta función biológica<sup>(86)</sup>.



**Figura 4.7.16.** Arriba (A), set de filmación para evaluar el rendimiento locomotor en renacuajos. Se puede observar una cámara filmadora en posición cenital, el baño térmico constituido por un receptáculo, o “acuario” de mayor tamaño, conteniendo la canaleta de acrílico, que constituye la “pista” (detalle en recuadro superior). Abajo (B), captura de imagen de la interface del software para videoanálisis Tracker©, en el mismo se puede observar (vista cenital) el dispositivo para el ensayo de locomoción de renacuajos, compuesto por: **1)** la pista donde se estimula la natación de los ejemplares (marcada en línea punteada), la misma se encuentra inmersa en **2)** el acuario que funciona como baño térmico en el que se controla la temperatura del ensayo, y **3)** paneles del software que muestran una curva del seguimiento de la velocidad en tiempo real y los valores tabulados de tiempo y velocidad<sup>(37,40)</sup>. Fotos: M. Bonino.

## Bibliografía

1. Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill Publication Co. Baltimore, M. D.
2. Labra, A. & Vidal, M. 2003. Termorregulación en reptiles: un pasado veloz y un futuro lento: 207-224. *En*: Bozinovic, F. (ed.). *Fisiología Ecológica y Evolutiva. Teoría y casos de estudios en animales*. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
3. Hillman, S.; Withers, P.; Drewes, R. & Hollyard, D. 2009. *Ecological and Environmental Physiology of Amphibians*. Oxford University Press. United States of America.
4. Gisolfi, C.V. & Teruel, F.M. 1999. Control y regulación de la temperatura: 1073-1084. *En*: Tresguerres, J.A.F.; de Lugo, E.A.; Cachofeiro, M.V.; Cardiani, D.; Loyzaga, P.G.; Lahera, V.J.; Martínez, J.A.; Teruel, F.M.; Roisin, R.R.; Pardo, M.R.; Menéndez, J.T. & Gutiérrez, P.Z. (eds.). *Fisiología Humana. Segunda Edición*, Editorial Mc. Graw Hill.
5. Zug, G.R.; Vitt, L.G. & Caldwell, J.P. 2001. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academy Press. USA.
6. Sanabria, E.A.; Vaira, M.; Quiroga, L.B.; Akmentins, M.S. & Pereyra, L.C. 2014. Variation of thermal parameters in two different color morphs of a diurnal poison toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae). *Journal of Thermal Biology* 41: 1-5.
7. Stebbins, R.C. & Cohen, N.W. 1995. *A Natural History of Amphibians*. Princeton University Press. USA.
8. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Acosta J.C. 2005. Termorregulación de adultos de *Bufo arenarum* (Hensel, 1867) (Anura: Bufonidae) en diferentes microhábitat de los humedales de Zonda, San Juan, Argentina. *Revista Española de Herpetología* 19: 127-132.
9. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Martino, A.L. 2011. Seasonal changes in the thermoregulatory strategies of *Rhinella arenarum* in the Monte desert, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 36: 23-28.
10. Sanabria, EA, Quiroga, LB & Martino, AL. 2012. Variation in the thermal parameters of *odontophrynus occidentalis* in the Monte desert, Argentina: response to the environmental constraints. *Journal of Experimental Zoology* 317: 185-193
11. Lillywhite, B.H. 1970. Behavioral temperature regulation in the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 40A: 213-227.
12. Tracy, R.C. & Christian, K. 1986. Ecological relations among space, time, and thermal niche axes. *Ecology* 67: 609-615.
13. Lillywhite, B.H.; Licht, P. & Chelgren, P. 1973. The role of behavioral thermoregulation in the growth energetics of the toad, *Bufo boreas*. *Ecology* 54: 375-383.
14. Huey, R.B. & Slatkin, M. 1976. Cost and benefits of lizard thermoregulation. *The Quarterly Review of Biology* 51: 363-384.
15. 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: 796-818.
16. Bakken, G.S. 1992. Measurement and application of operative and standard operative temperatures in ecology. *American Zoologist* 32: 194-216.
17. Somero, G.N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and Comparative Biology* 42: 780-789.
18. Angilletta Jr., M.J. 2009. *Thermal Adaptation a Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford University Press. USA.
19. Brattstrom, B.H. 1968. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comparative Biochemistry and Physiology* 24: 93-111.
20. Smith, G.R. & Ballinger, R.E. 2001. The ecological consequences of habitat and microhabitat use in lizards: A review. *Contemporary Herpetology* 3: 1-37.
21. Pianka, E.P. 1982. *Ecología Evolutiva*. Editorial Omega, S.A. Universidad de Texas, Austin.
22. Spellerberg, I.F. 1972. Temperature tolerances of southwest Australian reptiles examined in relation to reptile thermoregulatory behavior and distribution. *Oecologia* 9: 23-46.
23. Gunderson, A.R. & Stillman, J.H. 2015. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20150401.

24. Sunday, J.M.; Bates, A.E. & Dulvy, N.K. 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 1823-30.
25. Ward, D. 2009. *The Biology of Desert*. Oxford University Press Inc. New York.
26. Brattstrom, B.H. 1963. A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology* 44: 238-255.
27. Lillywhite, H.B.; Mittal, A.J.; Garg, T.K. & Das, I. 1998. Basking behavior, sweating and thermal ecology of the indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *Journal of Herpetology* 32: 169-175.
28. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Acosta, J.C. 2003. Ecología térmica de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) en los bañados de Zonda, San Juan, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 17: 121-123.
29. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Acosta, J.C. 2003. Ecología térmica de una población de *Bufo arenarum* (Anura: Bufonidae) en un humedal del centro-oeste de argentina. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 11: 33-41.
30. Navas, C.A.; Carvajalino-Fernández, J.M.; Saboyá-Acosta, L.P.; Rueda-Solano, L.A. & Carvajalino-Fernández, M.A. 2013. The body temperature of active amphibians along a tropical elevation gradient: patterns of mean and variance and inference from environmental data. *Functional Ecology* 27: 1145-1154.
31. Sanabria, E.A. & Quiroga, L.B. 2019. The body temperature of active desert anurans from hyper-arid environment of South America: The reliability of WorldClim for predicted body temperatures in anurans. *Journal of Thermal Biology* 85: 102-398.
32. Solano, L.A.R.; Navas, C.A.; Carvajalino-Fernández, J.M. & Amézquita, A. 2016. Thermal ecology of montane *Atelopus* (Anura: Bufonidae): A study of intrageneric diversity. *Journal of Thermal Biology* 58: 91-98.
33. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B.; Gonzalez, E.; Moreno, D. & Cataldo, A. 2013. Thermal parameters and locomotor performance in juvenile of *Pleurodema nebulosum* (Anura: Leptodactylidae) from the Monte Desert. *Journal of Thermal Biology* 38: 390-395.
34. Sanabria, E.A.; Rodríguez, C.Y.; Vergara, C.; Ontivero, E.; Banchig, M.; Navas, A.L.; Herrera-Morata, M.A. & Quiroga, L.B. 2015. Thermal ecology of the post—metamorphic Andean toad (*Rhinella spinulosa*) at elevation in the monte desert, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 52: 52-57.
35. Rowley, J.J.L. & Alford, R.A. 2007. Non-contact infrared thermometers can accurately measure amphibian body temperatures. *Herpetological Review* 38: 308-316.
36. Lutterschmidt, W.I. & Hutchison, V.H. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1561-1574.
37. Perotti, M.G.; Bonino, M.F.; Ferraro, D. & Cruz, F.B. 2018. How sensible are cold temperate tadpoles to climate change? Combining thermal physiology and niche models. *Zoology* 127: 95-105.
38. Gallina Tessaro, S. & López González, C. 2011. *Manual de Técnicas para el Estudio de la Fauna*. Universidad Autónoma de Querétaro e Instituto de Ecología. AC México.
39. Sinsch, U. & Leskovar, C. 2011. Does thermoregulatory behaviour of green toads (*Bufo viridis*) constrain geographical range in the west? A comparison with the performance of syntopic natterjacks (*Bufo calamita*). *Journal of Thermal Biology* 36: 346-354.
40. Bonino, M.F.; Cruz, F.B. & Perotti, M.G. 2020. Does temperature at local scale explain thermal biology patterns of temperate tadpoles? *Journal of Thermal Biology* 94: 102744. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102744>.
41. Perotti, M.G.; Jara, F.G. & Úbeda, C.A. 2011. Adaptive plasticity of life-history traits to pond drying in three species of Patagonian anurans. *Evolutionary Ecology Research* 13: 415-429.
42. Rowe, C.L. & Dunson, W.A. 1995. Impacts of hydroperiod on growth and survival of larval amphibians in temporary ponds of Central Pennsylvania, USA. *Oecologia* 102: 397-403.
43. Amburgey, S.; Funk, W.C.; Murphy, M. & Muths, E. 2012. Effects of hydroperiod duration on survival, developmental rate, and size at metamorphosis in Boreal Chorus Frog tadpoles (*Pseudacris maculata*). *Herpetologica* 68: 456-467.
44. O'Neill, K.M.; Street, D. & O'Neill, R.P. 1994. Scavenging behavior of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae): feeding and thermal response to newly available resources. *Physiological and Chemical Ecology* 23: 1260-1268.



45. Navas, C.A. 1996. Thermal dependency of field locomotor and vocal performance of high-elevation anuran in the tropical Andes. *Journal of Herpetology* 30: 478-487.
46. Rodríguez, C.Y.; Bustos, D.A. & Sanabria, E.A. 2019. Adaptation of the Andean Toad *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) at low temperatures: The role of glucose as cryoprotectant. *Physiological and Biochemical Zoology* 92: 473-480.
47. Medina, M.; Gutierrez, J.; Scolaro, A. & Ibarguengoytía, N. 2009. Thermal response to environmental constraints in two populations of the oviparous lizard *Liolaemus bibronii* in Patagonia, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 34: 32-40.
48. Ibarguengoytía, N.; Medina, M.; Fernández, J.B.; Gutiérrez, J. A.; Tappari, F. & Scolaro, A. 2010. Thermal biology of the southernmost lizard in the world: *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus* from Patagonia, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 35: 21-27.
49. Weathers, W.W. & Sullivan, K.A. 1993. Seasonal patterns of time and energy allocation by birds. *Physiological Zoology* 66: 511-536.
50. Bozinovic, F.; Lagos, J.A.; Vasquez, R.A. & Kenagy, G.J. 2000. Time and energy use under thermoregulatory constraints in diurnal rodent. *Journal of Thermal Biology* 25: 251-256.
51. Tracy, R.C. 1976. A model of the dynamic exchange of water and energy between a terrestrial amphibian and its environment. *Ecological Monographs* 46: 293-326.
52. Tracy, R. 1976. A model of the dynamic exchange of water and energy between a terrestrial amphibian and its environment. *Ecological Monographs* 46: 293-326.
53. Navas, C.A. & Araujo, C. 2000. The use of agar models to study amphibian thermal ecology. *Journal of Herpetology* 32: 330-334.
54. Bartelt, P.E. & Peterson, C.R. 2005. Physically modeling operative temperatures and evaporation rates in amphibians. *Journal of Thermal Biology* 30: 93-102.
55. Tracy, R.C.; Betts, G.; Tracy, R.C. & Christian, K.A. 2007. Plaster models to measure operative temperature and evaporative water loss of amphibians. *Journal of Herpetology* 41: 597-603.
56. Dzialowski, E.M. 2005. Use of operative temperature and standard operative temperature models in thermal biology. *Journal of Thermal Biology* 30: 317-334.
57. Cowles, R.B. & Bogert, C.M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Iguana* 83: 261-296.
58. Huey, R.B. & Stevenson, R.D. 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A discussion of approaches. *American Zoology* 19: 357-366.
59. Pough, F.H. & Wilson, R.E. 1970. Natural daily temperature stress, dehydration, and acclimation in juvenile *Ambystoma maculatum* (Shaw) (Amphibia: Caudata). *Physiology and Zoology* 43: 194-205.
60. Claussen, D. 1969. Thermal acclimation in ambystomatid salamanders. *Comparative Biochemistry and Physiology* 58A: 333-340.
61. Cupp, P. 1980. Thermal tolerance of five salientian amphibians during development and metamorphosis. *Herpetologica* 36: 234-244.
62. Hutchinson, V.H. 1961. Critical thermal maxima in salamanders. *Physiological Zoology* 2: 92-125.
63. Hutchison, V.H. & Kosh, R.J. 1964. The effect of photoperiod on the critical thermal maxima of painted turtles (*Chrysemys picta*). *Herpetologica* 20: 233-238.
64. Hutchison, V.H. & Ferrance, M.R. 1970. Thermal tolerances of *Rana pipiens* acclimated to daily temperature cycles. *Herpetologica* 23: 1-8.
65. Sanabria, E.A. & Quiroga, L.B. 2011. Change in the thermal biology of tadpoles of *Odontophrynus occidentalis* from the Monte desert, Argentina: Responses to photoperiod. *Journal of Thermal Biology* 36: 288-291.
66. Erskine, D.J. & Hutchison, V.H. 1982. Reduced thermal tolerance in an amphibian treated with melatonin. *Journal of Thermal Biology* 7: 121-123.
67. Sanabria, E.A. & Quiroga, L.B. 2011a. Thermal parameters changes in males of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) related to reproductive periods. *Revista de Biología Tropical* 59: 347-353.
68. Quiroga, L.B.; Sanabria, E.A.; Fornés, M.W.; Bustos, D.A. & Tejedo, M. 2019. Sublethal concentrations of chlorpyrifos induce changes in the thermal sensitivity and tolerance of anuran tadpoles in the toad *Rhinella arenarum*? *Chemosphere* 219: 671-677.
69. Katzenberger, M.; Hammond, J.; Duarte, H.; Tejedo, M.; Calabuig, C.; Relyea, R.A.; 2014.

- Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. *PlosOne* 9: e98265.
70. Miloch, D.; Leynaud, G.C.; Bonino, M.; Lescano, J.N.; Cruz, F.B.; Perotti, M.G. 2019. Los depredadores afectan la fisiología térmica de larvas de anuros? Estudio experimental en dos especies del género *Pleurodema*. XX Congreso Argentino de Herpetología. 15-18 de octubre de 2019, San Juan, Argentina.
  71. Manis, M.L. & D.L.; Claussen. 1986. Environmental and genetic influences on the thermal physiology of *Rana sylvatica*. *Journal of Thermal Biology* 11: 31-36.
  72. Hill, R.; Wyse, G. & Anderson, M. 2006. Fisiología Animal. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
  73. Costanzo, J.P.; Lee, R.E. & Wright, M.F. 1991. Effect of cooling rate on the survival of frozen wood frogs. *Journal of Comparative Physiology B* 161: 225-229.
  74. Costanzo, J.P. & Lee, R.E. 2013. Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates. *Journal of Experimental Biology* 216: 1961-1967.
  75. Tejedo, M.; Duarte, H.; Guiérrez-Pesquera, L.M.; Beltran, J.F.; Katzenberger, M.; Marangoni, F.; Navas, C.A.; Nicieza, A.G.; Relyea, R.A.; Rezende, E.L.; Richter-Boix, A.; Santo, M.; Simon, M. & Solé, M. 2012. El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 23: 2-27
  76. Tracy, R.C.; Christian, K.A.; O'Connor, M.P. & Tracy, C.E. 1993. Behavioral thermoregulation by *Bufo americanus*: The importance of the hydric environment. *Herpetologica* 49: 375-382.
  77. Herczeg, G.; Herrero, A.; Saarikivi, J.; Gonda, A.; Jäntti, M. & Merilä, J. 2008. Experimental support for the cost-benefit model of lizard thermoregulation: the effects of predation risk and food supply. *Oecologia* 155: 1-10.
  78. Crowley, S.R. 1985. Thermal sensitivity of sprint-running in the lizard *Sceloporus undulatus*: support for a conservative view of thermal physiology. *Oecologia* 66: 219-225.
  79. van Berkum, F.H.; 1986. Evolutionary patterns of the thermal sensitivity of sprint speed in *Anolis* lizards. *Evolution* 40: 594-604.
  80. Hochachka, P.W. & Somero, G.N. 1973. Strategies of Biochemical Adaptation. WB Saunders, Philadelphia.
  81. Pörtner, H.O. 2012. Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Marine Ecology Progress Series* 470: 273-290.
  82. Huey, R.B. & Stevenson, R.D. 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. *American Zoologist* 19: 357-366.
  83. Huey, R.B. & Hertz, P.E. 1984. Is a jack-of-all-temperatures a master of none? *Evolution* 38: 441-444.
  84. Marvin, G.A. 2003. Aquatic and terrestrial locomotor performance in a semiaquatic plethodontid salamander (*Pseudotriton ruber*): influence of acute temperature, thermal acclimation, and body size. *Copeia* 2003: 704-713.
  85. Titon Jr., B. ; Navas, C.A.; Jim, J. & Gomes, F.R. 2010. Balance hídrico y rendimiento locomotor en tres especies de sapos neotropicales que difieren en distribución geográfica. *Bioquímica Comparativa y Fisiología A: Fisiología molecular e integrativa* 156: 129-135.
  86. Gilchrist, G.W. 1995. Specialist and generalist in changing environments. 1. Fitness landscapes of thermal sensitivity. *American Naturalist* 146: 252-270.

#### 4.8 REGISTRO DE ANORMALIDADES MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS EN ADULTOS Y LARVAS DE ANFIBIOS ANUROS

**Paola M. Peltzer<sup>1,2</sup>, Lucila M. Curi<sup>2,3</sup>, Andrés M. Attademo<sup>1,2</sup>, Ana P. Cuzziol  
Boccioni<sup>1,2</sup> & Rafael C. Lajmanovich<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425F-QB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (FCV, UNNE), Sargento Cabral 2139, (CP: 3400) Corrientes, Argentina.

Los anfibios son un grupo de vertebrados que al presentar características fisiológicas y etológicas como permeabilidad de la piel (pudiendo absorber los contaminantes a través de ella), persistencia en una gran variedad de hábitats, ciclo de vida (bifásico), pertenencia al mismo lugar de eclosión, pueden ser utilizados como organismos centinelas<sup>(1)</sup> y son considerados buenos indicadores de salud ambiental. Los agentes físico químicos (radiación U-V, pH, metales) y xenobióticos (herbicidas, insecticidas, fungicidas, hormonas, residuos de medicamentos) pueden afectar su homeostasis y normal desarrollo durante sus diferentes estadios embrionarios, larvales y también en la fase terrestre que muchas especies desarrollan en su vida adulta<sup>(2,3)</sup>. Se ha demostrado que estos agentes pueden alterar parámetros biológicos como el crecimiento y desarrollo<sup>(4-6)</sup>, metabolismo<sup>(7,8)</sup>, comportamiento<sup>(9-12)</sup>, morfología externa<sup>(13,14)</sup>, entre otros.

En referencia a las alteraciones en la morfología externa, dentro de los anfibios, los registros de anormalidades/malformaciones se han centrado principalmente en Anuros, y escasos son los datos existentes en Urodelos<sup>(15)</sup>.

Ante el actual escenario de declive al que están sometidas las poblaciones de Anfibios, el registro de anormalidades constituye una herramienta útil para determinar alguna posible respuesta ante un estresor ambiental utilizando estos individuos como organismos modelo, ya sea en condiciones naturales o en estudios de laboratorio.

En primera instancia, cabe aclarar el significado de algunos términos. Una “malformación” es definida como una desviación de la morfología normal como resultado de un desarrollo impropio, ante la exposición a teratógenos, o debido a anomalías genéticas<sup>(16)</sup>. Por otro lado, el término “anormalidad”, se refiere a una desviación de la morfología normal independientemente de cuál sea el origen ya sea durante el desarrollo o adquirido luego del mismo<sup>(16)</sup>. Meteyer<sup>(17)</sup> incluye el término “deformaciones” para indicar a aquellas anormalidades externas producidas por amputación como es el caso de los traumas por depredación de un ave. En esta sección se utilizará el término *anormalidades*.

A pesar de que existen numerosos artículos y revisiones científicas en relación a las anormalidades registradas en los anuros y sus posibles causas<sup>(15,16,18-20)</sup>, no existe un consenso general en la vinculación causa-efecto. Se pueden enumerar muchos factores como causantes de las anormalidades observadas en poblaciones silvestres de anuros. Lannoo<sup>(21)</sup> las clasifica en naturales y no naturales (causadas por el hombre o antrópicas).

Entre las primeras se mencionan:

**-Radiación U-V:** puede afectar a individuos expuestos desde estadios embrionarios o larvales de anuros<sup>(22-25)</sup>. Los efectos de la radiación U-V son analizados y descritos por Lannoo<sup>(21)</sup>.

**-Traumas y/o depredación:** puede afectar a individuos en estadios larvales y/o adultos. Como se mencionó anteriormente, estos traumas son definidos como “*deformidades*”, en las cuales, por acción mecánica el individuo sufre la pérdida de alguna parte de su cuerpo, y suele ser muy común en los bufónidos. Esta causa puede ser motivo de numerosas anormalidades observadas en campo (falta de miembros o de segmentos de los mismos, etc.). Sin embargo, muchas de ellas no son tan simples de reconocer<sup>(26-28)</sup>. En este contexto, Lannoo<sup>(21)</sup> describe ciertas características que permiten su identificación, como por ejemplo, la observación de cicatrices o apariencia de tejido regenerado.

**-Infección parasitaria por tremátodes:** el ejemplo más estudiado es la infección parasitaria de *Ribeiroia ondatrae* y las malformaciones en adultos que ocasiona el enquistamiento de la metacercaria en los estadios larvales de anuros, en ambientes con altas concentraciones de fósforo y nitrógeno (ambientes eutróficos) que favorecen la presencia de un hospedador intermedio como son los planórbidos o caracoles planos<sup>(29-32)</sup>. En Argentina, hasta el momento no se ha hallado este parásito en anfibios (Cynthia González, *com. pers.*) y por lo tanto, aparentemente no sería una causa de anormalidades en nuestro país.

**-Otros factores:** deficiencias nutricionales como el calcio y fósforo con la ingesta de ítems-presa; alta densidad larvaria que favorecen el canibalismo, temperaturas extremas<sup>(21)</sup>; infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que causan principalmente anormalidades en disco oral de larvas<sup>(33,34)</sup>; entre otros.

En el segundo grupo, de naturaleza antrópica, se pueden citar las siguientes causas:

**-Exposición a xenobióticos (herbicidas, fungicidas, insecticidas, hidrocarburos) y/o otras sustancias químicas emergentes (antibióticos, productos de aseo personal):** estos compuestos pueden afectar los estadios larvales y adultos<sup>(3,35-37)</sup>. Los agroquímicos son uno de los factores causales más estudiados ya que pueden afectar el normal desarrollo de renacuajos e incrementar la susceptibilidad a la infección por patógenos o a la radiación UV<sup>(37-39)</sup>.

**-Disrupción de la vía del ácido retinoico (AR):** esta sustancia tiene su origen a partir de la vitamina A (o retinol) y está involucrada en diversos procesos que ocurren durante la embriogénesis de los vertebrados. Existen evidencias que muestran que excesos o deficiencias en la concentración endógena de AR, causan anormalidades en aves y anuros<sup>(40,41)</sup>. Se ha demostrado que algunos herbicidas como el glifosato alteran la vía del AR (incrementa

la actividad endógena) lo que genera alteraciones en la expresión de genes importantes que actúan durante el desarrollo temprano de crestas neurales, formación de elementos de la línea media dorsal y desarrollo cefálico del embrión de *Xenopus laevis*<sup>(42)</sup>. Teglia et al.<sup>(43)</sup> demostraron cambios en los niveles plasmáticos de AR en individuos adultos de *Leptodactylus macrosternum* colectados en áreas cultivadas con arroz, probablemente como respuesta a la exposición de plaguicidas.



-**Otras causas:** exposición a metales<sup>(44,45)</sup>, acidificación<sup>(21)</sup>, entre otras.

## Metodologías para determinación de anormalidades



En la **Tabla 4.8.1** se mencionan y ejemplifican los métodos que se utilizan para determinar anormalidades en anfibios anuros. La elección de cada metodología dependerá de los objetivos particulares del estudio. En general, podemos distinguir metodologías para aplicar en el campo (inspecciones visuales) o en laboratorio (mediante lupas estereoscópicas, radiografías de estructuras osteo-condrales, diafanización y tinción diferencial de huesos y cartílagos, disección e histología de órganos) (ver descripción de cada una en **Tabla 4.8.1**).

Para la clasificación de las anormalidades se puede consultar una serie de referencias bibliográficas específicas para anuros, ya sea adultos<sup>(46-48)</sup> o renacuajos<sup>(12,49,50)</sup>. Es necesario aclarar que el uso de individuos provenientes de colecciones y/o museos presenta una serie de desventajas: despigmentación, en algunos casos la geolocalización no existe o no es exacta, pueden existir irregularidades en la morfología por ausencia de una técnica de fijación adecuada o efectos propios de los fijadores. Por ejemplo, la fijación con solución de Bouin enmascara la coloración, y el formaldehído luego de 5-10 años produce diferencias en longitud y peso corporal notables<sup>(51)</sup>. En este sentido, en Argentina se realizó un relevamiento de anormalidades de anfibios pertenecientes a la colección herpetológica de la Fundación Miguel Lillo, Tucumán<sup>(52)</sup>. Los autores mencionan que las anormalidades más frecuentes ocurren en miembros, como por ejemplo reducción en número de falanges.


Por otro lado, los estadios larvales de los anuros se consideran períodos críticos en el desarrollo, ya que los sistemas de órganos se desarrollan y diferencian durante esta etapa<sup>(73)</sup>. Los estudios ecotoxicológicos que utilizan estadios larvales de anuros, son importantes porque permiten conocer si ciertos procesos que ocurren durante este periodo se ven afectados por exposición a compuestos químicos (véase distintos biomarcadores en la **Sec-**

Métodos	Descripción/Comentarios	Autores/ descripción
<p>INSPECCIONES VISUALES</p> 	<p>Para determinar anomalías comunes de tipo esqueléticas y morfológicas externas en adultos. No es necesario la eutanasia y se pueden realizar a campo (captura manual o trampas de caída viva). Se debe inspeccionar dorsal y ventralmente los individuos, estirando los miembros para observar el largo de los huesos, falanges, etc. Se recomienda usar guantes de látex. Conjuntamente con los registros de rutina como el peso, longitud, sexo (si es evidente), se pueden tomar fotografías utilizando cámaras digitales. Las fotografías deben ser generales y de las partes afectadas (con mayor aumento). Acompañar las mismas con un objeto que sirva de escala (moneda, lápiz) para su ulterior medición y escalamiento. En el caso de fotografía nocturna, se deben utilizar linternas u otro medio que emita luz artificial para iluminar el individuo y que la cámara pueda enfocar. En el caso de la iluminación durante el día, será suficiente con un flash compacto sobre la cámara para aclarar las sombras.</p>	<p>26, 48,53, 54</p>
<p>LUPAS ESTEREOSCÓPICAS</p> 	<p>Para observación de renacuajos, juveniles y adultos. En muchos casos se realiza la disección bajo lupa para observar detalles de órganos internos. Para renacuajos puede utilizarse una caja de Petri con parafina de color sólida que sirva de constrate. Se sugiere utilizar en las fotografías algún elemento de escala (regla, calibre, papel milimetrado). Son preferibles las fotografías realizadas previa a la fijación, por el realismo de los colores. Una vez diseccionados los ejemplares pueden encontrarse además de anomalías, la presencia de parásitos adheridos a los órganos blandos o piel (véase sección 4.9). Por lo que resulta interesante, preservarlos para un potencial análisis de su relación anomalías-parásitos<sup>(65)</sup>.</p>	<p>56, 57,58,59</p>

**Tabla 4.8.1.** Resumen de los principales métodos para determinar anomalías en anuros. Se incluye un breve resumen y comentario acerca de los mismos y referencias bibliográficas de autores que lo utilizaron o describieron la técnica (\*). Fotos: P. M. Peltzer.

<p><b>RADIOGRAFIAS DE ESTRUCTURAS OSTEO-CONDRALES</b></p> 	<p>Se utiliza para determinación de anomalías en miembros en adultos (apendiculares). Los equipos a utilizar pueden ser aquellos utilizados por dentistas, o medicina nuclear tanto para el hombre como para pequeños y grandes animales. No es necesaria la eutanasia, pero sí su aletargamiento con agua refrigerada o anestésicos locales como lidocaina o MS22. Una vez recuperado el animal se puede devolver al ambiente de captura.</p>	<p>47,60,61,62, 63</p>
<p><b>DIAFANIZACIÓN Y TINCIÓN DIFERENCIAL DE HUESOS Y CARTÍLAGOS</b></p> 	<p>Se puede aplicar en renacuajos, juveniles y adultos. Útiles para identificar malformaciones craneofaciales, apendiculares o axiales. Para el análisis de especímenes de museo es necesario tener en cuenta que con el tiempo (&gt;20-30 años) el formaldehído puede producir un acortamiento en longitud y alterar tanto estructuras óseas como de órganos blandos (si no están correctamente fijadas). Por lo que es conveniente sumar ejemplares.</p>	<p>13,64*,65*, 66,67,68</p>



<p>DISECCIÓN E HISTOLOGÍA</p> 	<p>Se puede utilizar renacuajos, juveniles y adultos. Útil para identificar anomalías de órganos internos mediante microscopía óptica o microscopía electrónica (transmisión y barrido). La solución de Bouin<sup>1</sup> permite una mejor fijación de tejidos y por lo tanto mejor calidad de los preparados histológicos). En renacuajos, se recomienda inyectar en la zona ventral (con jeringa tipo tuberculina 1 ml) para asegurar una correcta fijación y preservación de ejemplares. En el caso de tener numerosos ejemplares, un pool de éstos podría fijarse en formaldehído (4% renacuajos, 10% adultos) o alcohol (70%) para proceder a otros estudios de inspección ocular como estudios histológicos clásicos que requieren una tinción de MayGrunwald-Giemsa o de algún marcador inmunohistoquímico. En adultos también debe inyectar suficiente cantidad del fijador internamente, y luego realizar fijación externa en caso de realizar análisis de un órgano en particular (ej. gónadas), se recomienda disección extracción del órgano y fijación del mismo. Lo mismo podrían refrigerarse en freezer de al -20°C para estudios de bioacumulación/ biomagnificación, para esto el tejido debe ser conservado en papel aluminio y ser rotulado respectivamente en bolsas con cierre hermético.</p>
---	--

69\*,70,71,  
72

<sup>1</sup> Solución de Bouin (100 ml): 70 ml de solución saturada de Ácido Pírico, 25 ml de formol al 40%, 5 ml de Ácido Acético.

### Caja 4.8.1 - Registros de anormalidades en adultos y en estadios larvales de anuros de Sudamérica

En Sudamérica se han registrado anormalidades en adultos<sup>(48,60,61,74-77)</sup>; y larvas colectadas en ambientes naturales<sup>(48,78,79)</sup>. Además, en diversos estudios se han registrado y comparado las anormalidades en diferentes ambientes: agrícolas (campos de soja y arroz), suburbanos, forestales<sup>(48)</sup>; cultivados con soja y trigo, suburbanos y forestales<sup>(80,81)</sup>; ambientes relacionados a la explotación minera de fluorita<sup>(63)</sup>. Las principales anormalidades registradas en anuros adultos se resumen y describen en la **Tabla 4.8.2**, ya que podrían servir para futuras determinaciones. En general, en los estudios antes mencionados, la mayoría de las anormalidades fueron observadas en áreas con impacto antrópico y muchos autores mencionan la relación entre la actividad agrícola y uso de plaguicidas, con la presencia de anormalidades. En los anuros estudiados, una gran cantidad de anormalidades ocurre en los miembros, siendo la ectromelia una de las más abundantes<sup>(48)</sup>, ver **Tabla 4.8.2, Figura 4.8.1A,B**; en segundo lugar se puede mencionar la braquidactilia, amelia, hemimelia (ver **Tabla 4.8.2, Figura 4.8.1**). En otros países también se han registrado anormalidades en individuos provenientes de áreas agrícolas (Canadá<sup>82</sup>; Estados Unidos<sup>38</sup>; Australia<sup>83</sup>).

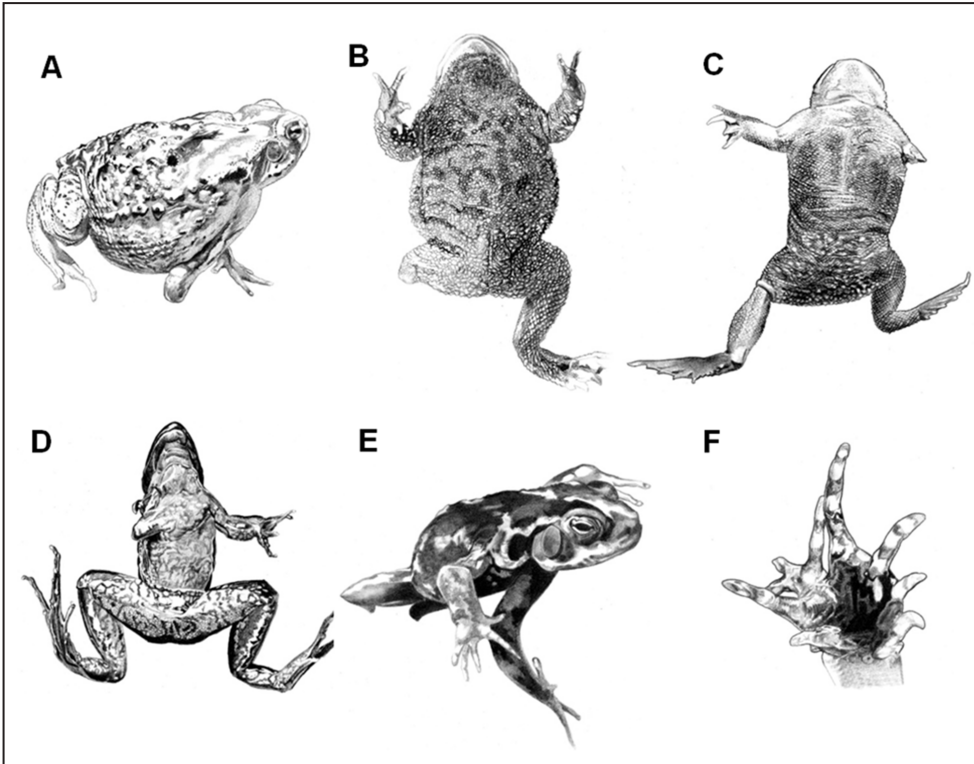
**ción 4.11**). En condiciones de laboratorio existen numerosos estudios que demuestran la relación entre la exposición a ciertos compuestos químicos (solos o en mezclas) con la inducción de anormalidades durante el desarrollo de anuros<sup>(6,16,84-86)</sup>, entre otros). En la **Tabla 4.8.3** se resumen las anormalidades más comunes registradas en larvas de anuros expuestas a xenobióticos en condiciones de laboratorio. Con la misma finalidad de la tabla anterior, en esta se describen las principales anormalidades que un observador puede registrar en larvas y que fueron documentadas por diversos autores. Además en la **Figura 4.8.2**, se ejemplifican e ilustran las más frecuentes utilizando como ejemplo tres especies de anuros locales (*Leptodactylus macrosternum*, *Physalaemus albonotatus*, *Rhinella arenarum*). Algunas de las anormalidades pueden ser reversibles, por ejemplo un renacuajo con cola bífida, luego de la metamorfosis puede revertirse. En cambio renacuajos con severas anormalidades orales, o intestinales, pueden traer aparejado problemas ecológicos, que puede llevar a la muerte.

En todas las poblaciones es esperable que ocurran anormalidades en una proporción baja, como consecuencia a defectos genéticos o durante el desarrollo, traumas o depredaciones<sup>(16)</sup>. Un parámetro útil para calcular y poder

<b>Anormalidades</b>	<b>Descripción</b> (según <sup>17,21,46</sup> )	<b>Autores</b>
<b>Craneofaciales</b>		
Microcefalia	Desarrollo insuficiente del cráneo	59
Malformaciones oculares	Decoloración y desplazamiento Ausencia de cubierta córnea de ojos "Anoftalmia" (ausencia de uno o ambos ojos) Microftalmia (reducción de ojos)	48,59,63
Braquignatia	Acortamiento anormal de mandíbula inferior	48
<b>De miembros</b>		
Amelia	Ausencia total del miembro. Meteyer <sup>(47)</sup> la considera como un tipo de ectromelia	48,59,77
Hemimelia	Acortamiento de huesos. Ausencia de la porción distal del miembro	48,59
Braquidactilia	Acortamiento anormal de uno o más dígitos	48,59,81
Ectromelia	Ausencia de una parte del miembro. Por ejemplo: ectromelia de fémur, ectromelia de tibio-fíbula, ectromelia del húmero.	48,59,63, 77,81
Polidactilia	Presencia de dígitos (falanges) extras, incluyendo huesos metatarsales	48,77
Polimelia	Miembros extras o supernumerarios	48
Sindactilia	Fusión parcial o completa de uno o más dígitos	48,63,81
Ectrodactilia	Ausencia completa de uno o más dígitos	59,63,81
Focomelia	Reducción de la parte proximal de un miembro, con la extremidad muy próxima al cuerpo	48
<b>Otras anormalidades</b>		
Saco vocal anormal, ausencia de discos adhesivos, ausencia de tímpanos, alteración en pigmentación y ulceración en piel, ausencia de miembro o partes del mismo con muñón epidérmico queratinizado, desarrollo de un miembro sub-epidérmicamente.		48,63,77, 81

**Tabla 4.8.2.** Principales anormalidades en anuros (adultos) de Sudamérica. Se incluye una breve descripción de cada tipo y se mencionan los autores que la registraron en Argentina.

comparar entre poblaciones, o bien entre diferentes tratamientos, es el cálculo de la prevalencia. La prevalencia de anormalidades se calcula como el cociente entre la cantidad de una determinada alteración sobre el total de individuos analizados<sup>(85)</sup>. Para estudios a campo, es necesario que el número de individuos sea alto para que se pueda obtener una diferencia significativa al comparar la proporción de anormalidades registradas (por ejemplo, 13%) con un nivel basal menor a 5%, que es considerado como la probabilidad



**Figura 4.8.1.** Ejemplos de anomalías en anuros adultos. Ectromelia del húmero (A) y del fémur (B) en *Rhinella diptycha*; Hemimelia de miembro anterior de *Rhinella dorbignyi* (C); Hemimelia, Ectrodactilia y Braquidactilia en *Leptodactylus mystacinus* (D); Polimelia en *Rhinella arenarum* (E); Polidactilia (F). A,B,D,E,F (Tomados de<sup>48</sup>), C (Dibujo inédito). Ilustraciones: J. Fioramonti.

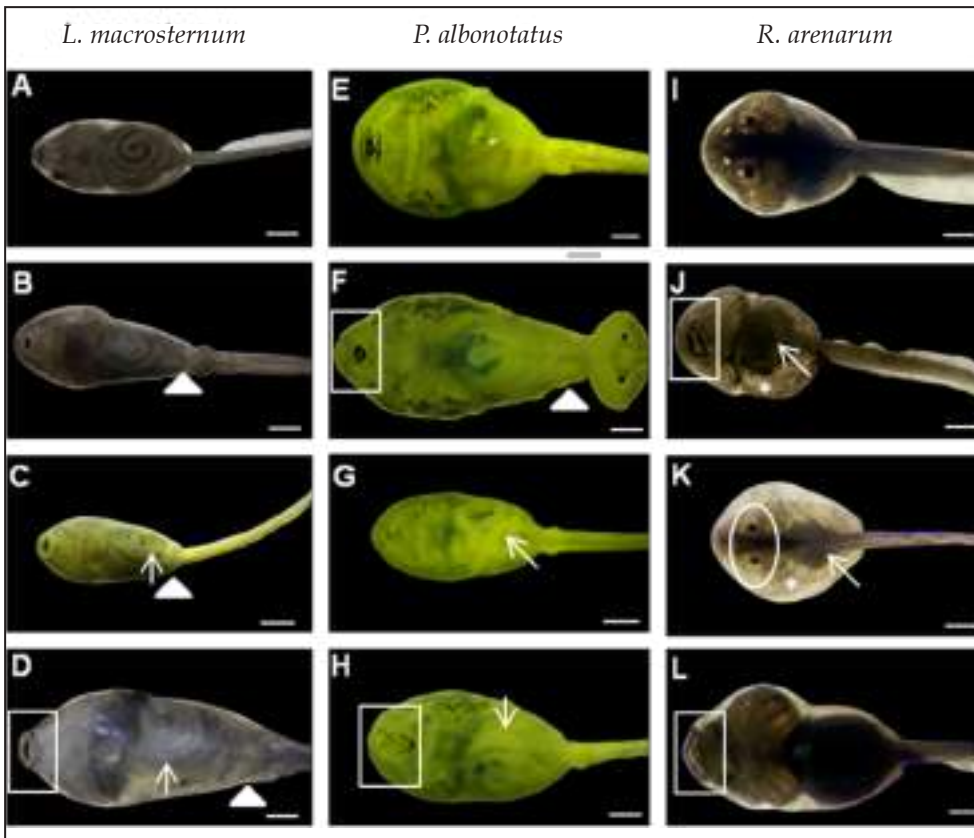
normal o natural de ocurrencia de anomalías en condiciones naturales según algunos autores (ver <sup>16</sup>). Para dichas comparaciones se pueden utilizar la prueba exacta de Fisher, Test de Chi Cuadrado, o G-test que permiten estimar si las alteraciones en la morfología observadas son significativamente mayores que las esperadas<sup>(88)</sup>.

## Bibliografía

1. Marco, A.; Cash, D.; Belden, L.K. & Blaustein, A.R. 2001. Sensitivity to urea fertilization in three amphibian species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 406-409.
2. Herkovits, J. & Perez-Coll, C.S. 2003. AMPHITOX: A customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. "Symposium on multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations": 46-60. *En: Linder, G.L.; Crest, S.; Sparling, D.; Little, E.E. (eds.). Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations* ASTM International STP 1443, USA.
3. Egea-Serrano, A.; Relyea, R.A.; Tejedo, M. & Torralva, M. 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution* 2: 1382-1397.
4. Widder, P.D. & Bidwell, J. 2008. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology* 88: 9-18.
5. Boone, M.D. 2008. Examining the single and interactive effects of three insecticides on amphibian metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1561-1568.
6. Curi, L.M.; Peltzer, P.M.; Martinuzzi, C.; Attademo, M.A.; Seib, S.; Simoniello, M.F.

Anormalidades	Descripción	Autores
Edemas cefálicos, aleta caudal doblada, anomalías del disco oral.	Larvas de <i>Scinax nasicus</i> (Estadios/E. 26-27) expuestas a Glifos® (3,84 y 4,8 mg/L).	13
Disminución en volumen y número de células, pérdida de adhesión celular y apoptosis de células nerviosas encefálicas.	Larvas de <i>Rhinella arenarum</i> (E. 28) expuestas a cipermetrina (>39 µg/L).	72
Anormalidades oculares, anomalías intestinales, aleta caudal doblada y anomalías del eje axial.	Larvas de <i>Boana pulchella</i> (E. 25) expuestas a cipermetrina y Sherpa® (Entre 0,34 y 4,18 µg/L, y 34,4 causa 100 % de anomalías).	80
Intestino desespiralado y desplazados, cuerpos en forma de diamante, aleta caudal doblada.	Larvas de <i>Trachycephalus typhonius</i> expuestas a sedimentos de suelos de cultivo de soja, de los alrededores de áreas cultivadas con soja y de áreas industriales.	12
Anormalidades del disco oral y edemas abdominales.	Larvas de <i>Leptodactylus luctator</i> (E. 25 y 36) expuestas a glifosato (>30 mg/L) y Roundup Ultra-Max® (>2,96mg/L).	87
Cuerpo en forma de diamante, intestino desespiralado, intestino desplazado, alteraciones del disco oral.	Larvas de <i>Leptodactylus macrosternum</i> expuestas a sedimentos con cama de pollo (fertilizante orgánico).	6
Anormalidades del disco oral, anomalías intestinales, edemas abdominales.	Larvas de <i>Physalaemus gracilis</i> (E. 19) expuestas a Siptran SC500® (atrazina) (>45 mg/L).	14
Anormalidades del disco oral, anomalías intestinales, edemas abdominales, alteraciones en forma del cuerpo (en forma de diamante invertido).	Larvas de <i>Physalaemus albonotatus</i> (E. 25) expuestas a 2,4-D Amina Zamba® (entre 43,7 y 262,5 mg/L).	85
Aleta caudal dobladas, edema abdominal y cuerpos globosos, alteraciones del disco oral, invaginaciones en estructuras craneofaciales, anomalías intestinales, etc.	Larvas de <i>Physalaemus albonotatus</i> (PA) y <i>Trachycephalus typhonius</i> (TT) expuestas a diclofenac a partir de E. 5 (entre 125 y 2000 µg/L).	68
Malformaciones orales, anomalía del eje caudal, alteraciones en forma del cuerpo (en forma de diamante invertido).	Larvas de <i>Rhinella diptycha</i> (E. 29-31) expuestas a SIPTRAN 500SC® (atrazina) (entre 1.5 y 25 mg/L).	86

**Tabla 4.8.3.** Ejemplos de anomalías encontradas en larvas de anuros Neotropicales luego de exposiciones a agroquímicos y contaminantes emergentes. Se incluye una breve descripción del estudio con la concentración a la que se hallaron los efectos y los autores del trabajo.



**Figura 4.8.2.** Ejemplos de anomalías en larvas de anuros de Argentina. Individuos controles (A,E,I); Individuos con cuerpo en forma de diamante invertido (B,C,F), intestino ubicado asimétricamente respecto al cuerpo (C,D,H,J), anomalías del disco oral (D, F, H, J, L), intestino desespiralado (G), escasa pigmentación, microftalmia e intestino con desarrollo anormal (K), invaginación postbranquial (L), edema abdominal (J,K). Referencias: *Leptodactylus macrosternum* expuestos a sedimentos de camas de pollo (B-D), *Physalaemus albonotatus* expuestos a 2,4D (F-H), *Rhinella arenarum* expuestos a glifosato Roundup® (J,K) y Roundup® y ciprofloxacina (L). Fotos A-H: L. M. Curi. Fotos I-L: A. P. Cuzziol Boccioni. Escala = 1 mm.

& Lajmanovich, R.C. 2017. Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 14: 62-71.

7. Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Cabagna-Zenkhusen, M.; Junges, C.M.; Lorenzatti, E.; Aró, C. & Grenón, P. 2015. Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus llimellum* (Anura: Hylidae) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 287-294.
8. Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Junges, C.M. & Cabagna, M.C. 2011. Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 681-689.
9. Relyea, R.A. 2005. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48: 351-357.
10. Teplitsky, C.; Piha, H.; Laurila, A. & Merila, J. 2005. Common pesticide increases costs of antipredator defenses in *Rana temporaria* tadpoles. *Environmental Science & Technology* 39: 6079-6085.
11. Mann, R.M.; Hyne, R.V.; Choung, C.B. & Wilson, S.P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157: 2903-2927.
12. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Cabagna, Z.; Repetti, M.C.; Sigrist, R. & Beldoménico, H.M. 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined tree frog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98: 142-151.
13. Lajmanovich, R.C.; Sandoval, M.T. & Peltzer, P.M. 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 612-618.

14. Rutkoski, C.F.; Macagnan, N.; Kolcenti, C.; Vanzetto, G.V.; Sturza, P.F.; Hartmann, P.A. & Hartmann, M.T. 2018. Lethal and sublethal effects of the herbicide atrazine in the early stages of development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 74: 587-593.
15. Ouellet, M. 2000. Amphibian Deformities: Current State of Knowledge: 617-646. *En: Sparling, D.; Linder, G. & Bishop, C. (eds.). Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles.* SETAC Press, Pensacola, FL.
16. Lunde, K.B. & Johnson, P.T. 2012. A practical guide for the study of malformed amphibians and their causes. *Journal of Herpetology* 46: 429-441.
17. Meteyer, C.U. 2000. Field guide to malformations of frogs and toads with radiographic interpretations. U.S. Geological Survey. Biological Science Report USGS/BRD/BSR-2000-0005.
18. Blaustein, A.R. & Johnson, P.T.J. 2003. The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1: 87-94.
19. Ankley, G.T.; Degitz, S.J.; Diamond, S.A. & Tietge, J.E. 2004. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58: 7-16.
20. Johnson, P.T.J.; Reeves, M.L.; Krest, S.K. & Pinkey, A.E. 2010. A decade of deformities. Advances in our understanding of amphibian malformations and their implications: 511-536. *En: Sparling, D.W.; Linder, G.; Bishop, C.A. & Krest, S.K. (eds.). Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles.* 2nd. ed. Society for Environmental Toxicology and Contaminants (SETAC), Pensacola.
21. Lannoo, M.J. 2008. *Malformed Frogs: The Collapse of Aquatic Ecosystems.* University of California Press, Berkeley.
22. Blaustein, A.R.; Hoffman, P.D.; Hokit, D.G.; Kiesecker, J.M.; Walls S.C. & Hays, J.B. 1994. UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: A link to population declines? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 1791-1795.
23. Blaustein, A.R.; Kiesecker, J.M.; Chivers, D.P. & Anthony, R.G. 1997. Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 13735-13737.
24. Ankley, G.T.; Diamond, S.A.; Tietge, J.E.; Holcombe, G.W.; Jensen, K.M.; Defoe, D.L. & Peterson, R. 2002. Assessment of the risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependent induction of hindlimb malformations in the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Environmental Science and Technology* 36: 2853-2858.
25. Ankley, G.T.; Tietge, J.E.; Holcombe, G.W.; DeFoe, D.L.; Diamond, S.A.; Jensen, K.M. & Degitz, S.J. 2011. Effects of laboratory ultraviolet radiation and natural sunlight on survival and development of *Rana pipiens*. *Canadian Journal of Zoology* 78: 1092-1100.
26. Ballengée, B. & Sessions, S.K. 2009. Explanation for missing limbs in deformed Amphibians. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular Development and Evolution* 312: 1-10.
27. Bowerman, J.; Johnson, P.T.J. & Bowerman, T. 2010. Sublethal predators and their injured prey: Linking aquatic predators and severe limb abnormalities in amphibians. *Ecology* 91: 242-251.
28. Johnson, P.T.J. & Bowerman, J. 2010. Do predators cause frog deformities? The need for an eco-epidemiological approach. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 314: 515-518.
29. Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Ritchie, E.G. & Launer A.E. 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science* 284: 802-804.
30. Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Thurman, E.M.; Ritchie, E.G.; Wray, S.N.; Sutherland, D.R.; Kapfer, J.M.; Frest, T. J.; Bowerman, J. & Blaustein, A.R. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72: 151-168.
31. Roberts, C. & Dickinson, T. 2012. *Ribeiroia ondatrae* causes limb abnormalities in a Canadian amphibian community. *Canadian Journal of Zoology* 90: 808-814.
32. Lunde, K.; Resh, V. & Johnson, P.T.J. 2012. Using an ecosystem-level manipulation to understand host-parasite interactions and how they vary with study venues. *Ecosphere* 3. <https://doi.org/10.1890/ES12-00001.1>
33. Fellers, G.M.; Green, D.D. & Longcore, J.E. 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog *Rana muscosa*. *Copeia* 2001: 945-953.

34. Barrionuevo, J.S.; Aguayo, R. & Lavilla, E.O. 2008. First record of chytridiomycosis in Bolivia (*Rhinella quecha*; Anura: Bufonidae). *Diseases of Aquatic Organisms* 82: 161-163.
35. Cowman, D.F. & Mazanti, L.E. 2000. Ecotoxicology of "new generation" pesticides to amphibians: 233-268. *En: Sparling, D.W.; Linder, G. & Bishop, C.A. (eds.). Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Society for Environmental Toxicology and Contaminants (SETAC) Press, Pensacola, Florida.*
36. Gurushankara, H.P.; Krishnamurthy, S.V. & Vasudev, V. 2007. Morphological abnormalities in natural population of common frogs inhabiting agroecosystems of central Western Ghats. *Applied Herpetology* 4: 39-45.
37. Reeves, M. K.; Jensen, P.; Dolph, C.L.; Holyoak, M. & Trust, K.A. 2010. Multiple stressors and the cause of amphibian abnormalities. *Ecological Monographs* 80: 423-440.
38. Taylor, B.; Skelly, D.; Demarchis, L.K.; Slade, M.D.; Galusha D. & Rabinowitz, P.M. 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environmental Health Perspectives* 113: 1497-1501.
39. Perotti, M.G. & Diéguez, M.C. 2006. Effect of UV-B exposure on eggs and embryos of patagonian anurans and evidence of photoprotection. *Chemosphere* 65: 2063-2070.
40. Gardiner, D.; Ndayibagira, A.; Grün, F. & Blumberg, B. 2003. Topic 4.6: Deformed frogs and environmental retinoids. *Pure and Applied Chemistry* 75: 2263-2273.
41. Dolle, P. & Niederreither, K. 2015. The Retinoids: Biology, Biochemistry, and Disease. Wiley-Blackwell.
42. Paganelli, A.; Gnazzo, V.; Acosta, V.; López, S.L. & Carrasco, A. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology* 23: 1586-1595.
43. Teglia, C.M.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Goicoechea, H.C. & Lajmanovich, R.C. 2015. Plasma retinoids concentration in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) from rice agroecosystems, Santa Fe province, Argentina. *Chemosphere* 135: 24-30.
44. Linder, G. & Grillitsch, B. 2002. Ecotoxicology of Metals: 325-459. *En: Sparling, D.W.; Linder, G. & Bishop, C.A. (eds.). Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Society for Environmental Toxicology and Contaminants (SETAC) Press, Pensacola, Florida.*
45. Monroy-Vilchis, O.; Parra-López, L.L.; Beltran-León, T.; Lugo, J.A.; Balderas, A. & Zarco-González, M.M. 2015. Morphological abnormalities in anurans from central México: A case study. *Herpetozoa* 27: 115-121.
46. Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Ritche, E.G.; Reaser, J.K. & Launer, A.E. 2001. Morphological abnormality patterns in a California Amphibian community. *Herpetologica* 57: 336-352.
47. Meteyer, C.U.; Loeffler, I.K.; Fallon, F.J.; Converse, K.A.; Green, E.; Helgen, J.C.; Kersten, S.; Levey, R.; Eaton-poole, L. & Burkhart, J.G. 2000. Hind limb malformations in free-living Northern Leopard Frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies. *Teratology* 62: 151-171.
48. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Sánchez, L.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Bionda, C.L.; Martino, A.L. & Bassó, A. 2011. Morphological abnormalities in Amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology* 6: 432-444.
49. Bantle, J.A.; Dumont, J.N.; Finch, R. & Linder, G. 1992. Atlas of Abnormalities: A Guide for the Performance of FETAX. Stillwater, Okla. Printing Services, Oklahoma State University, Oklahoma.
50. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Sanchez-Hernandez, J.C.; Cabagna, M.; Attademo, A.M. & Bassó, A. 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology Environmental Safety* 70: 185-197.
51. Shu, G.; Gong, Y.; Xie, F.; Wu, N.C. & Li, C. 2017. Effects of long-term preservation on amphibian body conditions: implications for historical morphological research. *PeerJ* 5: e3805 <https://doi.org/10.7717/peerj.3805>
52. Medina, R.G.; Ponssa, M.L.; Guerra, C. & Aráoz, E. 2013. Amphibian abnormalities: Historical records of a museum collection in Tucumán Province, Argentina. *Herpetological Journal* 23: 193-202.
53. Ouellet, M.; Bonin, J.; Rodriguez, J.; Desgranges, J. & Lair, S. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 95-104.



54. Haas, S.E.; Reeves, M.K.; Pinkney, A.E. & Johnson, P.T.J. 2017. Continental-extent patterns in amphibian malformations linked to parasites, chemical contaminants, and their interactions. *Global Change Biology* 2017: 1-14.
55. Attademo A.; Gutierrez C.; Guerrero S.; Peltzer P. & Lajmanovich R. 2005. Ev cysts of *Physaloptera* sp. (Nematodes) in stomachs of *Physalaemus biligonigerus* (Anura: Leptodactylidae) populations that inhabit transgenic soybean cultivated areas of Córdoba province (Argentina). *Herpetological Review* 36: 161-162.
56. Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B, Haight, R.W.; Bowerman, J. & Blaustein, A.R. 2001. *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection induces severe limb malformations in Western Toads (*Bufo boreas*). *Canadian Journal of Zoology* 79: 370-379.
57. Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Thurman, E.M.; Ritchie, E.G.; Wray, S.N.; Sutherland, D.R.; Kapfer, J.M.; Frest, T. J.; Bowerman, J. & Blaustein, A.R. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72: 151-168.
58. Piha, H.; Pekkonen, M. & Merila, J. 2006. Morphological abnormalities in Amphibians in agricultural habitats: A case study of the Common Frog *Rana temporaria*. *Copeia* 2006: 810-817.
59. Agostini, M.G.; Natale, G.S. & Ronco, A.E. 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology* 19: 1545-1550.
60. Peltzer, P.M.; Ponsa, M.L. & Lajmanovich, R.C. 2001. Caso de malformación en *Leptodactylus mystacinus* (Anura: Leptodactylidae). *Natura Neotropicalis* 32: 165-168.
61. Attademo, M.A.; Peltzer, P.M. & Lajmanovich, R.C. 2004. Nuevo caso de malformación en un ejemplar de Rana (*Leptodactylus ocellatus*) (Amphibia: Anura) del Litoral Argentino. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 15: 20-22.
62. Lannoo, M.J.; Sutherland, D.R.; Jones, P.; Rosenberry, D.; Klaver, R.W.; Hoppe, D.M.; Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Facemire, C.; Kapfer, J.M. *et al.* 2003. Multiple Causes for the Malformed Frog Phenomenon: 233-262. *En: Linder, G.; Little, E.; Krest, S. & Sparling, D. (eds.). Multiple Stressor Effects in Relation to Declining Amphibian Populations. American Society for Testing and Materials International, West Conshohocken, PA.*
63. Pollo, F.; Bionda, C.; Otero, M.; Grenat, P.; Babini, S.; Flores, P.; Grisolia, M.; Salas, N. & Martino, A. 2019. Morphological abnormalities in natural populations of the common South American toad *Rhinella arenarum* inhabiting fluoride-rich environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 177: 32-38.
64. Wassersug, R. 1976. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formaline-fixed vertebrates. *Stain Technology* 51: 131-134.
65. Kelly, W.L. & Bryden, M.M. 1983. A modified differential stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates. *Stain Technology* 58: 131-134.
66. Sessions, S.K. & Ruth, S.B. 1990. Explanation for naturally-occurring supernumerary limbs in amphibians. *Journal of Experimental Zoology* 254: 38-47.
67. Kiesecker, J.M. 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 9900-9904.
68. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Martinuzzi, C.; Attademo, M.A.; Curi, L.M. & Sandoval, M.T. 2019. Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of the Total Environment* 683: 624-637.
69. Humason, G.L. 1979. *Animal Tissue Techniques*. Fourth Edition. W.H- Freeman and Company. San Francisco.
70. Hayes, T.B.; Collins, A.; Lee, M.; Mendoza, M.; Noriega, N.; Stuart, A.A. & Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 5476-5480.
71. Hayes, T.B.; Haston, K.; Tsui, M.; Hoang, A.; Haeffele, C. & Vonk, A. 2003. Atrazine induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environmental Health and Perspectives* 111: 568-575.
72. Casco, V.H.; Izaguirre, M.F.; Marín, L.; Vergara, M.N.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M. & Soler Peralta, A. 2006. Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin. *Cell Biology and Toxicology* 22: 199-211.

73. Storrs, S.I. & Semlitsch, R.D. 2008. Variation in somatic and ovarian development: Predicting susceptibility of amphibians to estrogenic contaminants. *General and Comparative Endocrinology* 156: 524-530.
74. Prigione, C.M. & Langone, J.A. 1985. Anomalías anatómicas registradas en anfibios de la colección herpetológica del Museo Nacional de Historia Natural. *Actas de las Jornadas de Zoología del Uruguay* 1: 73-75.
75. Peri, S. & Williams, J. 1988. Anomalías osteológicas en *Hyla pulchella pulchella* y *Pseudis paradoxus platensis* (Amphibia: Anura). *Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina* 4: 4-5.
76. Fabrezi, M. 1999. Duplicación de la extremidad anterior en *Lepidobatrachus llanensis* (Anura: Leptodactylidae). *Cuadernos de Herpetología* 13: 99-100.
77. Bionda, C.; Salas, N.; Caraffa, E.; Baraquet, M. & Martino, A. 2012. On abnormalities recorded in an urban population of *Rhinella arenarum* from central Argentina. *Herpetology Notes* 5: 237-241.
78. Goldberg, J. 2015. Gonadal differentiation and development in the snouted treefrog, *Scinax fuscovarius* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Journal of Herpetology* 49: 468-478.
79. Navarro-Lozano, A.; Sánchez-Domene, D.; Rossa-Feres, D.C.; Bosch, J. & Sawaya, R.J. 2018. Are oral deformities in tadpoles accurate indicators of anuran chytridiomycosis? *Plos One* 13: e0190955.
80. Agostini, M.G.; Kacoliris, F.; Demetrio, F.; Natale, G.S.; Bonetto, C. & Ronco, A.E. 2013. Abnormalities in amphibian population inhabiting agroecosystems in northe-arstern Buenos Aires Province, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 104: 163-171.
81. Ascoli-Morrete, T.; Signor, E.; Santos-Pereira, M. & Zanella, N. 2019. Morphological abnormalities in anurans from southern Brazil. *Austral Ecology* 44: 1025-1029.
82. Ouellet, M.; Bonin, J.; Rodrigue, J.; Desgranges, J. & Lair, S. 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 95-104.
83. Spolyarich, N.; Hyne R.V.; Wilson S.P.; Palmer C.G. & Byrne, M. 2011. Morphological abnormalities in frogs from a rice growing region in NSW, Australia, with investigations into pesticide exposure. *Environmental and Monitoring Assessment* 173: 397-407
84. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, M.A.; Junges, C.M.; Teglia, C.M.; Martinuzzi, C.; Curi, L.M.; Culzoni, M.J. & Goicoechea, H.C. 2017. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. <https://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.01.021>.
85. Curi, L.M.; Peltzer, P.M.; Sandoval, M.T. & Lajmanovich, R.C. 2019. Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2,4D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Water, Air & Soil Pollution* 230: 22.
86. Pérez Iglesias, J.M.; Franco-Belussi, L.; Natale, G.S. & de Oliveira, C. 2019. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental Pollution* 244: 733-746.
87. Bach, N.C.; Natale, G.S.; Somoza, G.M. & Ronco, A.E. 2016. Effects on the growth and development and induction of abnormalities by glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. *Environmental Science in Pollution Research* 10.1007/s11356-016-7631-z.
88. Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

## 4.9 REGISTRO DE PARÁSITOS. PROTOCOLOS EN CAMPO Y LABORATORIO

**Cynthya Elizabeth González<sup>1,3</sup> & Regina Draghi<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> *Centro de Ecología Aplicada del Litoral (CECOAL), Ruta Provincial Número 5, km 2,5, C.P. 3400, Corrientes, Argentina.*

<sup>2</sup> *División Zoología Invertebrados, Museo de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Paseo del Bosque, s/n, C.P. 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.*

<sup>3</sup> *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Godoy Cruz 2290, C1425FQB, CABA, Argentina.*

Al igual que el resto de los vertebrados, los anfibios son susceptibles a una gran variedad de parásitos y enfermedades, tanto bacterianas, como virales y fúngicas<sup>(1-4)</sup>. Sin embargo, a excepción de hongos, virus y bacterias, el resto de estos organismos no representan una amenaza para la conservación de las poblaciones de anfibios<sup>(5,6)</sup>.

El estudio de los parásitos, en cualquier grupo de organismos, conlleva a poseer conocimientos referidos a tres elementos fundamentales y sus características: el hospedador (su tamaño corporal, tasa metabólica, hábitat, tamaño de la población, distribución geográfica, etc.), el parásito (tipo de ciclo de vida y número de hospedadores involucrados, tasa de transmisión, presencia o no de formas de resistencia, etc.) y, finalmente, el ambiente (temperatura, humedad, precipitaciones, etc.)<sup>(7-9)</sup>. Así, el estudio de los parásitos en los anfibios debe realizarse indefectiblemente con conocimiento de las historias de vida de los mismos. De allí, que los trabajos más interesantes referidos a la parasitofauna de los anfibios sean el resultado de un trabajo en conjunto entre parasitólogos y herpetólogos.

Los parásitos pueden ser clasificados de muy diversas maneras: según el lugar en que se encuentren en el cuerpo del hospedador (ectoparásitos/endoparásitos), según su tamaño (microparásitos/macroparásitos), según el sitio de infección (pulmonares, intestinales, hemáticos, etc.), según su clasificación sistemática (hongos, protozoos, platelmintos, nematodos, artrópodos, etc.). Desde luego, un parásito puede pertenecer a varias categorías; por ejemplo, una garrapata (Arachnida) es un macroparásito y, a la vez, un ectoparásito, mientras que un tripanosomátido (Protozoa) es un microparásito y un endoparásito (**Caja 4.9.1**).

La **Figura 4.9.1** muestra algunos de los principales grupos de parásitos que se han hallado en anfibios de Argentina.

Específicamente, en cuanto a las técnicas y metodologías empleadas, debido a la amplia gama de organismos que pueden actuar como parásitos en los anfibios, las mismas varían considerablemente. Nuestro objetivo, es exponer en este capítulo, cuáles de todos los protocolos establecidos para el estudio de los parásitos han sido los que más efectivos y prácticos han resultado (en cuanto a costos, material utilizado y tiempo, sobre todo en estudios realizados en el campo).

La metodología para el estudio de los parásitos en general ha sido compilada en algunas obras que abarcan diferentes grupos hospedadores de fauna silvestre<sup>(10-15)</sup>. Existen, por otro lado, trabajos de grupos parasitarios específicos que, si bien no hacen referencia concretamente a hospedadores anfibios, la metodología es aplicable para estos hospedadores (ver<sup>16-19</sup>). Trabajos espe-

### Caja 4.9.1 - Principales grupos de organismos que se encuentran parasitando a los anfibios

**Protozoos:** endoparásitos, microparásitos. Los hallados en el tracto intestinal y en la sangre son los más comunes; con estadios fuera de los anfibios que ocurren tanto en el ambiente (en los enteroparásitos), como en hirudíneos y artrópodos vectores (hemoparásitos).

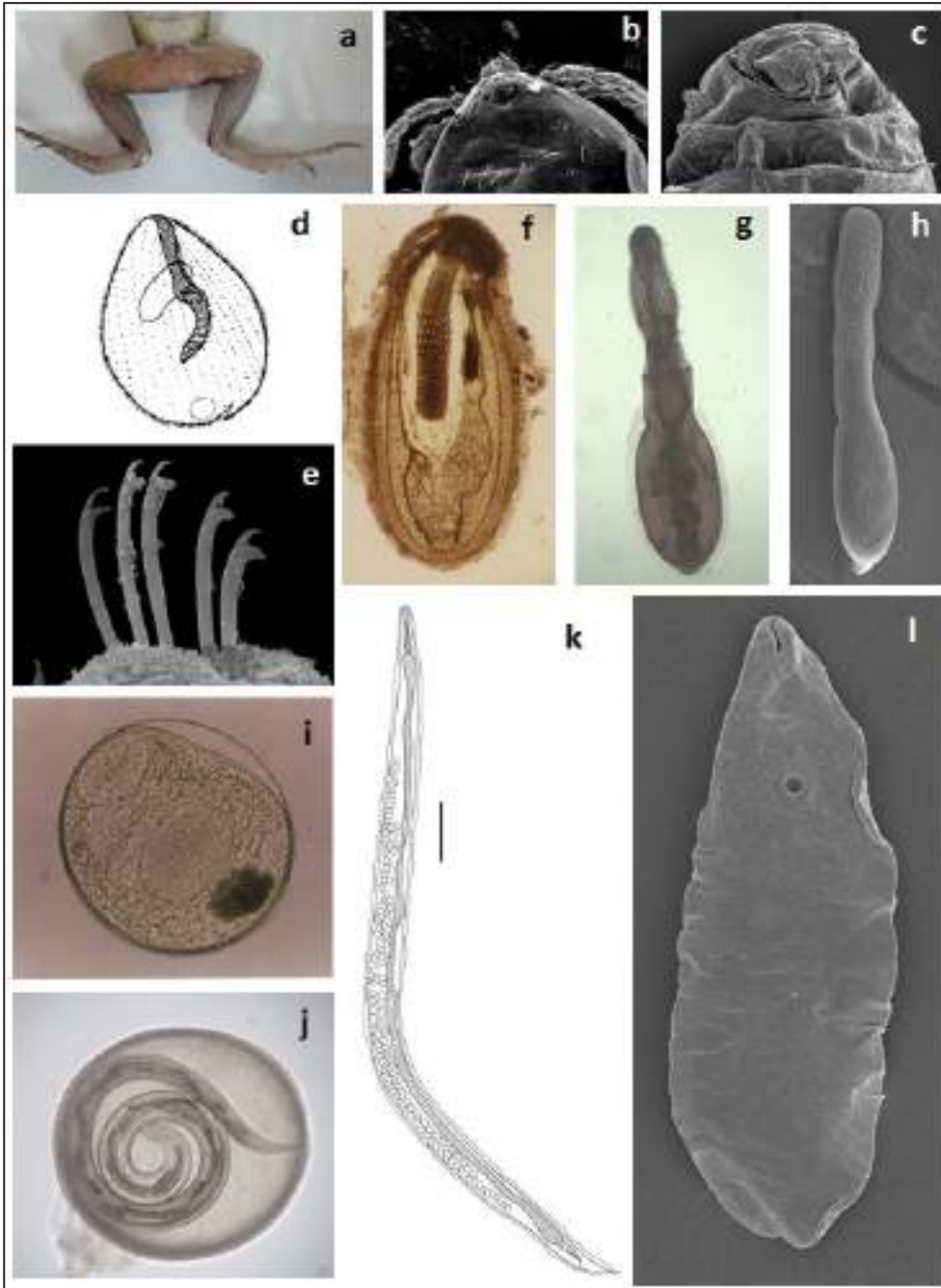
**Helmintos:** este es un grupo artificial que reúne a platelmintos (trematodes y cestodes), nematodes y acantocéfalos. Son, en general, macroparásitos que se encuentran dentro del cuerpo de los anfibios, tanto en la luz de los distintos órganos, como en la cavidad del cuerpo, o bien, en el parénquima de órganos como riñón e hígado. La mayoría de las especies de este grupo presentan ciclos heteroxenos por lo que otros organismos están vinculados a ellos como hospedadores intermediarios (moluscos, insectos, crustáceos, etc.) o vectores (insectos hematófagos).

**Anélidos:** macroparásitos, ectoparásitos/endoparásitos. Pasan la mayor parte de su vida como organismos de vida libre; sin embargo, en el caso de las sanguijuelas, se adhieren temporalmente a los anfibios (tanto renacuajos como adultos) para alimentarse mediante la succión de sangre (ectoparásitos). En el caso de los oligoquetos, los mismos penetran por la cloaca y se disponen en los uréteres de los hospedadores adultos (endoparásitos).

**Artrópodos:** macroparásitos, ectoparásitos/endoparásitos. Dentro de los artrópodos ectoparásitos se encuentran garrapatas y ácaros (Arachnida) y dípteros (Insecta). Presentan ciclos directos, pero con algunos estadios que se desarrollan en el ambiente; se encuentran en anfibios adultos asociados al ambiente terrestre. En el caso de los ácaros y los dípteros son los estadios larvales las formas parasitarias; en el caso de las garrapatas, tanto larvas como adultos son parásitos. Por otro lado, copépodos del género *Learnaea* son eventualmente hallados en renacuajos; primariamente parásitos de peces, son conocidos como gusanos ancla. Solamente la hembra es parásita (el macho muere luego de la cópula). Como artrópodos endoparásitos, se encuentra un grupo de crustáceos de la subclase Pentastomida, los gusanos lengua, que, además de anfibios, parasitan el sistema respiratorio de reptiles y mamíferos.

cíficos para el estudio de helmintos en peces y aves<sup>(20,21)</sup>, son asimismo ampliamente consultados por parasitólogos de anfibios. Concretamente, para el estudio de parásitos en anfibios existen dos trabajos que resumen las principales técnicas para llevarlos a cabo<sup>(22,23)</sup>.

En general, el estudio de los parásitos puede resumirse en los siguientes pasos: *colecta, fijación, coloración, identificación y conservación*. En cada uno de ellos la metodología varía de acuerdo al grupo parasitario estudiado y, en



**Figura 4.9.1** Representantes de algunos grupos de parásitos hallados en anfibios. (a) Ácaros en las extremidades posteriores de un ejemplar juvenil de *Leptodactylus luctator*. (b) Detalle de la extremidad anterior de ácaro colectados en *Leptodactylus macrosternum*, microscopía electrónica de barrido. (c) Larva de Sarcophagidae, detalle de extremidad anterior, microscopía electrónica de barrido. (d) Protozoos intestinales del género *Nyctotherus*, microscopía óptica. (e) Oligoquetos del género *Dero*, detalle de las quetas, microscopía electrónica de barrido. (f — h) Larvas de acantocéfalos del género *Centrorhynchus*, probóscide invaginada (f), probóscide evaginada (g, h), microscopía óptica (f, g) y microscopía electrónica de barrido (h). (i) Metacercaria enquistada del género *Travtrema*, microscopía óptica. (j) Nematode larval enquistado de la superfamilia Seuratoidea, microscopía óptica. (k) Nematode adulto del género *Rhabdias*, microscopía óptica. (l) Digeneo adulto del género *Glyphelmins*, microscopía electrónica de barrido. Fotos: a: R. Draghi; b, d-l: C.E. González; c: E. Schaefer y M. Duré.

algunos casos, algún paso no es imprescindible (por ejemplo, la coloración en los nematodos). Algunas técnicas como la plastinación desarrollada más recientemente para parásitos del grupo de los helmintos<sup>(24,25)</sup>, son más ventajosas en cuanto a que no utilizan sustancias como formaldehído o alcohol; sin embargo, su aplicación no está muy difundida por el momento.

Los parásitos no proporcionan sonidos, olores y otros atributos que, en el caso de otros organismos, ayudan en su identificación. Además, en relación a su tamaño más bien pequeño, el estudio de los parásitos requiere, casi en la totalidad de los casos, del uso de material óptico<sup>(26)</sup>. Por ejemplo, aún para los parásitos de mayor tamaño y, aún si son ectoparásitos, es necesario utilizar microscopio estereoscópico, para que, en el momento de la colecta no se dañen órganos tales como los de fijación.

La identificación taxonómica se basa, en general, en estructuras anatómicas internas de tamaño muy pequeño que deben observarse, en algunos casos, con objetivo de inmersión (ej. papilas caudales en nematodos, estructura del cirro en digeneos, distintas organelas en los protozoos, etc.). Un gran paso en el estudio de los parásitos fue el uso de la microscopía electrónica de barrido. Los primeros aportes para la preparación de helmintos observados con esta técnica fueron realizados en la década del 70<sup>(27)</sup>; posteriormente, se realizaron contribuciones en cuanto al uso de la microscopía electrónica de barrido en algunos grupos particulares de helmintos como los nematodos<sup>(28-30)</sup>.

Por otro lado, en la actualidad, prácticamente no existe grupo de organismos que no sean analizados mediante técnicas de biología molecular y los parásitos no son la excepción<sup>(31)</sup>. Trabajos específicos pueden consultarse para llevar adelante este tipo de estudio en diferentes grupos como tripanosomátidos<sup>(32)</sup>; helmintos<sup>(33-35)</sup> y garrapatas<sup>(36,37)</sup>.

Más recientemente, métodos moleculares a través de coprodiagnósticos han sido desarrollados para la identificación cualitativa de nematodos en anfibios y reptiles, si bien hasta el momento, no son ampliamente aplicados<sup>(38)</sup>.

En referencia a las malformaciones producidas por parásitos, existe un grupo de metazoos parásitos, específicamente, digeneos de los géneros *Ribeiroia* y *Acanthostomum* que han sido relacionados con, por ejemplo, dedos y extremidades supernumerarias y malformaciones axiales y de extremidades, respectivamente<sup>(39-42)</sup>. Hasta el momento, en Argentina solamente el género *Ribeiroia* fue registrado en estado de cercarias emergidas de planorbídeos de Salta y Corrientes<sup>(43)</sup> y, como adulto, en aves de Formosa y Buenos Aires<sup>(44)</sup>, no hallándose en anfibios.

Cabe aclarar que no existe un método único para estudiar a los diferentes grupos de parásitos de los anfibios. Cada investigador, a medida que avanza en los análisis, puede desarrollar nuevos métodos, aplicar otros, insertar cambios en los ya conocidos; en fin, realizar todo aquello que le otorgue mayor beneficio y conveniencia en cuanto a practicidad y costos, por ejemplo.

En Argentina, el estudio de los parásitos en anfibios adultos abarcó en gran medida a los helmintos, de los cuales se han realizado estudios de carácter sistemático y ecológico y que continúan actualmente en desarrollo. Respecto a digeneos, nematodos y acantocéfalos pueden consultarse listas de especies para hospedadores anfibios<sup>(45,46)</sup>, y para vertebrados en general<sup>(47)</sup>. Otros grupos de parásitos fueron escasamente estudiados en comparación con los helmintos y de ellos, se cuenta con trabajos puntuales de registros geográficos u hospedatorios (ver para protozoos:<sup>48-51</sup>; para ácaros:<sup>52-54</sup>; para garrapatas:<sup>55,56</sup>). Lo mismo sucede con parásitos en anfibios larvales donde los helmintos fueron los más estudiados<sup>(57-60)</sup>; existiendo registros escasos de otros grupos en renacuajos<sup>(61,62)</sup>.

Hongos y mohos que afecten a anfibios de Argentina y su metodología de estudio serán tratados en la **Sección 4.10 Registro de hongos. Protocolos en campo y laboratorio**. En lo que respecta a virus y bacterias, este es un tema muy poco desarrollado en nuestro país; existe un solo reporte de ranavirus en la provincia de Neuquén<sup>(63)</sup> por lo que este grupo debería ser considerado para estudios futuros. Finalmente, no hay registros, hasta el momento, de hirudíneos ni pentastómidos en anfibios argentinos; solamente se cuenta con observaciones no publicadas de alguno de estos grupos (ej. oligoquetos en uréteres de *Trachycephalus typhonius*; ver **Figura 4.9.1**; obs. pers. C.E.G.).

## Métodos, técnicas y/o equipamientos

Para el análisis parasitológico, el número de anfibios colectados dependerá del objetivo del trabajo a desarrollar (ej. estudios de carácter sistemático, reportes de nuevas localidades u hospedadores, estructura de la comunidad parasitaria, dinámica espacial y/o estacional de los parásitos, etc.). De cualquier manera, antes de iniciar la colecta de los hospedadores es necesario conocer el grado de amenaza de cada especie; para ello puede consultarse la Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina<sup>(64)</sup> y el sitio web de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza<sup>(65)</sup>.

El mejor momento para iniciar el examen de los hospedadores anfibios y sus parásitos es aquel inmediatamente después de la colecta, en lo posible, en el campo, luego de haber concluido el muestreo y la toma de las respectivas variables ambientales. Esto evitará el estrés de los hospedadores producido por el traslado hasta el laboratorio. Esta acción realizada en el campo, reporta un beneficio cuando se realizan campañas a sitios muy alejados del lugar de trabajo y que hacen que el traslado de los hospedadores sea algo complejo



o difícil, sobre todo por el espacio disponible en los viajes de campaña que, en la mayoría de los casos, es mínimo. Si el lugar de muestreo se encuentra cercano al laboratorio, entonces la tarea se ve facilitada y el examen de los anfibios puede realizarse perfectamente en el laboratorio. Recordar siempre que, si los anfibios deben ser trasladados, esto debe realizarse en las mejores condiciones posibles; para ello, se adecuarán recipientes para tal fin (terrarios o acuarios dependiendo de la especie) que los contendrán hasta el momento de su examen.

El estudio de los endoparásitos de anfibios requiere que los especímenes sean eutanasiados; por lo tanto, una manera de maximizar el material examinado es, en la medida de lo posible, coleccionar la mayor cantidad de datos de un solo ejemplar hospedador. Por ejemplo, del mismo anfibio pueden extraerse y fijarse, además de los parásitos hallados en los distintos sistemas de órganos, el contenido estomacal para estudios tróficos, las gónadas para estudios de carácter reproductivo, morfológico o fisiológico, tejido para posteriores estudios moleculares, etc.

Es necesario aclarar que, en general, cuando se aborda el estudio de los parásitos en anfibios, no se abarcan todos los grupos de organismos que puedan encontrarse parasitando a una especie hospedadora. Comúnmente, los estudios de parásitos de anfibios refieren a sus hemoparásitos, a sus ectoparásitos, a sus helmintos parásitos (incluso pueden ser más específicos y referirse solamente a helmintos intestinales) o, a sus ectoparásitos.

Por otro lado, una gran diferencia en la metodología de estudio entre los microparásitos (ej. protozoos hemáticos) y los macroparásitos (ej. los helmintos), es que, en general, en el primer caso, no se contabilizan la totalidad de los individuos; mientras que, en el segundo caso, la totalidad de la muestra es contabilizada. Sin embargo, en el caso de los protozoos hemáticos, sí es posible proporcionar datos como, por ejemplo, porcentaje de hospedadores parasitados (prevalencia de infección) y una estimación de la abundancia, por ejemplo: número de parásitos en cierta cantidad de campos al microscopio o, en un período de tiempo fijo.

### **Colecta de los hospedadores:**

*Adultos:* serán colectados mediante distintas técnicas según la conveniencia y según el tipo de estudio que se llevará adelante. Los diferentes tipos de colecta, ej. trampas de caída, inspección por encuentros visuales, redes para especies acuáticas, etc., de anfibios adultos se desarrollan en la **Sección 3.3.**

*Renacuajos*: serán colectados mediante copos o redes en los cuerpos de agua y mantenidos en recipientes preparados para contenerlos hasta el momento del examen parasitológico. Ver detalles de colecta de renacuajos en la **Sección 3.2**.

#### **Datos a registrar:**

*Del hospedador*: especie, longitud, peso, sexo (en adultos); especie, longitud, peso, estadio de Gosner<sup>(66)</sup> (en renacuajos).

*Del ambiente*: temperatura, humedad, hábitat donde fue colectado el anfibio (para adultos); temperatura, oxígeno disuelto, pH del cuerpo de agua (para renacuajos), además de la fecha y las coordenadas geográficas, en ambos casos.

En el estudio de los parásitos de los anfibios, es necesario registrar en el campo otras variables además de las que comúnmente se consignan y las mismas son, por ejemplo, presencia de moluscos (primeros hospedadores intermediarios de digeneos), presencia de sanguijuelas (vectores de tripanosomátidos) y, presencia de posibles hospedadores definitivos (aves, mamíferos, reptiles), entre otras.

#### **Eutanasia:**

La eutanasia de los anfibios puede realizarse por diferentes métodos que se encuentran detallados en la **Sección 5** del presente Manual. En los estudios parasitológicos el método más empleado por su fácil aplicación es el uso tópico de una solución en gel de benzocaína al 10% o al 20%.

Si bien la metodología parasitológica comprende una serie consecutiva de pasos igualmente importantes para el éxito de la investigación y que, en algunos casos pueden prolongarse significativamente (por ejemplo, cuando el hospedador se encuentra en extremo parasitado), es necesario aclarar aquí la importancia del tratamiento que se proporciona también a los ejemplares anfibios. El tratamiento del hospedador debe ser considerado un paso más en la metodología de los estudios parasitológicos y esto se debe a que, al momento de publicar los resultados, así como los especímenes parásitos deben estar depositados en una colección, también deben estarlo los hospedadores, por lo que la fijación y conservación de los mismos debe ser la correcta. De esta manera los parasitólogos pueden contribuir a la conservación de los hospedadores ya sea en su totalidad o por medio de muestras de tejidos de los mismos<sup>(67,68)</sup>.

A partir de aquí, las actividades serán separadas en dos apartados: *actividades realizadas en el campo* y *actividades realizadas en laboratorio*. En la primera sección, se incluyen los pasos que se inician con la necropsia del hospedador hasta la fijación y conservación de los parásitos en los respectivos viales o

eppendorf que serán trasladados al laboratorio. En la segunda sección, se incluyen las actividades relacionadas al tratamiento de los parásitos para su respectiva identificación, hasta el depósito de los mismos en las colecciones pertinentes.

### Caja 4.9.2 - Colectas a partir de hospedadores congelados

*Al igual que los parásitos colectados de hospedadores fijados (por ejemplo, aquellos depositados en una colección), los parásitos colectados de material congelado suponen una dificultad para su estudio morfológico. El primer inconveniente radica en la falta de movimiento de los mismos, esto es importante para casos de parásitos de tamaño muy pequeño ya que muchos de ellos pueden ser omitidos en la colecta por la falta de movimiento. En el caso de las metacercarias, el individuo entero puede ser totalmente destruido. Con parásitos de mayor tamaño, puede suceder que, en el caso de los cistacantos que presenten sus probóscides invaginadas, no será posible el conteo y estudio de la morfología de los ganchos; en los nematodos, las bolsas copulatrices permanecerán contraídas; en los digeneos pueden perderse espinas del tegumento, entre otras consecuencias. En síntesis, se verá afectada tanto la anatomía interna como externa de los parásitos. Solamente la utilización de nitrógeno líquido o, una mezcla de hielo seco y etanol pueden arrojar resultados considerables para realizar estudios morfológicos, pero esto no es algo que comúnmente se utilice. Por lo tanto, no es recomendable el uso de especímenes colectados de hospedadores congelados para estudios morfoanatómicos, si bien, pueden conservarse para material didáctico, por ejemplo.*

#### 1. En el campo:

*Equipamiento:* para realizar el análisis de los anfibios y la colecta de parásitos en el campo se debe contar con un microscopio estereoscópico que sea fácilmente trasladable y con un mínimo indispensable de instrumentos para proceder con el examen como ser: tijeras, bisturí, pipetas, pinceles, cápsulas de Petri, solución fisiológica, eppendorf, tubos de ensayo, mechero o vela, líquido fijador, líquido conservante, rótulos (**Figura 4.9.2**).

En caso de no contar con instrumental óptico (lupa) para trasladar al campo, los anfibios deben ser transportados en las mejores condiciones posibles al laboratorio y allí, colocarlos en terrarios o ambientes especialmente acondicionados que los contengan, hasta el momento del análisis que debe ser lo más pronto posible.



**Figura 4.9.2.** Análisis parasitológico interno de los anfibios. (a) Incisión longitudinal ventral rostro-cloaca para la posterior extracción de los sistemas de órganos. (b) Separación de los sistemas de órganos en cápsulas de Petri con solución fisiológica. (c) Examen del sistema digestivo en microscopio estereoscópico con iluminación inferior. (d, e) Examen de intestino delgado. Utilización de pinzas de punta fina; intestino aún no abierto (d); intestino abierto mostrando contenido intestinal y nematodos intestinales (e). (f) Estómago de anfibio mostrando en su pared externa numerosos quistes de nematodos. (g) Nematodos intestinales en cápsula de Petri con solución fisiológica. (h) Calentamiento de solución fijadora en el campo. Fotos: a, b, d, e, f, h: C. E. González; c, g: S. Palomas

\* quistes de nematodos; IG: intestino grueso; CI: contenido intestinal; N: nematodos.

Tanto para anfibios adultos como para renacuajos es necesario llevar un registro de la prospección cuyo formato y organización queda a criterio del investigador. Se proporciona un ejemplo de planilla en el **Anexo I**. Además de los campos para los órganos prospectados, esta ficha contiene en su encabezado otros datos con información referida al hospedador y a la localidad y fecha de captura del mismo.

### 1. a- Anfibios adultos:

1.a.a. Estudio de los parásitos hallados sobre la superficie del cuerpo:

Tres grupos principales de invertebrados pueden ser hallados externamente enquistados o adheridos por alguna adaptación a la superficie externa del cuerpo de los anfibios:

- Helmintos: metacercarias ubicadas entre la dermis y la epidermis.
- Anélidos: hirudíneos (sanguijuelas) adheridas por su ventosa anterior.
- Artrópodos: larvas de dípteros que forman úlceras, ácaros en la dermis, garrapatas solamente adheridas por sus piezas bucales.

En primer lugar, se realiza un examen macroscópico de la superficie externa del anfibio, si es necesario, bajo microscopio estereoscópico. Deben examinarse tanto la parte dorsal como la ventral del cuerpo. Observar también con detenimiento la cavidad bucal, debajo de la lengua, y los ojos<sup>(22)</sup>.

#### **Extracción y fijación:**

##### ***Helmintos:***

*Metacercarias:* Se las encuentra como protuberancias tegumentarias como en el caso de los ácaros, pero sin presentar el típico color rojizo de los mismos. Las metacercarias presentan, en general, un color blanquecino, pero también pueden encontrarse metacercarias amarillentas o marrones. Deben retirarse cuidadosamente los quistes con ayuda de pinzas de punta fina; luego de retirada es conveniente realizar un dibujo con cámara clara de la metacercaria enquistada para documentar la forma y tamaño. Luego, se rompe cuidadosamente la pared quística con ayuda de agujas histológicas para que quede libre y se procede a la fijación. Algunas metacercarias presentan la pared quística más débil y el simple hecho de realizar una pequeña presión con un cubreobjetos, produce la rotura de la pared del quiste y deja libre el digeneo larval.

*Fijación:* existen una gran cantidad de fijadores para helmintos parásitos (ver **Anexo II**); sin embargo, el más recomendable sigue siendo el formaldehído: formaldehído al 5% en el caso de las metacercarias y al 10% en el caso de los helmintos adultos. Si no se utilizara formaldehído, puede utilizarse alcohol 70%.

El fijador **siempre** debe calentarse. Aproximadamente, 5-10 ml de fijador se calientan en un tubo de ensayo hasta que comience a burbujear y se vuelca sobre la cápsula que contiene a los helmintos de donde previamente se ha quitado toda la solución fisiológica posible (**Figura 4.9.2**).

Si el fijador no se calienta, al volcarlo sobre los helmintos, el cuerpo de los mismos se fijará, pero contraído, lo que hará que ese espécimen no pueda es-

tudiarse posteriormente de la manera correcta. Los ejemplares fijados en formaldehído pueden conservarse en los mismos eppendorf pero es importante que, luego de un tiempo (no más de 3 meses), se los traspase a alcohol 70% ya que el formaldehído endurece los tejidos. Los helmintos así conservados con sus respectivos rótulos, serán trasladados al laboratorio para continuar con su identificación.

**A tener en cuenta:** cuando la muestra así lo permita (el n° de parásitos hallados es considerable), deben colocarse algunos ejemplares en alcohol absoluto para su posterior estudio molecular. Para ello, se recomienda su conservación en alcohol absoluto y posterior almacenaje en refrigerador.

### **Anélidos:**

*Sanguijuelas:* son organismos muy musculares y se encuentran fuertemente adheridos a la piel de los anfibios. Para desprenderlas del anfibio en primer lugar se debe identificar el extremo oral succionador que generalmente es el más delgado de la sanguijuela, luego colocar la uña o algún objeto plano como una hoja, también puede ser un cordón o hilo grueso, sobre la piel adyacente a la ventosa y deslizarlo debajo para ir desprendiendo lentamente la extremidad. Debe repetirse el proceso con el extremo posterior que generalmente es el extremo más grueso e hinchado. Las sanguijuelas deben encontrarse completamente relajadas al momento de fijarlas. Si se las coloca en un fijador a temperatura ambiente se contraen por lo que hay que narcotizarlas previamente; además, deben ser registrados los colores de las superficies dorsal y ventral del cuerpo debido a que los cromatóforos, en general, se disuelven con los narcotizantes. Para relajarlos, el método más conveniente es agregar lentamente al agua que contiene el ejemplar, gotas de alcohol 95% incrementando la concentración por 30 minutos hasta que cese el movimiento. Cuando el espécimen ya se encuentre relajado y no responda a estímulos, pasarlo entre los dedos para retirar el exceso de moco. Para algunos especímenes es conveniente realizar un aplastamiento entre dos vidrios, agregando peso si fuera necesario<sup>(19)</sup>.

Fijación: luego de la relajación, las sanguijuelas deben fijarse por 24 horas (dependiendo del tamaño) en formaldehído 5-10% ; para ello, las sanguijuelas deben ser comprimidas entre dos portaobjetos colocándole un peso encima. Existen otros métodos de relajación (uso de cristales de mentol, agua gasificada con CO<sub>2</sub>, utilización de Nembutal al 6%) y fijación de sanguijuelas (A.F.A., Bouin, Fleming) pero como para el trabajo de campo siempre se cuenta con etanol y formaldehído es que sugerimos la descrita.

### Caja 4.9.3 Acerca de los parásitos colectados en estudios no parasitológicos

*En muchas ocasiones, colegas herpetólogos proporcionan material parasitológico que han obtenido durante sus propias colectas realizadas para otros fines no parasitológicos. Este material, al igual que los parásitos que se encuentran en anfibios depositados en colecciones herpetológicas, constituyen una importante fuente de datos. Sin embargo, como se detalla, la fijación de los parásitos es un paso fundamental para su posterior determinación y no hacerlo de la manera correcta podría provocar daños en el espécimen y su estudio se vería muy comprometido. El estudio de este tipo de material no es imposible; sin embargo, no se recomienda para un investigador que se inicie en el estudio de los parásitos.*

#### **Artrópodos:**

*Larvas de dípteros (más comúnmente de las familias Sarcophagidae y Calliphoridae):* las larvas de moscas provocan úlceras en donde los huevos fueron depositados. Las larvas se van alimentando del tejido del anfibio y terminan matándolo. Estas larvas se extraen con ayuda de pinzas de punta fina con delicadeza intentando no romperlas. Una vez extraídas del cuerpo del anfibio se las mata y relaja mediante agua hirviendo<sup>(69)</sup>.

Fijación: se las fija y almacena en viales con alcohol 80% con las respectivas etiquetas. Si se quisieran obtener adultos de los dípteros, debe dejarse un número de larvas en los hospedadores parasitados para obtener luego las pupas y moscas adultas emergidas.

*Ácaros y garrapatas:* estrictamente, las larvas de ácaros son endoparásitos ya que atraviesan la piel de los mismos y se encapsulan en el estrato dérmico. Se observan como pequeñas prominencias tegumentarias sobre todo en la parte ventral y la parte interior de las extremidades posteriores. Comúnmente presentan color naranja o rojo (**Figura 4.9.1**). Para extraerlas, se rompe cuidadosamente la prominencia y se saca el ácaro con ayuda de una pinza de punta fina. Se los conserva en alcohol al 70% en eppendorf con sus respectivos rótulos<sup>(70)</sup>.

Las garrapatas (verdaderos ectoparásitos), se retiran de los hospedadores con ayuda de pinzas siempre tratando de que el hipostoma (estructura que forma parte de las piezas bucales) no se rompa y permanezca dentro del hospedador. Se las coloca en alcohol 70% u 80% a 70°C para que sus apéndices queden estirados<sup>(70)</sup>. La extracción de los especímenes debe realizarse lenta y suavemente para no romper el ejemplar, ejerciendo una tracción gradual y constante. Se debe evitar dañar las garrapatas de gran tamaño con la pun-

ta de las pinzas. Al extraer la garrapata posiblemente un pequeño trozo de piel del hospedador quede adherido a las piezas bucales; el mismo puede quitarse posteriormente con ayuda de pinzas y tijeras finas. La extracción descuidada de las garrapatas puede resultar en que las mismas sean inútiles para la identificación taxonómica<sup>(17)</sup>.

Fijación: ácaros y garrapatas pueden fijarse en alcohol 70% o alcohol 80%, como así también en formaldehído al 5%. Cuando los especímenes vayan a utilizarse para disecciones detalladas o cortes microscópicos, se recomienda fijarlos en alcohol, formaldehído, acético (A. F. A.).

1.a.b. Estudio de los parásitos hallados dentro del cuerpo de los anfibios:

Cuatro grupos de invertebrados pueden ser hallados como endoparásitos de los anfibios, si bien, los más comunes y numerosos son los helmintos:

- Protozoos: principalmente en sangre e intestino.
- Helmintos: adultos en órganos huecos como intestino, pulmón, vejiga urinaria, vesícula biliar; larvas en hígado, mesenterios, cavidad del cuerpo, hígado, riñones, pared de los órganos huecos, musculatura principalmente de las extremidades posteriores y sangre (filarias).
- Anélidos: oligoquetos en uréteres.
- Artrópodos: pentastómidos en pulmones.

#### **Extracción y fijación:**

Para la colecta de parásitos sanguíneos no es necesario realizar incisión alguna en el hospedador; mientras que, para los protozoos intestinales y el resto de los parásitos, luego de la eutanasia, se procede a realizar con un bisturí o tijera, una incisión ventral que se extienda desde la boca hasta la cloaca.

Luego de la incisión ventral, se retiran todos los sistemas de órganos y, por separado, se colocan en cápsulas de Petri con solución fisiológica (**Figura 4.9.2**). Esta es la solución fisiológica común que puede adquirirse en las farmacias.

Antes de comenzar con el examen de los órganos internos, se procede a observar la cavidad del cuerpo del hospedador en búsqueda de, por ejemplo, metacercarias enquistadas o nematodos filarideos adultos. Una vez finalizado este examen se inicia el examen de los distintos sistemas de órganos.

En el caso de órganos huecos (intestino, pulmones, vejiga urinaria) los mismos deben ser examinados externamente ya que muchos estados larvales



de acantocéfalos (cistacantos) y digeneos (metacercarias) pueden enquistarse en su pared externa. Luego, estos órganos huecos deben ser cortados cuidadosamente en sentido longitudinal para ser examinados internamente. En general, la pared del intestino no es tan gruesa como la del estómago; en este caso dos pinzas de punta fina son suficientes para realizar la incisión longitudinal del órgano (**Figura 4.9.2**).

El sistema digestivo, sobre todo en anfibios de gran tamaño, debe ser separado en estómago, intestino delgado e intestino grueso, en cápsulas de Petri diferentes y analizados separadamente.

Todos los parásitos hallados en un mismo órgano (por ejemplo, intestino grueso) deben colocarse en una cápsula más pequeña con solución fisiológica por unos minutos (**Figura 4.9.2**). El objetivo de este paso es que, al moverse dentro de la cápsula, sobre todo los helmintos, se desprendan de la suciedad que pueda quedar adherida a la superficie de su cuerpo (por ejemplo, restos de materia no digerida) y que luego, al momento de su identificación entorpezcan esta tarea. En este paso, algunos helmintos adultos al ser colocados en solución fisiológica comienzan a eliminar huevos. Esto no resulta un problema, al contrario, podría considerarse una ventaja ya que, un útero colmado de huevos puede dificultar la observación de estructuras reproductivas que son importantes para la identificación.

Los helmintos pueden ser extraídos de los órganos mediante el uso de agujas histológicas, pinzas de punta fina o pinceles finos; de igual manera, pueden utilizarse pipetas de punta fina, cuidando de que no queden pegados a su pared.

Por último, algunos helmintos de pequeño tamaño como formas larvales de nematodos, machos de algunas especies de nematodos o metacercarias, pueden pasarse por alto en el recuento de especímenes. Para ello, es recomendable colocar un trozo del órgano en cuestión, entre dos portaobjetos, aplastarlo ligeramente y observarlo en el microscopio estereoscópico utilizando la iluminación inferior.

### **Protozoos:**

*Hemoparásitos:* para la obtención de protozoos como los del género *Trypanosoma* debe realizarse una micropunción del corazón utilizando una jeringa con aguja de las de insulina previamente heparinizada. Se coloca una gota de la sangre extraída en el extremo de un portaobjetos y se realiza un frotis. Para ello uno de los lados de un segundo portaobjetos (“extensor”) se dis-

pone sobre la mitad de la gota de sangre que por capilaridad se desplazará hacia ambos extremos ocupando todo el ancho del portaobjetos, y luego, con una inclinación del extensor de 45°, se desplaza el borde del mismo hacia el otro extremo del portaobjetos, contrario al lugar donde estaba la gota<sup>(22)</sup>.

Una detección más rápida puede realizarse mediante un centrifugado de la sangre del anfibio con tubos de hematocrito heparinizados<sup>(71,23)</sup>; en este caso la sangre se extrae de la misma manera que como fuera explicada previamente.

Fijación: en cuanto a los extendidos sanguíneos para la observación de protozoos, los mismos deben ser fijados con metanol 96%. Para ello, luego que el frotis se ha secado, se sumerge el portaobjetos en una cápsula de Petri con metanol durante 3 minutos. Así fijados, los portaobjetos conteniendo el frotis sanguíneo pueden ser trasladados al laboratorio para continuar con la coloración respectiva<sup>(22)</sup>.

*Enteroparásitos:* para la colecta de estos parásitos (que más comúnmente se encuentran en la última porción del intestino delgado y en el intestino grueso), se utiliza una pipeta. Se colocan los especímenes en cápsulas de Petri con solución fisiológica. Es recomendable que antes de la fijación, una muestra de ellos, se observe al microscopio óptico con una gota de solución de Ringer o con la misma solución fisiológica ya que, de ese modo, por el movimiento, se aprecia mejor la disposición de las hileras de cilios<sup>(22)</sup>.

Fijación: Un método rápido para morfología de rutina es realizar un frotis con, por ejemplo, mucosa intestinal, deslizándolo en un porta o cubreobjetos y fijándolo en una cápsula de Petri con alcohol 70%. Para ello, se coloca el porta o cubreobjeto con tejido hacia abajo en la cápsula de Petri lo que ayudará a que la mayoría de los protozoos se adhieran al vidrio. Aunque también puede utilizarse formaldehído para la fijación de protozoos entéricos (en una concentración de 2,5% o 4%), éste, al igual que el alcohol 70% no resulta ser un buen fijador. El mejor fijador para protozoos es el líquido de Schaudinn (ver **Anexo II**); se procede a fijar el frotis durante 15-60 min. en el mencionado líquido y luego se lo transfiere directamente a alcohol 70%.

### ***Helmintos:***

*Monogeos:* los monogeos adultos, se encuentran en la vejiga urinaria de los anfibios. En este caso, se abre el órgano con una tijera o pinza y se colectan los monogeos con un pincel o pinza de punta fina, colocándolos luego en una cápsula de Petri con solución fisiológica.

*Digeneos*: las metacercarias pueden hallarse adheridas a la pared interna del cuerpo, a ambos lados de la columna vertebral, a los mesenterios o a la pared externa de órganos huecos. De allí, se las extrae con pinzas de punta fina y se las coloca en solución fisiológica. Algunas, como las del género *Strigea* presentan la pared del quiste muy gruesa, con diferentes capas y son muy difíciles de romper, por lo que, además de agujas de disección, quizás sea necesario el uso de pinzas de punta fina; otras, como las del género *Travtrema* presentan la pared del quiste muy fina y suelen romperse fácilmente, incluso, cuando se realiza una pequeña presión con el cubreobjetos. Las metacercarias de los géneros *Bursotrema* o *Lophosicyadiplostomum* que se localizan preferentemente en los riñones de los anfibios, son metacercarias que no forman quiste por lo que, directamente, serán colectadas y fijadas. En el caso de las metacercarias halladas en riñones, deben provocarse roturas en el tejido renal para que las mismas queden libres.

Los digeneos adultos se encuentran en órganos huecos como pulmones, intestino delgado y grueso, y vejiga urinaria. Se los extrae de cada órgano con pinzas de punta fina, pincel o pipeta y se los coloca en una cápsula de Petri con solución fisiológica antes de su fijación.

*Cestodes*: las larvas de cestodes pueden hallarse libres o encapsuladas en la cavidad del cuerpo, adheridas a los mesenterios, al hígado o la musculatura. En general, son larvas tetratirideas del género *Mesocestoides*. Se los extrae de su sitio de infección con pinzas de punta fina.

Los cestodes adultos se encuentran en la luz del intestino delgado. Es posible que, en especies de gran longitud, las últimas proglótides se desprendan y queden libres en la luz intestinal por lo que puede llevar a confusión a la hora de contabilizar los individuos existentes. Para subsanar esto, el número de individuos de cestodes que se contará como total de parásitos, será el número de escólices que se colecten.

*Nematodes*: en estado larval pueden ser hallados dentro de quistes en la mucosa del estómago (ej. *Spiroxys*, *Brevimulticaecum*) o bien, nematodes larvales no enquistados y que se encuentran adheridos a la misma por un collar cefálico (ej. *Physaloptera*). En el primer caso, al igual que con las metacercarias, es conveniente realizar dibujos y mediciones previamente a la rotura del quiste antes de proceder a su fijación. Las larvas de nematodes enquistadas también pueden ser halladas en el tejido hepático. En este caso, debe romperse el tejido por medio de pinzas y aislar la larva (ej. *Contraecaecum*, *Porrocaecum*); estas larvas tienen un tamaño considerable y los quistes son más difíciles de romper. En general, no presentan forma circular como los hallados en la pared estomacal sino más bien formas ovoides o no definidas.

Un apartado especial merece el tratamiento de las microfilarias, formas larvales halladas en sangre. Estas formas conservan la cutícula de las mudas producidas luego del huevo ser eliminado por la hembra (los adultos de los filarídeos se encuentran generalmente en la cavidad el cuerpo). Al igual que los protozoos sanguíneos se obtienen de una punción cardíaca. Se pueden observar fácilmente ya que se mueven activamente en preparados de sangre fresca<sup>(22)</sup>.

En estado adulto, los nematodes pueden ser hallados en órganos huecos como pulmones, intestino delgado, intestino grueso, vesícula biliar. Cabe aclarar aquí, que existen especies de nematodes en donde el macho presenta un tamaño mucho menor que el de la hembra por lo que es necesario realizar una observación detenida del contenido del órgano con el mayor aumento del microscopio estereoscópico.

*Acantocéfalos*: los acantocéfalos larvales (cistacantos) se encuentran en la pared de órganos como estómago e intestino delgado, pero también pueden encontrarse en mesenterios. Dentro del quiste, el individuo presenta su probóscide invaginada. Como algunos de los principales caracteres taxonómicos se encuentran justamente en la probóscide, esta debe estar totalmente extendida para su estudio. Para lograrlo, se coloca el quiste en agua destilada fría o a temperatura ambiente y se lo deja morir (aproximadamente 48 horas) monitoreándolo bajo la lupa. A medida que el agua ingresa en el acantocéfalo por ósmosis, la presión interna aumenta y el individuo evierte su probóscide.

El mismo resultado se obtiene si se deja reposar el quiste en heladera por un período de 24 horas ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) en solución fisiológica. Cualesquiera de estos dos métodos presentan dificultad para ser realizados en el campo, por lo que se sugiere tratar de romper el quiste como en el caso del resto de los helmintos que se encuentran enquistados. La rotura del quiste puede realizarse con la utilización de agujas de disección y pinzas de punta fina.

En el caso de los acantocéfalos adultos debe tenerse especial cuidado al momento de ser extraídos ya que, en estos, la probóscide (con ganchos) se encuentra inmersa en la pared intestinal por lo que, para removerlos y no romper esos ganchos hay que ser extremadamente cuidadosos. Una forma con la cual se obtienen buenos resultados es cortar una porción del tejido que rodea la probóscide y separar luego el acantocéfalo con la ayuda de agujas de disección.

**A tener en cuenta:** en este punto es necesario aclarar que los parásitos hallados en un hospedador deben ser conservados en eppendorf separados según el órgano donde han sido colectados. Es decir, de un solo hospedador, al

final del examen parasitológico se contarán tantos eppendorfs como órganos parasitados se hayan encontrado en el examen. Esto es importante ya que los parásitos, generalmente, ocupan un sitio específico en el hospedador y, colocar todos los parásitos en el mismo recipiente llevaría a una confusión. Además, para estudios ecológicos, es necesario contar con el número exacto de especímenes por especie y por órgano parasitado.

Fijación: se fijan de igual manera que los helmintos larvales (metacercarias), utilizando formaldehído caliente al 10% o alcohol 70%. La fijación de los cestodos debe ser inmediata debido a que su tegumento se descompone rápidamente.

### **Anélidos:**

*Oligoquetos:* este grupo de invertebrados se encuentran ocupando los uréteres de los anfibios por lo que, para su colecta, deben examinarse estos túbulos y extraer a los individuos mediante pinzas o pinceles. Una vez extraídos, se los coloca en una cápsula de Petri con solución fisiológica para luego proceder a la fijación.

Fijación: se fijan en formaldehído al 5-10% o en otros fijadores histológicos como Bouin<sup>(18)</sup>. En este último caso se calienta el líquido de Bouin y se coloca al ejemplar, que previamente se ha dispuesto entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Luego, los oligoquetos pueden conservarse en alcohol 70%<sup>(18,72)</sup>.

### **Artrópodos:**

*Pentastómidos:* en los anfibios, los pentastómidos se encuentran dentro de los pulmones. Se los colecta con pinzas de punta fina. Debido a su naturaleza, estos individuos no se rompen fácilmente, pero, de todas maneras, es importante recordar que estructuras esclerotizadas como ganchos y espículas copuladoras serán necesarias para su identificación.

Fijación: son colocados en eppendorf con alcohol 70% a temperatura ambiente<sup>(73,74)</sup>.

## **1. b- Renacuajos:**

1.b.a. Estudio de los parásitos hallados sobre la superficie del cuerpo:

Sobre la superficie del cuerpo de los renacuajos, al estar en el ambiente acuá-

tico, es posible hallar los siguientes grupos de parásitos:

- Helmintos: metacercarias enquistadas debajo de la piel.
- Anélidos: sanguijuelas adheridas por su ventosa anterior.
- Artrópodos: crustáceos copépodos que se adhieren por sus maxilípedos al cuerpo de los renacuajos.

Al igual que en los anfibios adultos se realiza un examen macroscópico de la superficie externa del anfibio y luego, un examen más minucioso del individuo bajo microscopio estereoscópico.

#### **Extracción y fijación:**

##### ***Helmintos:***

*Metacercarias:* para la extracción y fijación se procede de igual manera que en los anfibios adultos.

##### ***Anélidos:***

*Sanguijuelas:* se procede de igual manera que en los anfibios adultos.

##### ***Artrópodos:***

*Copépodos del género Lernaea:* si bien es un parásito de ciprínidos, también ha sido hallado parasitando a anfibios, generalmente en la zona cercana a la cloaca. Los ejemplares se retiran cuidadosamente de los tejidos del hospedador con la ayuda de agujas y bisturíes.

Fijación: se colocan en alcohol 96%<sup>(62,75)</sup>.

#### **1.b.b. Estudio de los parásitos hallados dentro del cuerpo:**

En los anfibios en estado de renacuajo pueden hallarse internamente:

- Helmintos: monogéneos larvales (oncomiracidios) en las branquias; metacercarias enquistadas en la cavidad del cuerpo y la musculatura de la cola; nematodos adultos y, más raramente, digéneos adultos, ambos en el intestino.

En los renacuajos, del mismo modo que en los adultos, se procede al examen de la cavidad del cuerpo; para ello, se realiza una incisión ventral desde la boca hasta la cloaca y se retiran, en una cápsula de Petri con solución fisioló-

gica, los órganos del anfibio.

### Extracción y fijación:

#### ***Helmintos:***

*Monogeneos:* las larvas de monogeneos se ubican en las branquias de los renacuajos. Las branquias deben retirarse del cuerpo del renacuajo y observarse detenidamente bajo microscopio estereoscópico. La presencia de monogeneos se evidenciará por el movimiento de los mismos. Los especímenes deben desprenderse cuidadosamente del filamento branquial y colocarse en cápsulas de Petri que contengan agua del medio en donde se encontraban los renacuajos. Para el estudio de su morfología, algunos ejemplares deben estudiarse *in vivo* (lo que no siempre puede realizarse en el campo por no contar con microscopio óptico)<sup>(20)</sup>.

*Digeneos:* las metacercarias son generalistas en cuanto a ubicación en el cuerpo de los renacuajos; pueden presentarse en la cavidad celómica o en distintos órganos (de acuerdo al estadio del renacuajo), como así también, en la musculatura de la cola. Los digeneos adultos son raramente hallados en renacuajos; cuando están presentes se ubican en el intestino de los mismos.

*Nematodes:* los nematodes hallados en renacuajos pertenecen al género *Gyrinicola* (Orden Oxyurida). En este género el dimorfismo sexual es marcado y el macho presenta un tamaño sumamente pequeño por lo cual, en renacuajos con alto contenido de algas filamentosas su visualización se encuentra dificultada.

Fijación: se procede de igual manera que en el caso de los helmintos hallados en anfibios adultos. En el caso de los nematodes se los fija con formaldehído al 10%; las metacercarias y los monogeneos larvales pueden fijarse con formaldehído al 5%, o bien, con alcohol 70%. En todos los casos deben ser previamente calentados. En el caso de los monogeneos larvales, puede usarse también una solución de picrato-amonio y glicerina (proporción 3:1) como fijador ya que este medio deshace las partes blandas del espécimen conservando solamente las esclerosadas (importantes para el estudio taxonómico). Para ello se coloca el ejemplar en un portaobjeto con unas gotas de la solución y luego se sella el preparado con bálsamo o barniz de uñas transparente<sup>(20)</sup>.

Debido a su extensión, el intestino de los renacuajos debe examinarse por segmentos; la longitud de cada segmento dependerá del contenido que posea el individuo; a mayor cantidad de contenido intestinal, segmentos más cortos.

Posteriormente, al igual que los helmintos hallados en anfibios adultos se los conserva en los respectivos eppendorf rotulados para continuar su estudio

en el laboratorio.

## 2. En el laboratorio

Equipamiento: a partir del momento en que se dispone de los parásitos en el laboratorio, el instrumental necesario para su estudio será todo aquel relacionado principalmente con la coloración, aclaramiento y montaje de los mismos (líquidos colorantes, instrumentos de vidrio, diafanizadores, bálsamo de Canadá, etc.), y para el estudio propiamente dicho de los ejemplares lo cual se realiza con microscopio óptico con ocular micrométrico y cámara clara.

En esta instancia y con el objetivo de facilitar la observación de estructuras para su posterior determinación, a los parásitos hallados se les realiza tratamientos siguiendo técnicas convencionales para cada grupo taxonómico. Algunos, como los platelmintos, deben ser coloreados con hematoxilinas o algún preparado de ácido carmínico; en otros, se realizan tratamientos para su estudio histológico (el caso de especímenes enquistados en órganos determinados). Previamente, es necesario lavar los ejemplares eliminando todo el fijador, para lo que se realizan varios cambios de alcohol 70%.

A continuación, se detallan las técnicas de laboratorio comúnmente empleadas, según el grupo de parásitos. Algunos manuales de microscopia y protocolos de estudio de helmintos presentan las fórmulas de las soluciones utilizadas<sup>(20,76)</sup>. En el **Anexo II** se encuentra el detalle de las empleadas en esta sección.

### **Protozoos:**

*Hemoparásitos:* se tiñen mediante la técnica May-Grünwald Giemsa (ver **Anexo II**). Para ello, el frotis realizado mediante la técnica descrita con anterioridad, una vez seco, se cubre con una mancha de colorante sobre una rejilla de tinción y se deja allí durante 20-40 minutos. Luego, se enjuaga suavemente con agua corriente y se deja secar nuevamente en posición vertical<sup>(22)</sup>.

**A tener en cuenta:** los frotis deben ser observados con mayor aumento (40x) y los preparados de sangre con objetivos de inmersión (100x) para la detección de parásitos intracelulares<sup>(51)</sup>.

*Enteroparásitos:* la muestra previamente fijada se enjuaga con agua de grifo por varios minutos; luego se le coloca mordiente de alumbre de hierro al 4% y se lo enjuaga nuevamente. Posteriormente, se tiñe con hematoxilina de Heidenhain al 0,5% durante toda la noche (aquí el preparado se volverá com-



pletamente negro). Para eliminar el exceso de hematoxilina utilizar alumbre de hierro; aquí comienzan a diferenciarse las estructuras y esta diferenciación deberá ser controlada a través de microscopio. Finalmente, enjuagar con agua corriente al menos por dos horas y luego, deshidratar a través de una serie de alcoholes (70%, 96%, absoluto), aclarar con xileno y montar en bálsamo. Si bien estos pasos pueden llegar a ser complejos, el resultado es que nos proveen de material fijado permanentemente, que facilita su uso (ya que los parásitos están montados) y economiza lugar<sup>(22,51)</sup>.

### ***Helmintos:***

*Monogeneos:* para la observación de sus estructuras esclerotizadas, tales como hamuli y ganchos, estos se montan en medios como Gray y Wess u Hoyer, que permiten el montaje rápido de especímenes sin colorear. El procedimiento consiste en colocar una pequeña gota de agua en un portaobjetos, transferir el monogeneo, remover el exceso de agua con papel de filtro y reemplazar por medio de montaje. Cubrir luego con el cubreobjetos y llevar a estufa por 24 horas. Para colorear los especímenes, se utiliza el Tricrómico de Gomori (ver **Anexo II**) y se montan en bálsamo de Canadá.

*Digeneos y cestodes:* estos platelmintos se comprimen ligeramente entre cubreobjetos y portaobjetos y se sumergen en alcohol 96% por aproximadamente 24 horas antes de la coloración. Esto se realiza, sobre todo, con especímenes de mayor tamaño como los digeneos de los géneros *Haematoloechus* y *Gorgoderina*.

El siguiente paso consiste en la coloración. Entre los colorantes comúnmente utilizados se encuentran las hematoxilinas y el Carmín clorhídrico diluido en alcohol 96% (ver **Anexo II**).

**A tener en cuenta:** si los ejemplares aún se conservaban en el formaldehído fijador, antes de iniciar la coloración deben ser lavados (al menos 2 veces con alcohol 70%). Los mejores resultados en cuanto a la tinción de especímenes se obtienen sobretiñéndolos y luego diferenciándolos (decolorándolos poco a poco), hasta alcanzar el color deseado.

Cuando se colorea con Carmín, el tiempo de tinción es variable y depende del tamaño del ejemplar. El proceso requiere el pasaje de los ejemplares a través de recipientes (cápsulas o placas de Petri) con la ayuda de un pincel fino, lo ideal es trabajar con uno o dos ejemplares por muestra. Luego de la coloración, los ejemplares se diferencian con un pasaje por clorhidrato de etanol con el objetivo de eliminar el exceso de tinte, y se deshidratan mediante un

pasaje por una serie alcohólica creciente (alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 90%, alcohol absoluto). En cada serie de alcohol deben permanecer aproximadamente 15 minutos. La **Figura 4.9.3** esquematiza un tren de tinción para carmín clorhídrico.

Luego de la deshidratación, los individuos son diafanizados en xilol, creosota de la Haya o en eugenol. Para ello, se colocan los individuos en una cápsula conteniendo el diafanizador por un período de tiempo variable.

**A tener en cuenta:** los tiempos de permanencia en cada paso del proceso pueden variar, ya que dependen por ejemplo del fijador utilizado, la especie de helminto, del tamaño de los ejemplares, del tiempo que tenían los mismos en el conservante, entre otros factores.

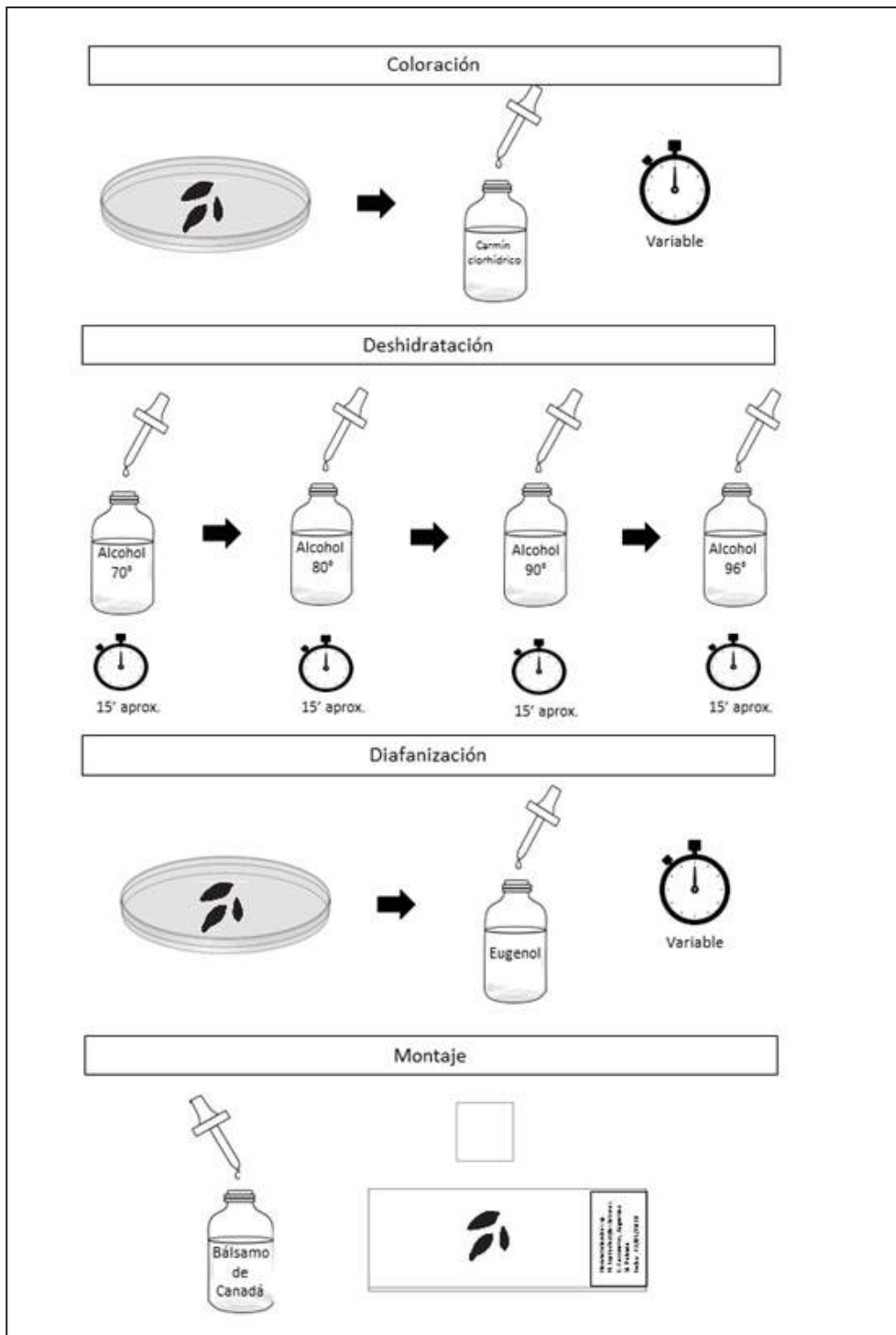
Es importante subrayar que, si bien la creosota es un buen diafanizador, se sugiere no utilizarla por su acción cancerígena.

El último paso consiste en montar los especímenes en bálsamo de Canadá natural en preparaciones permanentes que son secadas en estufa. El tiempo de secado puede variar entre 2 y 15 días dependiendo del tamaño del ejemplar y se recomienda monitorear aproximadamente cada dos días y retirar cuando el preparado se encuentre completamente seco. El bálsamo de Canadá es un medio resinoso que da durabilidad al preparado y además proporciona mayor transparencia, incrementando su índice de refracción<sup>(20)</sup>.

Los estadios larvales de digeneos son tratados de forma similar a los adultos.

*Nematodes:* para su tratamiento en el laboratorio los nematodos no se colorean, en cambio son diafanizados en lactofenol de Amman o en alcohol glicerinado (ver **Anexo II**) para facilitar la observación de estructuras internas. Luego se los estudia como preparaciones húmedas transitorias (**Figura 4.9.4**). Este proceso consiste en colocar una gota de diafanizador en un portaobjetos, colocar en la gota al ejemplar y luego un cubreobjetos por encima. En algunos casos, para observar estructuras importantes para la taxonomía de los nematodos (por ejemplo, la ubicación de las papilas labiales y cefálicas) es necesario realizar un preparado de la región anterior en vista apical. Para ello, con la ayuda de un bisturí u hoja de afeitar se corta transversalmente el extremo anterior del individuo y se prosigue con la preparación habitual teniendo en cuenta que en el preparado en cuestión la región oral debe quedar hacia arriba (*in face view*)<sup>(77)</sup>.

*Acantocéfalos:* los especímenes de gran tamaño, que no pueden ser montados entre porta y cubreobjetos, se tratan en forma similar a los nematodos, realizándose preparados transitorios en alcohol glicerinado para observar sus



**Figura 4.9.3.** Pasos para la coloración de Platelminos y Acantocéfalos y su posterior montaje (para detalles ver el texto).

estructuras internas. Los especímenes de menor tamaño pueden colorearse con Hematoxilina de Mayer o Carmín clorhídrico en forma similar a la utilizada para platelmintos.

**A tener en cuenta:** para la tinción y procesamiento de helmintos, los mejores resultados se obtienen si se realizan inmediatamente después de la recolección y fijación. Todos los cambios de fluidos durante el proceso de coloración deben realizarse utilizando pipetas Pasteur limpias y para evitar su hidratación con la humedad del ambiente, los frascos o cápsulas con soluciones no deben permanecer abiertos más del tiempo absolutamente necesario. Además, es importante que en ningún momento los individuos queden “en seco” durante el procesamiento; no deben dejarse al aire.

La **Tabla 4.9.1** muestra un resumen de los pasos que deben seguirse para el estudio de los helmintos, desde la fijación hasta la conservación de cada uno de los grupos, según el estadio en el que fue hallado.

#### **Anélidos:**

*Oligoquetos:* para el estudio de estos organismos pueden realizarse preparados transitorios con alcohol glicerinado. En lo posible, se trata de que los especímenes queden situados lateralmente para de esta forma poder observar las quetas tanto dorsales como ventrales. Si se tratase de especímenes maduros (se observa la presencia de clitelo) no será posible determinarlos sin examinar la genitalia. Para ello, se sigue un protocolo de tinción que involucra un colorante, como por ejemplo el carmín clorhídrico, y un medio de montaje que puede ser bálsamo de Canadá. Siempre con la precaución de que los especímenes queden ubicados en posición lateral<sup>(18)</sup>.

*Hirudíneos:* las sanguijuelas se colorean para finalmente montarse como preparados permanentes. El colorante utilizado en este proceso puede ser el paracarmín de Mayer, Carmín Borax o hematoxilina de Hams por 12-94 horas. Para diferenciarlas, se las coloca luego en una solución de etanol 1% HCl-70% hasta que la epidermis de la sanguijuela quede libre de colorante y luego se neutraliza en una solución de 1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  — 70% de etanol. La eosina se usa habitualmente como contratinción. Los especímenes teñidos deben deshidratarse en concentraciones progresivamente más altas de etanol, aclararse en salicilato de metilo, y montarse en un medio de pH neutro<sup>(19)</sup>. Para detalle de las soluciones ver el **Anexo II**.

#### **Artrópodos:**

*Ácaros y dípteros:* como preparación para su identificación taxonómica, los ácaros y estados inmaduros de dípteros se aclaran en lactofenol de Amann, luego se los lava en agua corriente y se montan entre portaobjetos y cubreobjetos utilizando medio de Berlese modificado, siendo Hoyer o Faure los

	DIGENEOS	CESTODES	NEMATODES	ACANTOCÉFALOS
<b>Fijación</b>	<p><b>Estados larvales</b></p> <p>- <b>Metarercarias enquistadas:</b> formaldehído 4% o alcohol 70% caliente.</p> <p>Deben desenquistarse previamente mediante la utilización de pinzas y agujas histológicas.</p> <p>- <b>Metarercarias libres:</b> formaldehído 4% caliente.</p>	<p>- <b>Larvas enquistadas:</b> formaldehído 10% o alcohol 70% caliente.</p>	<p>- <b>Larvas enquistadas:</b> formaldehído 10% o alcohol 70% caliente.</p>	<p>- <b>Cistacantos:</b> formaldehído 10% caliente o alcohol 70% caliente.</p> <p>Deben desenquistarse previamente mediante refrigeración en heladera por 24 horas.</p>
<b>Estados adultos</b>	Formaldehído 10% o alcohol 70% caliente.	Formaldehído 4%-10% caliente (inmediata).	Formaldehído 10% o alcohol 70% caliente.	Formaldehído 10% o alcohol 70% caliente.
<b>Coloración</b>	Sí - Carmín clorhídrico	Sí - Carmín clorhídrico	No	Sí - Carmín clorhídrico o Hematoxilina de Mayer
<b>Aclaramiento</b>	Xilol o eugenol	Eugenol	Lactofenol de Amann o alcohol glicerinado	Eugenol
<b>Conservación</b>	Preparados permanentes	Preparados permanentes	Eppendorf con alcohol 70%	Preparados permanentes

**Tabla 4.9.1.** Fijación, coloración, aclaramiento y conservación para los principales grupos de helmintos hallados en anfibios.

más utilizados (ver **Anexo II**). Algunos ácaros que presentan poca queratinización no se aclaran, luego de fijados directamente se montan en el medio. El período de aclarado puede extenderse aproximadamente entre 1 y 15 días a temperatura ambiente. Una vez montados, es conveniente su secado en estufa a 50 °C<sup>(78)</sup>.

Las larvas de garrapatas, por su parte, se limpian en una solución acuosa de hidróxido de potasio al 20% y se montan en medio de Hoyer como preparados semipermanentes, que serán luego estudiados mediante microscopía óptica<sup>(56)</sup>.

*Pentastómidos*: los pentastómidos se limpian primero con una solución de ácido láctico al 85% y se realiza una observación mediante microscopía óptica; también pueden aclararse con líquido de Hoyer. Se diseccionan luego para la extracción de las estructuras esclerotizadas (ganchos, fulcro, espículas copuladoras) que serán montadas entre porta y cubreobjetos en la misma solución con el fin de medir y fotografiar<sup>(10)</sup>.

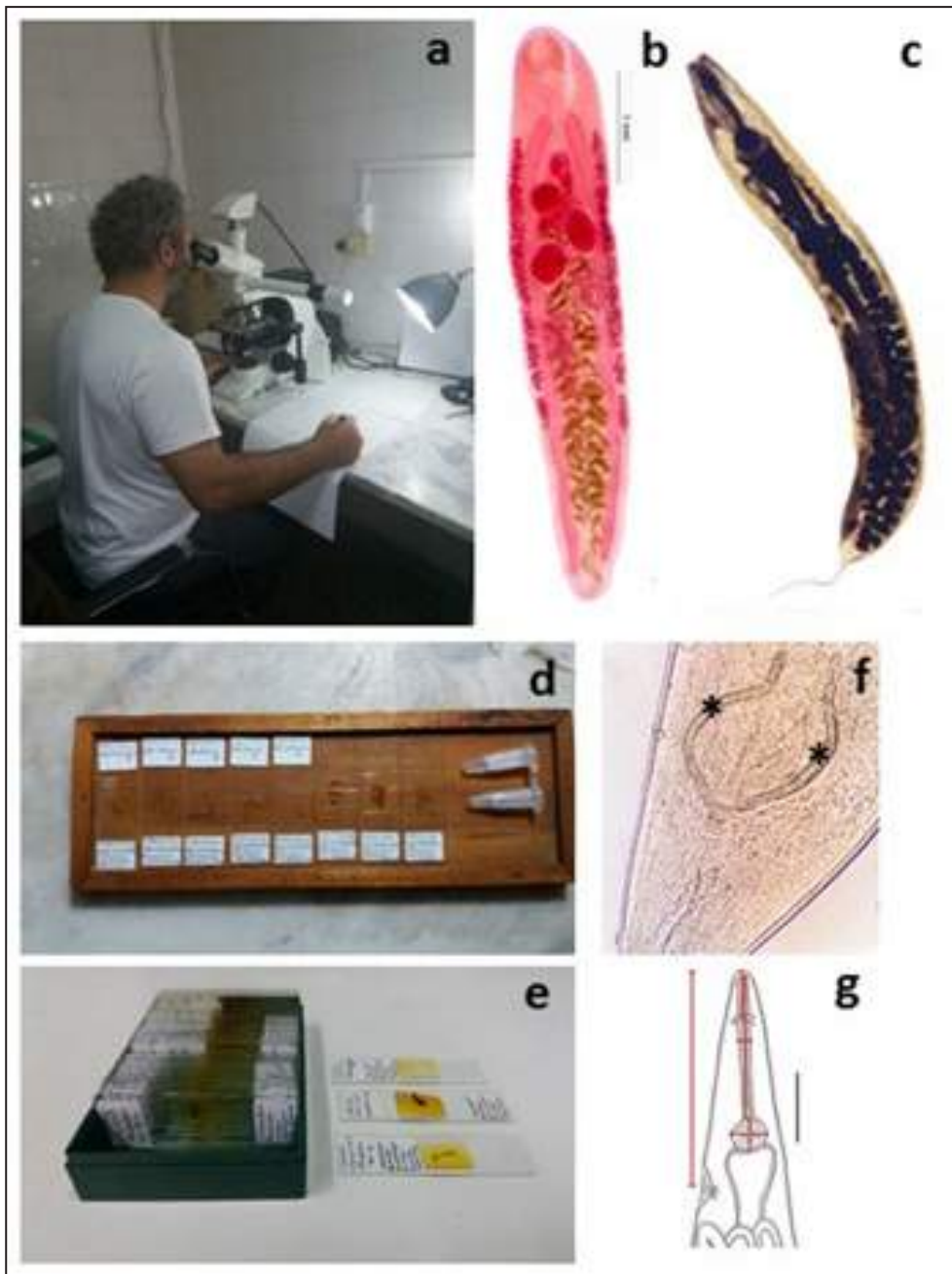
**A tener en cuenta:** el medio de Hoyer es muy tóxico y se debe tener cuidado cuando se usa. Evitar el contacto con la piel, utilizar guantes siempre que sea posible o lavarse las manos inmediatamente después de su utilización.

### **Observación al Microscopio electrónico de barrido (MEB)**

Para estudios de ultraestructuras se realizan observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido. Las técnicas utilizadas para la preparación de los organismos pueden sufrir alguna modificación que dependerá del grupo con el que se quiera trabajar. En general, una vez limpios, los especímenes se deshidratan en una serie de alcoholes y acetonas y son secados por el método de punto crítico con CO<sub>2</sub>. Las muestras luego se montan en una lámina metálica de cobre o aluminio con cinta bifaz y posteriormente se los metaliza con un baño de oropaladio u oro para finalmente observarse y fotografiarse en vacío<sup>(30,79)</sup>.

### **Medidas, fotografías y dibujos**

Por lo general y por su pequeño tamaño, las medidas de los especímenes se dan en micras (µm), salvo otra indicación; y son tomadas con ayuda de un ocular micrométrico en un microscopio óptico, o bien sobre dibujos realizados con la cámara clara (**Figura 4.9.4**). La cámara clara es un elemento indispensable en el estudio de los parásitos. Este accesorio nos permite una recreación exacta de la muestra que observamos ya que conserva las proporciones y medidas originales. Una de las características importantes de la cámara clara es que permite realizar dibujos en distintos planos (moviendo



**Figura 4.9.4.** Estudio de los helmintos parásitos en anfibios. (a) Dibujo de los ejemplares mediante el uso de cámara clara. (b) Ejemplar de digeneo adulto coloreado con carmín clorhídrico. (c) Ejemplar hembra de nematode sin colorear. (d) Ejemplares de helmintos en sus respectivos medios de conservación; platelmintos y acantocéfalos montados en portaobjetos con bálsamo de Canadá con sus respectivas etiquetas a la izquierda de la plancha; ejemplares de nematodes con sus respectivas etiquetas en eppendorf con líquido conservante a la derecha de la plancha. (e) Ejemplares de platelmintos y acantocéfalos listos para ser guardados en sus respectivas cajas de portaobjetos. (f) Extremidad posterior de un nematode macho tratado con lactofenol de Amann. (g) Extremidad anterior de un nematode señalando las principales características morfométricas que se registran en la extremidad anterior de los mismos. Fotos: a, c-g: C. E. González; b: M. I. Hamann

\* espículas

el micrométrico) los que luego podrán unirse para presentar un dibujo completo del ejemplar. Las microfotografías son tomadas con cámaras oculares en microscopios ópticos.

### Identificación de los parásitos

Para la identificación de los protozoos hemáticos pueden consultarse trabajos recientes, principalmente realizados en Brasil, que tienen en cuenta tanto da-

tos morfológicos como moleculares<sup>(80-82)</sup>; para la identificación de protozoos entéricos se cuenta con trabajos realizados asimismo en anfibios neotropicales<sup>(83,84)</sup>. Para Argentina específicamente, pueden consultarse investigaciones realizadas tanto en anfibios larvales como adultos<sup>(48-51)</sup>. Si bien estos trabajos no son estrictamente claves de identificación, proporcionan información que puede ser de ayuda para determinar especies o familias.

En cuanto a helmintos, pueden consultarse para el grupo de los monogéneos, catálogos de especies de Sudamérica que proporcionan asimismo figuras detalladas y lista de hospedadores<sup>(85)</sup>, trabajos en relación a su filogenia y clasificación<sup>(86,87)</sup>, como así también trabajos que describen especies a partir de hospedadores de Argentina<sup>(88-90)</sup>. Para el resto de los grupos de helmintos existen claves clásicas de identificación para digeneos<sup>(91-95)</sup>, cestodos<sup>(96)</sup>, nematodos<sup>(97-99)</sup> y acantocéfalos<sup>(100,101)</sup>. Para la identificación de metacercarias pueden consultarse estudios descriptivos de estos estadios hallados en anfibios argentinos<sup>(58,102)</sup>.

Para los anélidos, pueden utilizarse diferentes guías para identificar oligoquetos acuáticos<sup>(103,104)</sup> o trabajos más específicos dentro de este grupo, como por ejemplo para la familia Naididae<sup>(105)</sup>. Para las sanguijuelas, en Argentina se cuenta con algunas revisiones para ambientes dulceacuícolas<sup>(106-108)</sup>, aunque también pueden consultarse trabajos referidos a su diversidad Neotropical<sup>(109)</sup> y global<sup>(110)</sup>.

Finalmente, para artrópodos, existen trabajos de revisión muy completos y que abarcan diagnosis, distribución, ecología e importancia sanitaria tanto de garrapatas<sup>(111-113)</sup> como de ácaros<sup>(114)</sup>. En cuanto a los pentastómidos se cuenta con trabajos recientes que abarcan la diversidad de este grupo en distintos grupos de vertebrados<sup>(115-117)</sup>.

## Bibliografía

1. Hoff, G.L.; Frye, F.L. & Jacobson, E.R. 1984. Diseases of Amphibians and Reptiles. Plenum Press. Nueva York.
2. Densmore, C.L. & Green, D.E. 2007. Diseases of Amphibians. *ILAR Journal* 48: 235-254.
3. Koprivnikar, J.; Marcogliese, D.J.; Rohr, J.R.; Orlofske, S.A.; Raffel, T.R. & Johnson, P.T.J. 2012. Macroparasite Infections of Amphibians: What Can They Tell Us? *EcoHealth* 9: 342-360.
4. Pough, F.H.; Andrews, R.M.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H.; Wells, K.D. & Brandley, M.C. 2015. Diets, Foraging, and Interactions with Parasites and Predators: 501-530. *En: Pough, F.H.; Andrews, R.M.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H.; Wells, K.D. & Brandley, M.C. (eds.). Herpetology. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.*
5. Blaustein, A.R.; Han, B.A.; Relyea, R.A.; Johnson, P.T.; Buck, J.C.; Gervasi, S.S. & Kats, L.B. 2011. The complexity of amphibian population declines: Understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of New York Academy of Sciences* 1223: 108-119.
6. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Basso, A.; Curi, L.; Martinuzzi, C.; Agostini, G.; Ghirardi, R.; López, J.A.; Kacoliris, F.; Martino, A.; Natale, G.S.; Arellano,



- M.L.; Úbeda, C.; Vaira, M. & Akmentins, M.S. 2018. Componente 3. Amenazas: 31-35. *En: Vaira, M.; Akmentins, M.S. & Lavilla, E.O. (eds.). Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina. Cuadernos de Herpetología* 32 (supl. 1).
7. Aho, J.M. 1990. Helminth Communities of Amphibians and Reptiles: Comparative Approaches to Understanding Patterns and Processes: 157-196. *En: Esch, G.W.; Bush, A.O. & Aho, J.M. (eds.). Parasite Communities: Patterns and Processes.* Chapman & Hall. London.
  8. Price, P.W. 1990. Host Populations as Resources Defining Parasite Community Organization: 21-40. *En: Esch, G.; Bush, A. & Aho, J. (eds.). Parasite Communities: Patterns and Processes.* Chapman and Hall. New York.
  9. Poulin, R. & Morand, S. 2004. Parasite Biodiversity. Smithsonian Books. Washington.
  10. Pritchard, M.H. & Kruse, G.O.W. 1982. The Collection and Preservation of Animal Parasites. University of Nebraska Press. Lincoln.
  11. Amato, J.F.R. 1985. Manual de Técnicas para a Preparação de Coleções Zoológicas. 8. Platelminhos (Temnocefálicos, Trematódeos, Cestóides, Cestodários) e Acanthocefalos. Sociedade Brasileira de Zoologia, São Paulo.
  12. Ash, L.R. & Orihel, T.C. 1991. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. ASCP Press. Chicago.
  13. Lamothe Argumedo, R. 1997. Manual de Técnicas para Preparar y Estudiar los Parásitos de Animales Silvestres. AGT Editor. México D.F.
  14. Justine, J-L.; Briand, M.J. & Bray, R.A. 2012. A quick and simple method, usable in the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and molecular studies. *Parasitology Research* 11: 341-351.
  15. Sepúlveda, M.S. & Kinsella, J.M. 2013. Helminth collection and identification from wildlife. *Journal of Visualized Experiment* 82: e51000.
  16. Mohr, J.L. 1981. Methods for Staining Protozoans in Blood, Macrophages or Body Fluids: 281-309. *En: Baltimore, C.G. (ed.). Staining Procedures.* Philadelphia.
  17. Sonenshine, D.E. 1991. Biology of Ticks. Volumen 2, Oxford University Press. New York, Oxford.
  18. Pinder, A. 2010. Tools for identifying selected Australian aquatic oligochaetes (Clitellata: Annelida). *Museum Victoria Science Reports* 13: 1-26.
  19. Govedich, F.R. & Moser, W.E. 2015. Clitellata: Hirudinida and Acanthobdellida. *En: Thorp J. & Rogers, D.C. (eds.). Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates.* Academic Press, London.
  20. Salgado-Maldonado, G. 2009. Manual de Prácticas de Parasitología con Énfasis en Helminthos Parásitos de Peces de Agua Dulce y otros Animales Silvestres de México. Disponible en: [http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salgado/manual/manual\\_prac\\_parasitol.pdf](http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/s/salgado/manual/manual_prac_parasitol.pdf). Último acceso: 27 de agosto de 2019.
  21. Amato, J.F.R. & Amato, S.B. 2010. Técnicas Gerais para Coleta e Preparação de Helminthos Endoparasitos de Aves: 367-394. *En: Von Matter, S.; Costa Straube, F.; Almeida Accordi, I.; Queiroz Piacentini, V. & Cândido Jr., J.F. (eds.). Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento.* Technical Books Editora. Rio de Janeiro.
  22. Smyth, J.P. & Smyth, M.M. 1980. Frogs as Host-Parasite Systems I. An introduction to Parasitology through the Parasites of *Rana temporaria*, *R. esculenta* and *R. pipiens*. The Macmillan Press Ltd. London.
  23. Goater, T.M. & Goater, C.P. 2001. Ecological Monitoring and Assessment Network (EMAN). Protocols for Measuring Biodiversity: Parasites of Amphibians and Reptiles. Canada. [http://eqb-dqe.cciw.ca/eman/ecotools/protocols/terrestrial/herp\\_parasites/intro.htm](http://eqb-dqe.cciw.ca/eman/ecotools/protocols/terrestrial/herp_parasites/intro.htm).
  24. von Hagens, G.; Tiedemann, K. & Kriz, W. 1987. The current potential of plastination. *Anatomy and Embryology* 175: 411-421.
  25. González, M.; Ortiz, J.; Navarro, M. & Latorre, R. 2018. Preservation of macroparasite species via classic plastination: an evaluation. *Folia Parasitologica* 65: 019.
  26. Halton, D. 2004. Microscopy and the Helminth parasite. *Micron* 35: 361-390.
  27. Allison, V.; Ubelaker, J.; Webster Jr., R. & Riddle, J. 1972. Preparations of Helminths for scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology* 58: 414-416.
  28. Hirschmann, H. 1983. Scanning Electron Microscopy as a Tool in Nematode Taxonomy: 95-111. *En: Stone, A.; Platt, H. & Khalil, L. (eds.). Concepts in Nematode Systematics.* Academic Press. Nueva York.

29. Gibbons, L.M. 1986. SEM Guide to the Morphology of Nematode Parasites of Vertebrates. CAB International, Wallingford.
30. González, C.E.; Hamann, M.I. & Salgado, C. 2012. Study of Helminth Parasites of Amphibians by Scanning Electron Microscopy: 267-294. *En: Kazmiruk V. (ed.). The Scanning Electron Microscope. InTech Open Acces, Rijeka.*
31. Tavares, R.G.; Staggemeier, R.; Borges, A.L.P.; Rodrigues, M.T.; Castelan, L.A.; Vasconcelos, J.; Anschau, M.E. & Spalding, S.M. 2011. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 17: 239-248.
32. Martin, D.S.; Wright, A.-D.G.; Barta, J.R. & Desser, S.S. 2002. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes, *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveuilemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. *Journal of Parasitology* 88: 566-571.
33. Tkach, V. & Pawlowski, J. 1999. A new method of DNA extraction from the ethanol-fixed parasitic worms. *Acta Parasitologica* 44: 147-148.
34. Yoder, M.; De Ley, I.T.; King, I.W.; Mundo-Ocampo, M.; Mann, J.; Blaxter, M.; Poiras, L. & De Ley, P. 2006. DESS: a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology* 8: 367-376.
35. Justine, J.-L.; Briand, M.J. & Bray, R.A. 2012. A quick and simple method, usable in the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and molecular studies. *Parasitology Research* 111: 341-351.
36. Mangold, A.J.; Bargues, M.D. & Mas-Coma, S. 1998a. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 84: 31-37.
37. Mangold, A.J.; Bargues, M.D. & Mas-Coma, S. 1998b. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 84: 478-484.
38. Huggins, L.G.; Michaels, C.J.; Cruickshank, S.M.; Preziosi, R.F. & Else, K.J. 2017. A novel copro-diagnostic molecular method for qualitative detection and identification of parasitic nematodes in amphibians and reptiles. *PLoS ONE* 12: e0185151.
39. Johnson, P.T.J.; Lunde, K.B.; Thurman, E.M.; Ritchie, E.G.; Wray, S.N.; Sutherland, D.R.; Kapfer, J.M.; Frest, T.J.; Bowerman, J. & Blaustein, A.R. 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72: 151-168.
40. Johnson, P.T.J. & Lunde, K.B. 2005. Parasite Infection and Limb Malformations: A Growing Problem in Amphibian Conservation: 124-138. *En: Lannoo, M.J. (ed.). Amphibian Declines: The Conservation Status of United States Species. University of California Press. Berkeley.*
41. Rajakaruna, R.S.; Piyatissa, P.; Jayawardena, U.A., Navaratne, A.N. & Amerasinghe, P.H. 2008. Trematode infection induced malformations in the common hourglass treefrogs. *Journal of Zoology* 275: 89-95
42. Jayawardena, U.A.; Rajakaruna, R.S.; Navaratne, A.N. & Amerasinghe, P.H. 2010. Monostome cercariae induced malformations in amphibians: effect of infection at the pre-limb-bud stage tadpoles of *Polypedates cruciger* Blyth. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 38: 241-248.
43. Davies, D.; Davies, C.; Lauthier, J.J.; Hamann, M. & De Núñez, M.O. 2015. Morphological and ITS2 molecular characterization of *Ribeiroia* cercariae (Digenea: Psilostomidae) from *Biomphalaria* spp. (Gastropoda: Planorbidae) in Northern Argentina. *Journal of Parasitology* 101: 549-555.
44. Drago, F.B.; Lunaschi, L.I. & Schenone, M. 2011. Digenean parasites of the Neotropical Cormorant, *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin, 1789) (Aves: Phalacrocoracidae) from Argentina: Distribution extension and new host records. *Check List* 7: 871-875.
45. Lunaschi, L. & Drago, F. 2007. Checklist of digenean parasites of amphibians and reptiles from Argentina. *Zootaxa* 1476: 51-68.
46. González, C.E. & Hamann, M.I. 2015. Checklist of nematode parasites of amphibians from Argentina. *Zootaxa* 3980: 451-476.
47. Hernández-Orts, J.S.; Kuchta, R.; Semenas, L.; Crespo, E.A.; González, R.A. & Aznar, F.J. 2015. An annotated list of the Acanthocephala from Argentina. *Zootaxa* 4663: 1-64.
48. Mazza, S.; González, C.; Franke, I. & Alvarado, S. 1927. Tripanosomas observados en ranas (*Leptodactylus ocellatus* L.) del país. *Revista Universidad de Buenos Aires* 5: 902- 905.

49. Vucetich, M. & Giacobbe, O. 1949. Polimorfismo del *Trypanosoma rotatorium*. Nuevos batracios argentinos parasitados. *Universidad Nacional de Tucumán, Anales del Instituto Médico Regional* 2: 225-244.
50. Cabagna Zenklusen, M.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, A.M. & Lajmanovich, R.C. 2006. Hallazgo de *Giardia agilis* (Protozoa: Diplomonadida), parásito de larvas de *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae) en agroecosistemas de la provincia de Entre Ríos, Argentina. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 17: 106-108.
51. Cabagna Zenklusen, M.C.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M. & Attademo, A.M. 2009. Primeros registros de endoparásitos en cinco especies de anfibios anuros del litoral argentino. *Cuadernos de Herpetología* 23: 33-40.
52. Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Junges, C.; Bassó, A. & Cabagna-Zenklusen, M. 2012. Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Anura) inhabiting selected soybean and rice agroecosystems of Argentina. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43: 579-584.
53. Quinzio, S. & Goldberg, J. 2015. Intradermal infections by chigger mites (*Hannemania* spp.) in the Andean frog *Telmatobius atacamensis* (Anura, Telmatobiidae). *Salamandra* 51: 263-268.
54. García, G.; Mangione, S. & Montenegro, R. 2018. Infestation with intradermal and subhypodermic larvae of the mite *Hannemania* sp. (Acari: Leeuwenhoekidae) in anurans of the Province of Salta, Argentina. *Revista Argentina de Parasitología* 7: 17-22.
55. González Rivas, C.J.; Castillo, G.N.; Acosta, J.C.; Venzal, J.M. & Guglielmo, A.A. 2012. Primer reporte de parasitismo de una garrapata blanda del género *Ornithodoros* (Ixodida: Argasidae) sobre *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en el departamento de Valle Fértil, San Juan, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26: 95-97.
56. Venzal, J.M.; Castillo, G.N.; Gonzalez-Rivas, C.J.; Mangold, A.J. & Nava, S. 2019. Description of *Ornithodoros montensis* n. sp. (Acari, Ixodida: Argasidae), a parasite of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura: Bufonidae) in the Monte Desert of Argentina. *Experimental and Applied Acarology* 78:133-147.
57. González, C.E. & Hamann, M.I. 2005. *Gyrinicola chabaudi* Araujo & Artigas, 1982 (Nematoda: Pharyngodonidae) in tadpoles of *Scinax nasicus* (Cope, 1862) (Anura: Hylidae) from Corrientes, Argentina. *Facena* 21: 145-148.
58. Hamann, M.I. & González, C.E. 2009. Larval digenetic trematodes in tadpoles of six amphibian species from Northeastern Argentina. *Journal of Parasitology* 95: 623-628.
59. Castillo, G.N.; Ramallo, G.; Bursey, C.R.; Goldberg, S.R. & Acosta, J.C. 2017. *Pseudis plantensis*. Endoparasites. *Herpetological Review* 48: 611-612.
60. Villegas-Ojeda, M.A. & Tanzola, R.D. 2019. Ensamblajes de helmintos parásitos en larvas de *Boana pulchella* (Anura, Hylidae) en un arroyo serrano del Sudoeste bonaerense (Argentina). *Revista Argentina de Parasitología* 8: 15-24.
61. Salinas, Z.A.; Biolé, F.G.; Grenat, P.R.; Pollo, F.E.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2016. First report of *Lernaea cyprinacea* (Copepoda: Lernaeidae) in tadpoles and newly metamorphosed frogs in wild populations of *Lithobates catesbeianus* (Anura: Ranidae) in Argentina. *Phyllo-medusa* 15: 43-50.
62. Salinas, Z.A.; Babini, M.S.; Grenat, P.R.; Biolé, F.G.; Martino, A.L. & Salas, N.E. 2019. Effect of parasitism of *Lernaea cyprinacea* on tadpoles of the invasive species *Lithobates catesbeianus*. *Heliyon* 5: e01834.
63. Fox, S.F.; Greer, A.L.; Torres-Cervantes, R. & Collins, J.P. 2006. First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Diseases Aquatic Organisms* 72: 87-92.
64. Vaira, M.; Akmentins, M.; Attademo, M.; Baldo, D.; Barrasso, D.; Barrionuevo, S.; Basoo, N.; Blotto, B.; Cairo, S.; Cajade, R.; Céspedes, J.; Corbalán, V.; Chilote, P.; Duré, M.; Falcione, C.; Ferraro, D.; Gutierrez, R.; Ingaramo, M.; Junges, C.; Lajmanovich, R.; Lescano, J.; Marangoni, F.; Martinazzo, L.; Martí, R.; Moreno, L.; Natale, G.; Pérez Iglesias, J.; Peltzer, P.; Quiroga, L.; Rosset, S.; Sanabria, E.; Sanchez, L.; Schaefer, E.; Úbeda, C. & Zaracho, V. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26: 131-159.
65. International Union for Conservation of Nature. 2020. The IUCN's Red List of Threatened Species. Version 2017-3, IUCN. Último acceso: 21 de abril de 2020.
66. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on

- identification. *Herpetology* 16: 183-190.
67. Frey, J.K.; Yates, T.L.; Duszynski, D.W.; Gannon, L. & Gardenr, S.L. 1992. Designation and curatorial management of type host specimens (symbiotypes) for new parasite species. *Journal of Parasitology* 78: 930-932.
  68. Brooks, D.R. 1993. Extending the Symbiotype Concept to Host Voucher Specimens. *Journal of Parasitology* 79: 631-633.
  69. Mulieri, P.R.; Schaefer, E.F.; Duré, M.I. & González, C.E. 2018. A new flesh fly species (Diptera: Sarcophagidae) parasitic on leptodactylid frogs. *Parasitology Research* 117: 809-818.
  70. Oyarzún-Ruiz, P. & González-Acuña, D. 2020. Colecta, preparación e identificación de parásitos. *Parasitología Latinoamericana* 69: 12-29.
  71. Woo, P.T.K. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology* 47: 921-923.
  72. Brinkhurst, R.O. 1986. Guide to the freshwater aquatic microdrile oligochaetes of North America. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 84: 1-259.
  73. Barton, D.P. & Riley, J. 2004. *Raillietiella indica* (Pentastomida) from the lungs of the Giant Toad, *Bufo marinus* (Amphibia), in Hawaii, U.S.A. *Comparative Parasitology* 71: 251-254.
  74. Barton, D.P. 2007. Pentastomid parasites of the introduced Asian House Gecko, *Hemidactylus frenatus* (Gekkonidae), in Australia. *Comparative Parasitology* 74: 254-259.
  75. Waicheim, M.A.; Arbetman, M.; Rauque, C. & Viozzi, G. 2019. The invasive parasitic copepod *Lernaea cyprinacea*: updated host-list and distribution, molecular identification and infection rates in Patagonia. *Aquatic Invasions* 14: 350-364.
  76. Langeron, M. 1942. Précis de Microscopie. Masson et Cie, Paris.
  77. Anderson, R. C. 1958. Methode pour l'examen des nématodes en vue apicale. *Annals de Parasitologie Humaine et Comparée* 34: 171-172.
  78. Zhang, Z.-Q. 2003. Mites of Greenhouses: Identification, Biology and Control. CABI Publishing, Wallingford.
  79. Corwin, D., Clifford, C.M. & Keirans, J.E. 1979. An improved method for cleaning and preparing ticks for examination with the scanning electron microscope. *Journal of Medical Entomology* 16: 352-353.
  80. Ferreira, R.C.; Campaner, M.; Viola, L.B.; Takata, C.S.A.; Takeda, G.F. & Teixeira, M.M.G. 2007. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology* 134: 1623-1638.
  81. Lemos, M.; Morais, D.H.; Carvalho, V.T. & D'Agosto M. 2008. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Parasitology* 94: 148-151.
  82. Leal, D.D.M.; O'Dwyer, L.H.; Ribeiro, V.C.; Silva, R.J.; Ferreira, V.L. & Rodrigues, R.B. 2009. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in Anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States — Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81: 199-206.
  83. Delvinquier, B.L.J. & Marinkelle, C.J. 1996. Opalinidae (Slopalinida) in South American Amphibia. Genus *Opalina* Purkinje & Valentin, 1835 in Colombia. *Systematic Parasitology* 34: 27-35.
  84. Delvinquier, B.L.J. & Marinkelle, C.J. 1997. Opalinidae (Slopalinida) in South American Amphibia. Genus *Zelleriella* Metcalf, 1920 in Colombia. *Systematic Parasitology* 38: 93-110.
  85. Cohen, S.C.; Justo, M.C.N. & Kohn, A. 2013. South American Monogeneoidea parasites of fishes, amphibians and reptiles. Editorial Oficina de Livros, Rio de Janeiro.
  86. Boeger, W.A. & Kritski, D.C. 1993. Phylogeny and a revised classification of the Monogeneoidea Bychowsky, 1937 (Platyhelminthes). *Systematic Parasitology* 26: 1-32.
  87. Olson, P.D. & Littlewood, D.T.J. 2002. Phylogenetics of the Monogenea—evidence from a medley of molecules. *International Journal for Parasitology* 32: 233-244.
  88. Combes, C. & Laurent, R.F. 1974. *Polystoma borellii* n. sp. (Monogenea, Polystomatidae) parasite de *Pleurodema borellii* (Anura, Leptodactylidae) en République Argentine. *Acta Zoológica Lilloana* 31: 57-94.
  89. Combes, C. & Laurent, R.F. 1978. Deux nouveaux Polystomatidae (Monogenea) de République Argentine. *Acta Zoológica Lilloana* 32: 85-91.
  90. Combes, C. & Laurent, R.F. 1979. Les Monogènes Polystomatidae de République Argentine: description de deux nouvelles espèces et essai de synthèse. *Revista Ibérica de Parasitología* 79: 545-557.

91. Yamaguti, S. 1958. *Systema Heminthum*. Vol.1. The digenetic trematodes of vertebrate. Interscience, New York.
92. Yamaguti, S. 1975. A Synoptical Review of Life Histories of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Kyoto, Japan.
93. Gibson, D.I.; Jones, A. & Bray, R.A. 2002. Keys to the Trematoda. Vol. 1. CABI Publishing y The Natural History Museum, Wallingford.
94. Jones, A.; Bray, R.A. & Gibson, D.I. 2005. Keys to the Trematoda. Vol. 2. CABI Publishing and The Natural History Museum, Londres.
95. Bray, R.A.; Gibson, D.I. & Jones, A. 2008. Keys to the Trematoda. Vol. 3. CABI Publishing and The Natural History Museum, Londres.
96. Khalil, L.F.; Jones, A. & Bray, R.A. 1994. Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. CAB International, Wallingford.
97. Yamaguti, S. 1961. *Systema Heminthum*. Vol. 3. The Nematodes of Vertebrate. Interscience New York. Supplementary Volume, CAB International, Wallingford.
98. Anderson, R.C.; Chabaud, A.G. & Willmontt, S. 2009. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Archival Volume. CAB International, Wallingford, Oxford.
99. Gibbons, L.M. 2010. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Supplementary Volume, CAB International, Wallingford, Wallingford.
100. Yamaguti, S. 1963. *Systema Heminthum*. Vol. 5. The Acantocephala of Vertebrates. I. Interscience New York.
101. Amin, O.A. 2013. Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitologica* 60: 273-305.
102. Hamann, M.I.; Fernández, M.V. & González, C.E. 2019. Metacercariae of Strigeidae parasitizing Amphibians of the Chaco region in Argentina. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 91: e20180044.
103. Brinkhurst, R.O. & Jamieson, B.G.M. 1971. Aquatic Oligochaeta of the World. Oliver and Boyd, Edimburgo.
104. Brinkhurst, R.O. & Marchese, M.R. 1992. Guía para la Identificación de Oligoquetos Acuáticos Continentales de Sud y Centroamérica. Colección Climax, Santo Tomé.
105. Harman, W.J. 1980. Specific and Generic Criteria in Freshwater Oligochaeta, with Special Emphasis on Naididae: 1-8. *En: Brinkhurst, R.O. & Cook, D.G. (eds.). Aquatic Oligochaeta Biology*. Springer US, Boston.
106. Ringuelet, R.A. 1944. Revisión de los Hirudíneos argentinos de los géneros *Helobdella*, *Batrachobdella*, *Cylicobdella* y *Semiscolex*. *Revista del Museo de La Plata Nueva Serie. Zoología* 4: 5-94.
107. Ringuelet, R.A. 1985. Fauna de Agua Dulce de la República de Argentina. Hirudinea, FECIC, Buenos Aires, Argentina.
108. Gullo, B.S. 2014. Biodiversidad de Hirudinea en ambientes dulceacuícolas serranos (Provincia de Buenos Aires), Argentina. *Revista del Museo de La Plata Sección Zoología* 23: 1-11.
109. Christoffersen, M. L. 2009. A catalogue of *Helobdella* (Annelida, Clitellata, Hirudinea, Glossiphoniidae), with a summary of leech Diversity from South America. *Neotropical Biology and Conservation* 4: 89-98.
110. Sket, B. & Trontelj, P. 2008. Global diversity of leech. *Hydrobiologia* 595: 129-137.
111. Kohls, G.M.; Sonenshine, D.E. & Clifford, C.M. 1965. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the larvae of the western hemisphere and descriptions of three new species. *Annals Entomological Society of America* 58: 331-364.
112. Estrada-Peña, A.; Mangold, A.J.; Nava, S.; Venzal, J.M & Labruna, M. 2010. A review of the systematics of the tick family Argasidae (Ixodida). *Acarologia* 50: 317-333.
113. Nava, S.; Venzal, J.M.; Acuña, D.G.; Martins, T.F. & Guglielmone, A.A. 2017. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Academic Press. London.
114. Krantz, G.W. & Walter, D.E. 2009. A Manual of Acarology. Texas Tech University Press, Lubbock.
115. Christoffersen, M.L. & De Assis, J.E. 2013. A systematic monograph of the Recent Pentastomida, with a compilation of their hosts. *Zoologische Mededelingen* 87: 1-206.
116. Paré, J.A. 2008. An overview of pentastomiasis in reptiles and other vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 17: 285-294.
117. Poore, G.C.B. 2012. The nomenclature of the Recent Pentastomida (Crustacea), with a list of species and available names. *Systematic Parasitology* 82: 211-240.

**ANEXO I**

	<b>Número de Protocolo:</b>
<b>HOSPEDADOR:</b>	
<b>LUGAR:</b>	<b>COORDENADAS:</b>
<b>FECHA:</b>	<b>PESO:</b>
<b>LONGITUD:</b>	<b>SEXO:</b>
<b>ESTADIO DE GOSNER:</b>	
<b>Método de eutanasia:</b>	
<b>A- SUPERFICIE EXTERNA DEL CUERPO:</b>	
<b>B- EXAMEN INTERNO:</b>	
Cavidad del cuerpo:	
Musculatura:	
Mesenterios:	
Cerebro:	
Zona faríngea:	
Pulmones:	
Estómago:	
Intestino delgado:	
Intestino grueso:	
Vesícula biliar:	
Riñones:	
Cloaca:	
<b>OBSERVACIONES:</b>	

## ANEXO II

<b>Fijadores más usados:</b>	<b>Colorantes más usados:</b>
<p>* <i>Formaldehído al 10%</i> Formaldehído al 40%: 10 partes Agua destilada: 90 partes</p> <p>* <i>Formaldehído al 5%</i> (para metacercarias) Formaldehído al 40%: 5 partes Agua destilada: 95 partes</p> <p>* <i>Alcohol 70%</i></p> <p>* <i>A.F.A.</i> Etanol 95%: 50 partes Formaldehído 40%: 6 partes Ácido acético glacial: 4 partes Agua destilada: 40 partes</p> <p>* <i>Fleming</i> Ácido crómico al 1%: 15 partes Ácido ósmico al 2%: 4 partes Ácido acético glacial: 1 parte</p> <p>* <i>Bouin</i> Solución saturada de ácido pícrico: 15 partes Formaldehído 40%: 5 partes Ácido acético: 1 parte</p> <p>* <i>Líquido de Schaudinn</i> (cloruro de mercurio saturado) Cloruro de mercurio: 100ml Etanol absoluto: 50ml Ácido acético glacial: 7,5ml</p>	<p>* <i>May-Grünwald Giemsa</i> Glicerol: 40ml Alcohol metílico: 65ml Giemsa en polvo: 1g Se diluye en solución buffer 3:97</p> <p>* <i>Carmín Clorhídrico</i> Carmín: 5ml Ácido clorhídrico: 5ml Agua destilada: 5ml Alcohol 90%: 200ml</p> <p>* <i>Tricómico de Gomori</i> Cromotropo 2R: 0,6g Fast green FCF, Light green o Anilina blue: 0,3g Ácido fosfotúngstico: 0,8g Ácido acético glacial: 1ml Agua destilada: 100ml</p> <p>* <i>Hematoxilina de Mayer</i> Agua destilada: 1000ml Sulfato aluminico potásico o sulfato aluminico de amonio: 50g Hematoxilina cristalizada: 1g Yodato de sodio: 0,2g Ácido cítrico: 1g Hidrato de cloral: 50g</p> <p>* <i>Hematoxilina de Heidenhain</i> Hematoxilina cristalina: 0,5g Alcohol 96%: 10ml Agua destilada: 90ml</p>

<p><b><u>Diferenciadores:</u></b>  * Etanol 70°GL — Clorhídrico 0,5%  Etanol 70°: 199 ml  Ácido clorhídrico: 1 ml</p> <p><b><u>Diafanizadores:</u></b>  * Xilol  * Creosota de Haya  * Eugenol  * Lactofenol de Amann  Fenol derretido (ácido carbólico): 3 partes  Ácido láctico: 1 parte  Glicerina pura: 2 partes</p> <p>* Alcohol glicerinado  Alcohol 70%: 90 partes  Glicerol: 10 partes</p>	<p><b><u>Medios de montaje:</u></b>  * Bálsamo de Canadá</p> <p>* Berlese modificado:  H<sub>2</sub>O destilada: 50ml  Hidrato de cloral: 50g  Glicerol: 20ml  Goma arábica: 30g</p> <p>* Hoyer  Hidrato de Cloral: 100g  Goma arábica en cristales: 15g  Glicerina: 10ml  Agua destilada: 25ml</p> <p>* Gray y Wess  Alcohol polivinílico (PVA 71-24) en polvo: 2g  Acetona 70%: 7ml  Glicerina: 5ml  Ácido láctico: 5ml  Agua destilada: 10 ml</p>
--	--



## 4.10 REGISTRO DE HONGOS. PROTOCOLOS EN CAMPO Y LABORATORIO

**Romina Ghirardi<sup>1</sup>, María Luz Arellano<sup>2</sup> & Judit Dopazo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo s/n, Santa Fe, provincia de Santa Fe / Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Santa Fe, Echagüe 7151, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Sección Herpetología, División Zoología de Vertebrados, CONICET - Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Avenida 122 y 60 s/n, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

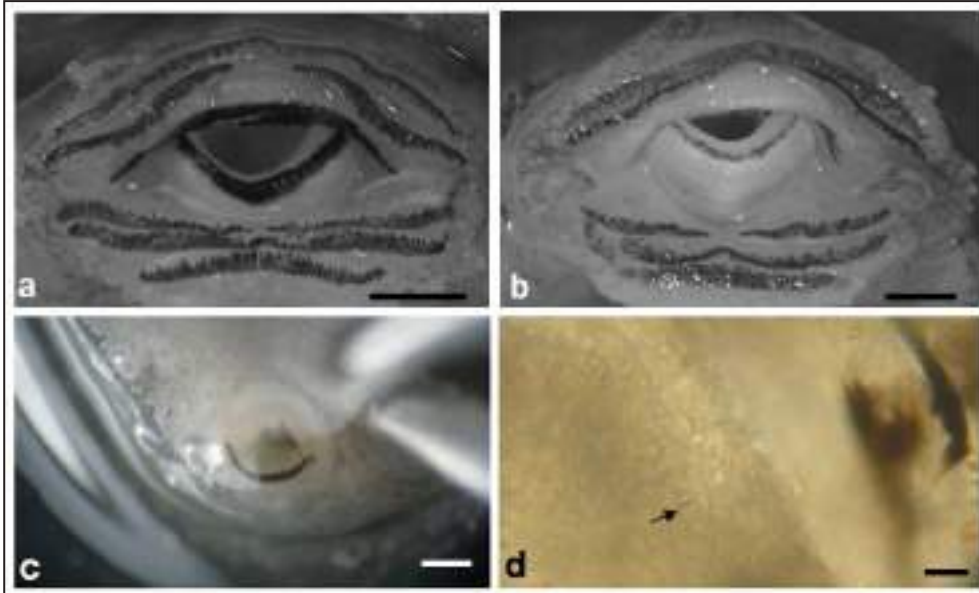
<sup>3</sup> Instituto Multidisciplinario sobre Ecosistemas y Desarrollo Sustentable. UNCPBA y Cátedra de Histología, Embriología y Teratología. Departamento de Cs. Biológicas, FCV, UNCPBA, Buenos Aires, Argentina.

Entre los responsables de la declinación global de anfibios, las enfermedades han sido reconocidas como uno de los factores importantes en todo el mundo<sup>(1-12)</sup>. Los agentes etiológicos que las causan son numerosos y entre los más comunes podemos mencionar a los virus, bacterias, ácaros, gusanos, mohos y hongos. En esta sección nos centraremos en las técnicas para la identificación de la presencia e infección por hongos en los diferentes estadios de la ontogenia de anfibios.

*Batrachochytrium dendrobatidis* -*Bd*- (Reino Fungi: Clase Chytridiomycetes: Orden Rhizophydiales) fue, hasta hace dos décadas, conocido sólo como parásito de plantas, algas, protistas e invertebrados. La especie que afecta a los anfibios fue descrita en el año 1999, siendo el primer caso conocido en el que un quitridio afecta a un vertebrado<sup>(13,14)</sup>. Este hongo se caracteriza por afectar el estrato superficial (córneo y granuloso) de la piel de los anfibios anuros<sup>(15,16)</sup>. Las lesiones en la piel generalmente son leves, y la hiperqueratosis se presenta como el cambio más evidente. Algunos ejemplares pueden desarrollar hiperplasia irregular, desorden en las células de la epidermis, espongirosis, erosiones y ulceraciones ocasionales<sup>(15,16)</sup>. Este tipo de alteraciones interfieren con varias funciones epiteliales de los anfibios, incluyendo la circulación y mantenimiento de agua y sales, la respiración y su rol como barrera contra las toxinas y agentes de infección<sup>(17)</sup>. Por otro lado, estas modificaciones en las funciones epiteliales repercuten en el comportamiento de juveniles y adultos, generando aletargamiento, adelgazamiento por falta de alimentación y disminución en el brillo de la piel. Sin embargo, existen especies de anfibios que pueden actuar como reservorios de *Bd* sin presentar signos de infección y, en la mayoría de los animales infectados en estado silvestre no se han observado estos signos clínicos o el periodo de manifestación de los mismos suele ser muy corto limitándose a algunos individuos que luego morirán<sup>(17)</sup>.

### **Antecedentes de técnicas de detección de *Batrachochytrium dendrobatidis***

Las primeras técnicas utilizadas para la evaluación de presencia del hongo quitridio en anfibios fueron observaciones de los ejemplares bajo lupa (**Figura 4.10.1** y **Figura 4.10.2**) y cortes histológicos de piel (**Figura 4.10.3**)<sup>(16-20)</sup>. La visualización de mudas de piel bajo lupa se propone teniendo en cuenta que un signo clínico observado en la quitridiomycosis es la muda excesiva de piel de la superficie epidérmica. La piel mudada a menudo procede del abdomen, las extremidades y los pies<sup>(16,21,22)</sup>, y en su observación bajo lupa se pueden identificar procesos de hiperqueratosis y presencia de zoosporangios. Este tipo de metodología resulta accesible, ya que proporciona medi-

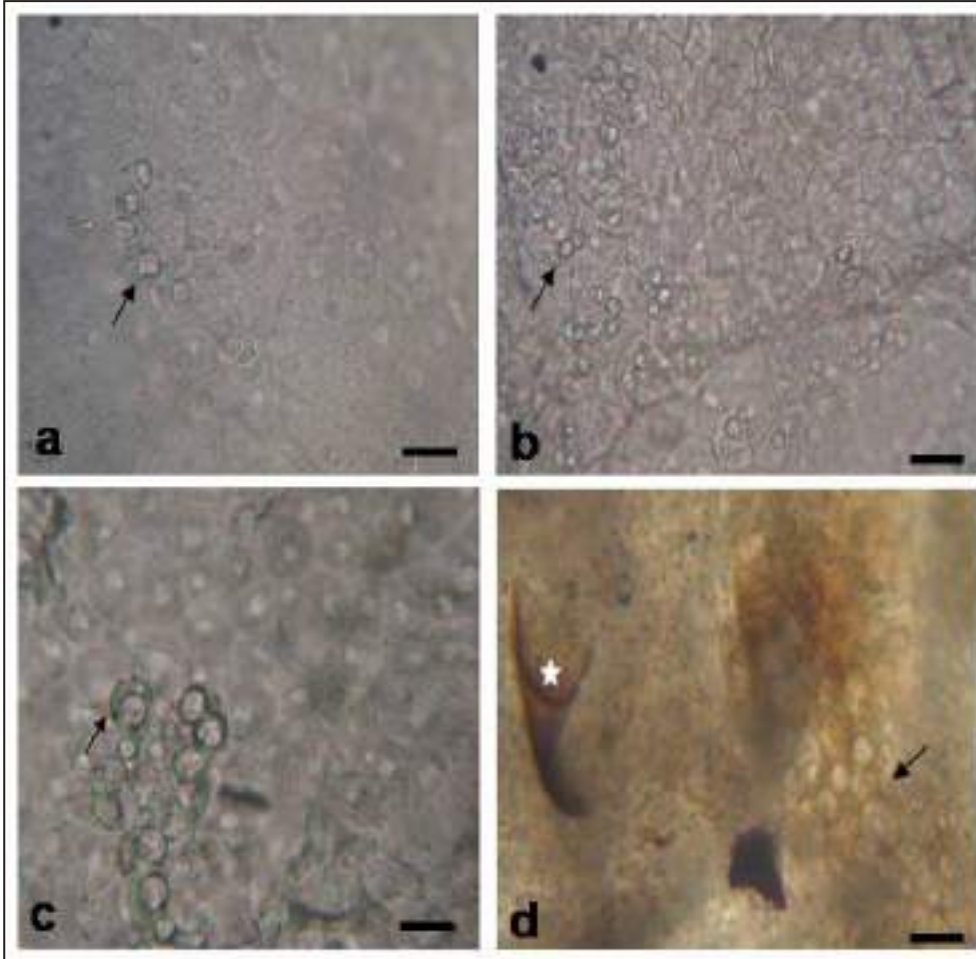


**Figura 4.10.1.** Diagnóstico directo, se observan las partes bucales queratinizadas de un individuo no infectado (a) y uno infectado con despigmentación (b) observación en lupa (c) y en microscopio óptico (400X) (d). Escala: (a) 0,42 mm; (b) 0,46 mm; (c) 2,5 mm y (d) 20  $\mu$ m. Fotos: María Luz Arellano.

ciones cuantitativas de *Bd* y aumenta la confianza en la detección de estudios histológicos<sup>(20)</sup>. Complementariamente a la observación bajo lupa, durante los primeros años del descubrimiento de *Bd*, usando técnicas histológicas, se incrementó exponencialmente el número de registros de *Bd* en diferentes regiones y especies de anfibios a nivel mundial<sup>(23,24,25)</sup>. Con este panorama y complementariamente a los estudios histológicos, se propusieron nuevas técnicas de detección. Adicionalmente, la técnica histológica o de observación de mudas de piel permitió hacer análisis en especímenes de colección conservados tanto en alcohol como en formol cuando se planteó en análisis retrospectivo de la infección<sup>(26)</sup>.

Sin embargo, y pese a que la histología y la observación bajo lupa se convirtieron en métodos ampliamente utilizados, se comenzaron a encontrar puntos débiles en estas técnicas para el estudio de *Bd* relacionados a:

- (1) sensibilidad: la superficie observada resulta demasiado pequeña en relación a la superficie total del individuo estudiado, lo que puede generar muchos falsos negativos<sup>(27)</sup>;
- (2) especificidad: deja abierta la posibilidad de falsos positivos por similitud de las esporas de *Bd* con las de otros hongos y/o por el posible sesgo del observador;
- (3) invasión: para la técnica histológica se requiere una muestra de piel por lo que se debe sacrificar el individuo<sup>(28)</sup> o recurrir a la amputación de dedos<sup>(27,29)</sup>;
- (4) insumo de tiempo: la técnica histológica requiere un tiempo prolongado

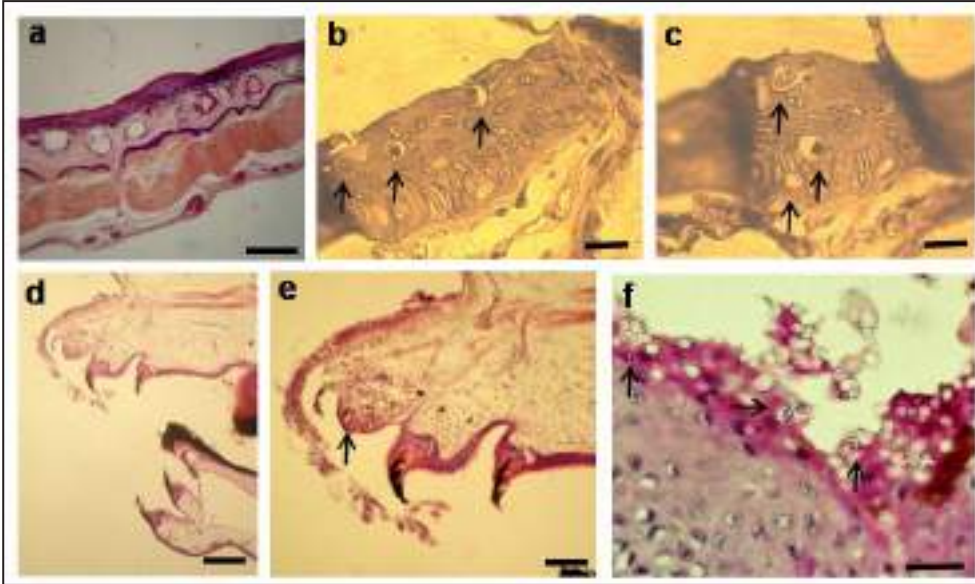


**Figura 4.10.2.** Preparados húmedos, se observa muda de piel con zoosporangios vacíos (flechas) en *Boana pulchella* (a), *Pseudopaludicola falcipes* (b), *Odontophrynus americanus* (c) y partes bucales de *Rhinella fernandezae* (d) (nótese los queratodontes -estrella-). Escalas: (a) 16 $\mu$ m 200X, (b) 24 $\mu$ m 100X, (c) 18 $\mu$ m 400X y (d) 10 $\mu$ m 400X. Fotos: María Luz Arellano.

de procesado de la muestra, y una vez montada en los portaobjetos, un tiempo adicional de observación en el microscopio.

Cuando se comienza a trabajar con *Bd* este tipo de técnicas resulta accesible a los investigadores, si se cuenta con un laboratorio de histología el trabajo se hace fácil, pero aún si no se cuenta con el laboratorio es un servicio sencillo de tercerizar con técnicos especializados o con laboratorios de histología.

Si bien se ha sugerido que la quitridiomycosis en individuos post metamórficos y adultos gravemente infectados se puede diagnosticar fácilmente por observación directa de signos clínicos como desprendimiento epidérmico anormal, enrojecimiento de las superficies ventrales y cambios de comportamiento tales como letargo y pérdida del reflejo de pronación<sup>(18)</sup>, los individuos que presentan estas últimas etapas de la infección rara vez se encuentran en ambientes naturales. Esto es debido tanto al corto período de sobrevivencia, como a la rapidez con la que son eliminados del ambiente, ya sea por descomposición o por depredación por otros animales.



**Figura 4.10.3.** Cortes histológicos de sección de piel de *Leptodactylus luctator* sin señales de *Bd* (a) y con zoosporangios en diferentes grados de desarrollo (b y c) -flechas-. Corte de parte bucal de larva sin señales de *Bd* (d) y con zoosporangios en los queratodotes (e y f) -flechas-. Escala: (a) 0,15mm 200X, (b) 20µm 400X, (c) 15µm 400X, (d) 70µm 200X, (e) 35µm 200X y (f) 30µm 400X. Fotos: (a-e) Romina Ghirardi y (f) María Luz Arellano.

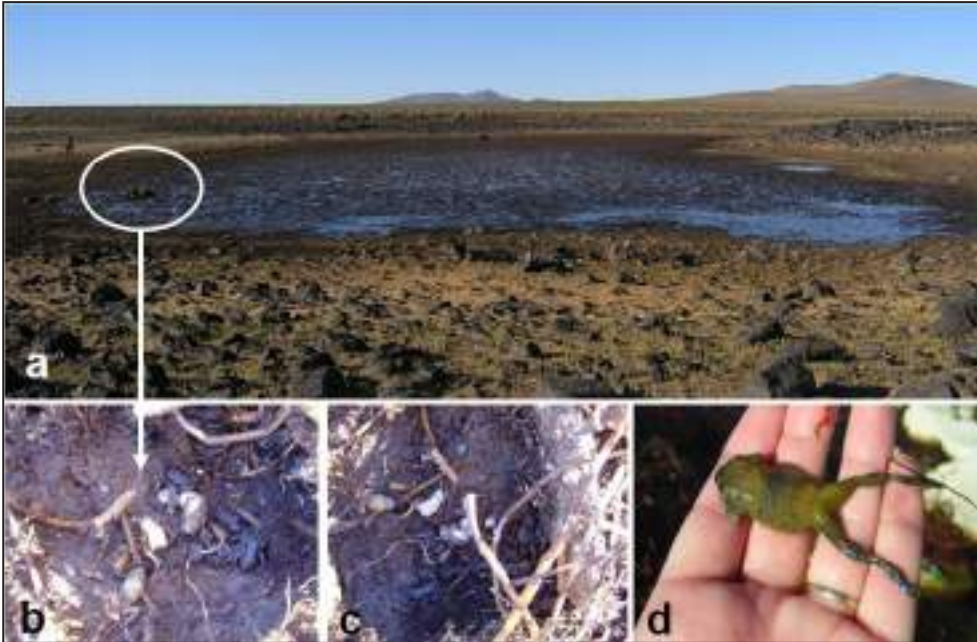
En zonas de humedales con aguas turbias, muy vegetadas y con clima cálido, los individuos muertos duran muy poco en el ambiente antes de su descomposición. Incluso si los ejemplares se encuentran entre camalotales o juncuales es muy difícil visualizarlos. Por el contrario, algunas regiones presentan cuerpos de agua transparente, climas más fríos y poca vegetación en los cuerpos de agua y alrededores, lo que permite visualizar con más facilidad si hay individuos muertos o moribundos en el ambiente (**Figura 4.10.4**).

Considerando estas diferencias, y las dificultades en algunos ambientes para evaluar la salud de los individuos a simple vista en campo, las pruebas para detección de *Bd* en anfibios silvestres requieren de análisis de laboratorio de muestras tomadas de individuos aparentemente sanos. Esto genera controversias, ya que se deben sacrificar individuos aparentemente sanos para evaluar una posible infección por el hongo con técnicas histológicas que resultan altamente invasivas o deletéreas.

Para contrarrestar estas técnicas invasivas utilizadas originalmente, se comenzaron a realizar estudios de presencia de *Bd* por medio de técnicas moleculares (amplificación por PCR:<sup>30, 31</sup>) mediante hisopado de la piel de los individuos. Este tipo de técnica resolvió los inconvenientes de la observación bajo lupa o de las técnicas histológicas relacionados a:

(1) sensibilidad: con el hisopado se puede cubrir toda la superficie piel donde se concentra el hongo en cada individuo a analizar;

(2) especificidad: el análisis molecular sólo resulta positivo ante la presencia de *Bd* y no de otro hongo o agente etiológico similar;



**Figura 4.10.4.** Laguna Hueso (a), en Parque Nacional Laguna Blanca (Neuquén). Se marca con un círculo la pirca de piedras donde se registraron ejemplares de *Atelognathus patagonicus* muertos y moribundos, con signos típicos de quitridiomycosis (b - d). Fotos: (a y d) Ma. Gabriela Perrotti, (b y c) Javier A. López.

(3) invasión: solo se frota un hisopo sobre el individuo a analizar y se lo libera inmediatamente en su ambiente (no es necesario sacrificarlo);

(4) insumo de tiempo: en un laboratorio equipado adecuadamente no se requiere demasiado tiempo para el procedimiento. Una vez que el laboratorio recibe la muestra, ésta puede ser procesada y analizada en el mismo día si el laboratorio se encuentra adecuadamente equipado y preparado para ello, a diferencia de la observación bajo lupa o con técnicas histológicas, que una vez procesada la muestra se debe continuar con la observación minuciosa en lupa o microscopio.

A pesar de que las técnicas moleculares son más costosas, poseen la ventaja de ser prácticas no letales y muy poco invasivas para los individuos en relación a la toma de muestra, por lo que se volvieron muy populares y utilizadas en todo el mundo.

Con el avance de las técnicas moleculares de PCR tradicional, y con el objetivo de cuantificar la infección en los individuos afectados, se comienza a utilizar la técnica de PCR cuantitativo (qPCR adultos:<sup>27,32,33</sup>; qPCR larvas:<sup>(34)</sup> con mejoras en la capacidad analítica de la prueba al poder cuantificar la infección<sup>(35)</sup>.

Con la mejora de las técnicas de detección de *Bd*, se han desarrollado análisis moleculares para identificar la presencia de zoosporas liberadas en el ambiente por individuos infectados. Este tipo de análisis moleculares se

adecuaron a muestras de suelo y agua para la detección de *Bd*<sup>(36,37,38)</sup> y en muestras de ejemplares de colecciones de museo<sup>(39)</sup>. La misma técnica de análisis molecular ha sido puesta a punto para estudios experimentales con individuos infectados en un medio acuático<sup>(40)</sup>. Este tipo de análisis añade información novedosa, ya que no sólo se puede evaluar la infección de los individuos, sino también estudiar la periodicidad de la liberación de zoosporas al medio<sup>(40)</sup>.

Mediante la aplicación complementaria de todas las técnicas antes mencionadas, actualmente el estudio de la presencia de *Bd* en anfibios y en el ambiente se puede realizar en muestras de diversos orígenes y en casi todas las regiones del mundo.

## Descripción de los métodos de registro e identificación de *Bd*

### 1. Registro en campo

#### 1.a. Diagnóstico directo

El diagnóstico de *Bd* mediante la observación directa de los anfibios en campo es una tarea difícil. En la mayoría de los animales infectados no se observan signos clínicos específicos muy evidentes. En el caso de las *larvas*, es posible observar a simple vista o bajo lupa individuos infectados por la presencia de despigmentación de la capa epidérmica del disco oral, la presencia de dientes acortados o la pérdida de los mismos (**Figura 4.10.1**)<sup>(17)</sup>. Sin embargo, estos no son signos específicos de *Bd*, y muchas veces dependiendo del estadio puede ser un proceso natural por inicio de metamorfosis. Por otro lado, en los juveniles y adultos, el periodo de manifestación de los signos suele ser corto y se limita a los anfibios que pronto morirán. Como signos clínicos observables a simple vista, en las infecciones graves a veces pueden notarse alteraciones macroscópicas de la piel, que consisten en una muda anómala (más frecuente de lo normal y en trozos más pequeños) y eritema, pero estos signos clínicos no son específicos de la quitridiomycosis. Por otro lado, entre las alteraciones del comportamiento, predominan aquellas vinculadas a movimientos lentos y descoordinados, posturas de sedestación anómalas, espasmos tetánicos, pérdida del reflejo de erguido y parálisis<sup>(17)</sup> así como aletargamiento, adelgazamiento por falta de alimentación y disminución en el brillo de la piel (**Figura 4.10.4**).

Como muchas veces el diagnóstico directo resulta difícil, sino imposible de realizar, se describen a continuación las técnicas de diagnóstico más frecuen-

tes utilizadas, que incluyen colecta de muestras y trabajo en laboratorio, desde lo menos a lo más invasivo.

### 1.b. Colecta de muestras

#### 1.b.i. Toma de muestra de piel (raspado, frotis o mudas)

El examen de raspados o frotis de piel es un método rápido y sencillo para identificar *Bd* y puede realizarse con muestras frescas, congeladas o fijadas<sup>(41)</sup>. La piel mudada se levanta o se raspa sobre el ejemplar (mediante una hoja de bisturí o una espátula de plástico estéril) y se extiende sobre un portaobjeto con 1 o 2 gotas de agua o de solución salina, se cubre con un cubreobjetos y se examina la preparación con un microscopio óptico<sup>(17,42)</sup>.

Para obtener las mudas, otra opción es colocar individuos vivos en recipientes individuales con agua y esperar 24hs. Luego de transcurrido ese período, se toma la piel desprendida, se la fija en formol 10% para posterior observación bajo microscopio óptico<sup>(20)</sup>.

#### 1.b.ii. Hisopado para análisis moleculares

Los individuos a ser hisopados deben ser cuidadosamente manipulados con guantes de manera individual. Cuando se está pasando el hisopo estéril, se debe aplicar cierta presión, sin lastimar al animal.

En caso de tratarse de individuos “sucios” (por ej. cubiertos de barro) se recomienda, previo al hisopado, quitarles cuidadosamente la suciedad con agua procedente del propio lugar donde se encuentra el individuo a muestrear o en su defecto con agua destilada.

- En las **larvas** se debe pasar un hisopo, de 5 a 8 veces, en la zona del disco oral. Debe insertarse el hisopo en la boca y hacerlo girar varias veces para obtener muestra de los aparatos bucales<sup>(17,34,42,43)</sup>.

- En los **juveniles y adultos** se debe pasar el hisopo aproximadamente 30 veces sobre el individuo de la siguiente manera:

10 veces sobre la superficie inguinal (5 en lateral derecho- 5 en lateral izquierdo).

10 veces en patas delanteras (5 en derecha y 5 en izquierda).

10 veces en patas traseras (5 en derecha y 5 en izquierda).

Una vez hisopado el individuo (larva, juvenil o adulto), se debe secar el hiso-



po al aire (ventilando en círculos en el aire unas 4 o 5 veces), y luego colocarlo en el tubo, con la cabeza hacia el fondo del tubo y teniendo la precaución de que el hisopo no toque la tapa del mismo. Las muestras pueden ser guardadas a una temperatura ambiente por hasta 72 hs (evitando las temperaturas extremas y la luz solar directa), aunque es óptimo mantener las muestras frescas y colocarlas tan pronto como sea posible en heladera a 4 °C.

El almacenamiento de las muestras en etanol al 70% no se recomienda para el procedimiento de PCR convencional ni de qPCR (excepto si el laboratorio cuenta con una centrífuga al vacío). Por este motivo es importante contactarse, previamente al muestreo, con el laboratorio que realizará el estudio. Para más información ver Pessier y Mendelson<sup>(42)</sup>.

#### *1.b.iii. Colecta de agua filtrada para análisis moleculares*

Para la determinación de *Bd* en “baños” de agua, los individuos con sospecha de infección colectados en el campo se deben colocar en recipientes individuales estériles de polipropileno con 150 ml de agua del ambiente. El agua del “baño” puede analizarse directamente tras una inmersión de 15 minutos (si hay tiempo se puede dejar a los individuos 24 hrs en el baño) o como alternativa, puede filtrarse el agua del baño y guardar los filtros secos (por ejemplo, filtros de 0.45 µm<sup>2</sup> a temperatura ambiente o a 4 °C) hasta que sean analizados<sup>(17)</sup>.

#### *1.b.iv. Toma de muestra para ADN ambiental (agua y sedimento)*

Para la toma de muestra de ambiente, se sugiere seguir las técnicas de Miaud y col.<sup>(44)</sup>, Barnes y col.<sup>(37)</sup> y Spitzen-van der Sluijs y col.<sup>(45)</sup>. Para ello se deben recolectar 250 ml de agua superficial y realizar una filtración en el lugar usando una bomba de vacío manual y cinco filtros de 1 µm (Membranas Nuclepore Track-Etch®, Whatman, Maidstone, Reino Unido), con una submuestra de 50 ml de agua filtrada en cada uno. Para la toma de muestra de sedimento se sugiere seguir las técnicas de Branelli y col.<sup>(46)</sup>. Para ello se debe coleccionar una porción de sedimento del fondo del cuerpo de agua (aproximadamente a 0,5 m de la orilla). Tanto los filtros de agua como las muestras de sedimento deben ser llevadas al laboratorio en hielo y conservadas a -20 °C hasta su procesamiento.

#### *1.b.v. Toma de muestra de dedos*

Esta técnica se utiliza tanto para cortes histológicos como para análisis moleculares. En campo se colecta al animal y se le corta una falange del dedo para el examen<sup>(23)</sup> y los anfibios pueden ser liberados sin necesidad de sacrificar al animal. Esta no es una técnica muy utilizada por cuestiones éticas e incertidumbre sobre la supervivencia de los individuos liberados una vez hecha la escisión<sup>(42)</sup>.

En el caso de que ninguna de las opciones anteriores sea posible para tomar la muestra y liberar a los individuos, se debe proceder a la colecta de los ejemplares para su posterior análisis en laboratorio.

#### *1.b.vi. Colecta de individuos*

La colecta de individuos para análisis de *Bd* se debe realizar siguiendo los protocolos estándares de muestreo para larvas y adultos descriptos en OIE<sup>(17)</sup> y Pessier y Mendelson<sup>(42)</sup> teniendo los recaudos necesarios para evitar la contaminación cruzada por *Bd*.

- Si el objetivo final de la colecta es **observación en lupa** o **realización de cortes histológicos**, los individuos deben ser eutanizados siguiendo técnicas estándares (ver el apartado correspondiente en este manual) y fijados en formol 10% para su posterior procesamiento.

- Si el objetivo final de la colecta es determinación de *Bd* por **técnicas moleculares** y los ejemplares deben ser trasladados al laboratorio para la toma de muestras pero luego pueden ser restituidos a su hábitat, se deben mantener vivos en recipientes individuales hasta que se les realice el hisopado.

En el caso de necesitar un diagnóstico individual, los individuos juveniles o adultos deben ser manipulados prestando especial atención para que no se contaminen entre ellos. Para esto cada individuo debe ser manipulado/colectado con guantes de nitrilo, y los guantes deben ser renovados para la manipulación/colecta de cada nuevo ejemplar. En caso de encontrarse en un sitio con muchos individuos, se pueden utilizar bolsas de nylon para capturarlos. Se debe utilizar la bolsa a modo de guante para realizar la captura de cada uno de los individuos, manteniéndolos en la misma hasta el momento de proceder a realizar el hisopado.

En el caso de estar realizando una evaluación a nivel poblacional o de sitio, y de no tener opción de mantenimiento individual, se pueden colectar los ejemplares en recipientes compartidos. En este caso, se evalúa sólo la presencia del hongo en el ambiente, sin poder cuantificar la carga en cada ejemplar colectado.

## **2. Trabajo de laboratorio**

La determinación de presencia de *Bd* en el laboratorio se puede realizar por diferentes técnicas que requieren el reconocimiento de la morfología del hongo según con qué instrumento se observe.

## 2.a. Cómo identificar al *Bd* en los anfibios

### 2.a.i. Reconocimiento de *Bd* mediante observación en lupa

En las **preparaciones húmedas por raspado, frotis o mudas**, normalmente se observan esporangios (5-13  $\mu\text{m}$ ) intracelulares de forma entre redonda y ovalada formando agrupaciones (**Figura 4.10.2**). En la piel mudada, el estadio más frecuente es el de esporangios vacíos viejos, aunque también es frecuente hallar esporangios que contienen zoosporas. Los tubos de descarga (asociados a los zoosporangios), de los cuales salen zoosporas, suelen apuntar perpendicularmente a la superficie de la piel y, por tanto, son pequeños círculos, tal vez difíciles de diferenciar. La observación de septos internos dentro de los esporangios aumenta la confianza en el diagnóstico. Los núcleos de las células de la epidermis son de tamaño similar al de los esporangios, pero pueden diferenciarse por sus membranas irregulares y poco definidas, y por su aspecto plano, granular y gris<sup>(17)</sup>.

### 2.a.ii. Reconocimiento de *Bd* mediante observación en microscopio en un preparado histológico

Existe numerosa literatura detallada que describe las características morfológicas del hongo *Bd*<sup>(13,16,21)</sup>. Ver **Figura 4.10.3** para observar distintos cortes y estadios de *Bd* en la piel, y a continuación, se describirán brevemente algunas de las características que podrían resultar más útiles:

El talo suele medir entre 7 a 20  $\mu\text{m}$  en la sección histológica. Habitualmente se pueden identificar cuatro formas:

Etapa pequeña uninucleada

Forma multinucleada punteada con citoplasma microvacuolado.

Zoosporangio maduro que contiene múltiples y discretas zoosporas esféricas basófilas (2 a 3  $\mu\text{m}$ ).

Talo vacío (éstos contienen zoosporas previamente vertidas). Los talos vacíos son, algunas veces, la forma predominante observada en los métodos morfológicos.

La aparición de zoosporangios maduros puede ser confundida con las etapas de vida de un organismo protozoario. Las funciones prácticas más útiles para un diagnóstico morfológico definitivo son:

La presencia de talos vacíos que presenten evidencia de septación interna. Estos son los restos de “talos coloniales” característicos de *Bd*.

Se observan talos con tubos de descarga prominentes que le dan al talo una apariencia de “frasco”.

## 2.b. Preparación húmeda de frotis, raspado o muda

En general, las muestras de preparación húmeda como frotis, raspado o muda se pueden teñir con Azul algodón de lactofenol (Parker Ink®) y 10% KOH<sup>(47)</sup> o Rojo Congo<sup>(48)</sup> para ayudar a visualizar las paredes de talos de *Bd*. En este tipo de montaje en fresco las muestras cutáneas pueden ser además esparcidas en un portaobjetos de microscopio, secadas en aire y pintadas con tintes hematológicos tales como Wright's o Wright-Giemsa (Tambien Diff-Quick). Se obtiene una monocapa uniforme de células epidérmicas queratinizadas. Inicialmente se utiliza el objetivo de 100 aumentos para examinar una zona y a continuación el de 400 para confirmar la presencia de esporangios. Los esporangios intracelulares, de forma entre redonda y ovalada, forman agrupaciones en el interior de las células hospedadoras<sup>(17)</sup>.

- En las **larvas** se pueden realizar observaciones en lupa de la región bucal para evaluar además la coloración de la capa epidérmica del disco oral (**Figura 4.10.1**). Se deben seleccionar larvas comprendidas entre los estadios 30 y 41 de Gosner<sup>(49)</sup> debido a que la despigmentación causada por la quitridiomycosis en general no es evidente hasta el estadio 30<sup>(50)</sup> y las estructuras bucales de las larvas comienzan a modificarse y a perderse a partir del estadio 41 como consecuencia de los cambios que se producen durante la metamorfosis<sup>(49)</sup>. La observación en fresco se realiza mediante disección del disco oral, de trozos de las filas de “dientes” o de las capas dérmicas, sección que luego se dispone en un portaobjetos, se adiciona 1 o 2 gotas de agua o solución salina y se recubre con un cubreobjetos. Mediante esta técnica de visualización directa se pueden detectar agrupaciones de esporangios<sup>(17)</sup> que interrumpen el patrón de mosaico de las células epiteliales escamosas.

- En los **juveniles y adultos** se puede observar las mudas de piel, en las que se pueden ver ulceraciones y uno o más esporangios que interrumpen el patrón de mosaico de las células epiteliales escamosas como se describió más arriba (**Figura 4.10.2**).

## 2.c. Preparación de cortes histológicos

Para el análisis de presencia de *Bd* mediante técnicas histológicas hay que tener en cuenta el estadio de desarrollo en el que se encuentra el individuo (larva, juvenil, adulto) y decidir en función a eso, la parte del cuerpo que se seleccionará para el corte y el proceso de elaboración del taco histológico y la tinción que se utilizará.

### 2.c.i. Región del cuerpo a seleccionar para los cortes histológicos

- En **larvas** se deben realizar cortes histológicos de una sección de la región bucal (disco oral) que incluya la zona queratinizada de los dentículos y el pico córneo. Pueden ser cortes transversales o longitudinales (**Figura 4.10.3**)<sup>51</sup>.

- En **juveniles y adultos** se deben seleccionar parches de piel de los muslos y zona inguinal o dedos como muestra. Esto es debido a que el hongo no está distribuido uniformemente en la superficie del cuerpo, sino que se encuentra con más frecuencia en el estrato córneo presente en los dedos y la porción ventral del cuerpo (particularmente en los muslos y la zona inguinal), siendo menos frecuente en la zona dorsal<sup>(15,16,52)</sup>. En infecciones severas, los esporangios también pueden detectarse en la superficie dorsal. En infecciones leves, los dedos son el sitio con mayor probabilidad de infección (**Figura 4.10.3**).

#### 2.c.ii. Preparación de los tacos y montaje de las muestras

Para las técnicas histológicas el tejido debe ser conservado en etanol 70% para ser procesado siguiendo el protocolo histológico clásico para Hematoxilina y Eosina (H&E). Para ello, las muestras deben ser fijadas (si es una falange e incluye el hueso, además debe ser descalcificada), deshidratadas en graduaciones crecientes de alcohol e incluidas en parafina. Posteriormente, se debe confeccionar el taco histológico y se debe cortar en secciones de 5 a 7  $\mu\text{m}$  con un micrótopo. Los cortes deben ser montados sobre los portaobjetos, rehidratados, teñidos con H&E y deshidratados nuevamente para su montaje definitivo usando medios de montaje sintéticos, y su posterior observación en el microscopio óptico<sup>(53)</sup>.

#### 2.c.iii. Observación en microscopio

Empleando un microscopio óptico y siguiendo el procedimiento propuesto por Berger y col.<sup>(18)</sup> y Pessier y col.<sup>(16)</sup> se debe buscar evidencia de *Bd* en el material histológico a través de la observación y detección de esporangios y esporas en sus distintos grados de desarrollo, infectando el epitelio córneo y granuloso de la piel del anfibio (ver descripción de *Bd* en punto 2.a.ii de esta Sección y la **Figura 4.10.3**).

#### 2.d. Métodos de determinación basados en anticuerpos

La inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales contra *Bd* puede ser utilizada para mejorar la sensibilidad de la histología, sobre todo en las infecciones subclínicas<sup>(54)</sup>. Sin embargo, los anticuerpos que se utilizan reaccionan de manera cruzada con varios hongos, por lo que hay que prestar especial atención a estas técnicas<sup>(55)</sup> y usarlas combinadas con microscopía óptica y electrónica como complementos. En este sentido, además, este mé-

todo no se encuentra ampliamente disponible y ya no es tan utilizado dada la alta disponibilidad de los diagnósticos PCR<sup>(42)</sup>.

Como una breve referencia a la técnica para la determinación de *Bd* se deben incubar cortes con anticuerpo secundario conjugado a inmunoperoxidasa (IPX), lo cual dará lugar a una tinción roja-marrón de agrupaciones de *Bd* entre las células epiteliales (teñidas mediante tinción de contraste con hematoxilina de Lillie-Mayer<sup>5)</sup> (ver detalles en el manual de OIE<sup>17)</sup>). Si no se está seguro de tener la parte superficial de la piel -que es donde se encuentra *Bd*- la combinación de la inmunotinción de *Bd* con la tinción de queratina tricrómica de Hollande ayuda a determinar si un resultado negativo puede deberse a la pérdida de la capa de queratina<sup>(56)</sup>. El método de la tinción combinada da lugar a un color azul/púrpura en el caso de *Bd*, naranja en la queratina y pre-queratina, y verde en el colágeno y otros tejidos conjuntivos sub-epidérmicos (ver detalles en manual de OIE<sup>17)</sup>).

## 2.e. Análisis moleculares

### 2.e.i. Protocolo para muestras provenientes de hisopados

Para el análisis molecular, primeramente se procede a realizar la extracción de ADN de los hisopos que hasta el momento se encuentran refrigerados. El hisopado puede provenir de individuos vivos o de individuos de colecciones herpetológicas.

En **hisopados provenientes de individuos vivos**, la extracción de ADN puede realizarse fácilmente mediante la utilización del kit comercial Qiagen® (DNeasy Blood & Tissue). Una vez obtenidas las muestras de ADN, se realizan 6 diluciones seriadas 1/10 a partir de la muestra (control positivo) para la construcción de una curva que permita la evaluación de la qPCR y determinación de concentración de muestras incógnitas. Es importante destacar que el número de puntos de las diluciones es relativo a los márgenes de búsqueda de carga de *Bd* que pueden tenerse ya estimados.

Los protocolos a seguir para el análisis de ADN mediante técnica de qPCR, dependen exclusivamente del laboratorio al que se envía la muestra, o del equipo del que se dispone para el análisis según las técnicas estándares de Boyle y col.<sup>(27)</sup> y Garland y col.<sup>(57)</sup>. A continuación se brinda un protocolo como ejemplo: como primer actividad, se resuspenden y diluyen todos los reactivos según el protocolo de referencia. Se realizan los cálculos de reactivos para preparar una mix para la cantidad de tubos a analizar, de manera de evaluar 5 puntos de la curva standard por triplicado, controles negativos por triplicado y las muestras problema.

Previo a la preparación de la mix, las mesadas y material de trabajo se limpian con NaClO al 5%. Se descongelan las alícuotas de los reactivos utilizados, y se toma el recaudo de proteger la sonda de la luz mediante la utilización de un envoltorio de papel aluminio.

Se colocan 20 µl de mix en cada pocillo de la placa, luego se añade 5 µl de la muestra correspondiente (punto de la curva estándar, muestra problema o control según corresponda), mientras que en los pocillos negativos se coloca 5 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente, se realiza un termociclado de 95 °C durante 20 segundos, luego 50 ciclos de 90 °C durante 1 segundo seguido de 60 °C durante 20 segundos en termociclador StepOnePlus® (Applied Biosystems).

En **hisopados provenientes de individuos de colecciones herpetológicas** fijados en formol y conservados en alcohol, la técnica para extracción de ADN y amplificación puede sufrir algunas variaciones. Es una técnica que se está poniendo a punto. Actualmente se están utilizando dos kits de extracción diseñados específicamente para muestras fijadas con formol: el sistema DNA IQ de Promega® (Madison, WI, EE. UU.: DNA IQ) y DNA FFPE de Machery-Nagel® (Bethlehem, PA, EE.UU.: MN). Estos dos kits se seleccionaron inicialmente para realizar pruebas basándose en comparaciones de costos, facilidad de uso y recursos disponibles de algunos laboratorios. La técnica de DNA IQ aprovecha la carga eléctrica del ADN al capturar y separar ADN en un soporte magnético de 2 o 12 posiciones (un soporte magnético para tubos). La técnica de MN utiliza columnas giratorias de membrana de sílice para aislar y purificar el ADN. El rendimiento de la muestra de MN está limitado por la capacidad y el número de microcentrífugas disponibles para el investigador.

Luego, el ADN extraído se analiza mediante qPCR según las técnicas estándares de Boyle y col.<sup>(27)</sup> y Garland y col.<sup>(57)</sup> con algunas optimizaciones menores (para mayores detalles ver Richards-Hrdlicka<sup>58</sup> y Adams y col.<sup>59</sup>).

En este sentido, es importante destacar que según los estudios realizados hasta ahora, es poco frecuente que las muestras conservadas en un mismo recipiente se contaminen entre sí. Complementariamente, los métodos de extracción de ADN y determinación de presencia de *Bd* en ejemplares de colecciones herpetológicas, pueden proporcionar una dimensión temporal que ayudaría a generar predicciones más poderosas sobre cómo el *Bd* puede afectar a una especie o población hospedadora en las diferentes regiones del planeta.

*2.e.ii. Protocolo para análisis a partir de agua filtrada*

Para obtener muestras de ADN de *Bd* en agua, los individuos colectados en el campo se deben colocar en recipientes individuales de polipropileno con 150ml de agua estéril (o proporcional, dependiendo del tamaño del animal, de manera de asegurarse de que el 90% del cuerpo del ejemplar quede sumergido para recoger las zoosporas liberadas)<sup>43</sup>. Luego de 24 hs, tiempo máximo que se ha observado que las zoosporas permanecen activas<sup>(13)</sup>, se recogen 50 ml de agua de cada recipiente (agitando previamente el agua para evitar el asentamiento de las zoosporas). El agua recogida se filtra repetidamente utilizando una jeringa de 5 ml (Misosa®, Ansan, Corea del Sur) y un filtro de jeringa de 0,2 µm, con filtro de botella estériles<sup>(40)</sup> o un papel de filtro de 0,45 µm<sup>2</sup> <sup>(17)</sup>. Sobre la muestra de filtrado, el ADN de *Bd* se amplifica mediante la técnica de PCR anidada<sup>(40)</sup>.

*2.e.iii. Protocolo para análisis a partir de agua y sedimento para ADN ambiental*

Los filtros se procesan y analizan con los métodos utilizados para hisopos (ver detalles en la presente Sección, punto 2.c.i). Las muestras de sedimento deben ser secadas (preferentemente mediante liofilización por 48 hs). Luego, la materia orgánica seca debe ser homogeneizada y separada en alícuotas de 0,25 gr y esas muestras conservadas en frío a -20 °C hasta la extracción del ADN.

Una particularidad de estas extracciones es que las muestras de ADN ambiental no se diluyen previo al análisis de qPCR. Y para los resultados, las cantidades se expresan en totales (copias de ADN cada 100 ml agua o cada 0,25 g de sedimento, por ejemplo). Los resultados son luego transformados a Log<sub>10</sub> para poder comparar las diferentes muestras<sup>(38)</sup>.

*2.e.iv. Protocolo para análisis a partir de dedos*

Para la extracción de ADN de *Bd* a partir de muestras de dedos, se utiliza el dedo entero (en caso de individuos pequeños) o el dedo fraccionado (en caso de dedos grandes). Si es necesario fraccionar, mediante el uso de un bisturí estéril se sacan tiras de piel del dedo, colocando 1 mg de piel en el tubo y se añade a razón de un 10% (p/v) del volumen de PrepMan Ultra como máximo, para evitar una sobrecarga del sistema de homogeneización; se aumenta el volumen de PrepMan Ultra si es necesario. Se coloca la muestra directamente en el tubo con perlas de zirconio y PrepMan Ultra como se ha descrito para los hisopos<sup>(17)</sup> para homogeneizar la muestra, y se procede luego con el mismo protocolo que para los hisopos.



## Recomendaciones y Sugerencias

Para todos los estudios vinculados a detección de un agente etiológico causante de una enfermedad, las recomendaciones más importantes tienen que ver con la limpieza de los materiales y espacios de trabajo, relacionado al hecho de evitar contaminación de las muestras. Además, en la búsqueda de este agente en muestreos a campo, las recomendaciones están orientadas hacia la manipulación adecuada de los individuos, la toma de muestra de manera correcta y los protocolos más adecuados para que la misma llegue a su lugar de conservación sin estropearse. A continuación se puntúan una serie de recomendaciones orientadas a colaborar con la tarea de los investigadores que pretenden estudiar *Bd* en anfibios.

Limpiar los materiales de colecta y de manipulación de los individuos entre cada ejemplar (ver **Caja de Texto 4.10.1** para soluciones desinfectantes).

Si se utiliza una red para la captura, se debe tener el recaudo que el quitridio puede adherirse a la red, por lo tanto desinfecte la red entre cada colecta.

Existen preocupaciones acerca de la toxicidad potencial de los guantes de látex para los renacuajos debido a que ciertas sustancias que poseen actúan

### Caja 4.10.1 - Protocolos de desinfección de materiales de campo y laboratorio<sup>(17,34,61)</sup>

<i>Propósito</i>	<i>Desinfectante</i>	<i>Concentración</i>	<i>Tiempo</i>
<i>Desinfección equipo tipo quirúrgico (pinzas, tijeras, etc.) e instrumental de laboratorio (básculas, calibradores)</i>	<i>Cloruro de Benzalconio</i>	<i>2 mg ml<sup>-1</sup></i>	<i>1 min.</i>
	<i>Etanol</i>	<i>70%</i>	<i>1 min.</i>
<i>Desinfección equipo de colecta y recipientes de colecta</i>	<i>Hipoclorito de sodio (Lavandina doméstica)</i>	<i>4%</i>	<i>15 min.</i>
	<i>Secar completamente</i>		<i>&gt; 3 hs.</i>
	<i>Calor</i>	<i>60 °C</i>	<i>30 min.</i>
	<i>Calor</i>	<i>37 °C</i>	<i>8 hs.</i>
	<i>Permanganato de potasio</i>	<i>1%</i>	<i>10 min.</i>
	<i>Esterilización con RUV</i>	<i>1 min.</i>	
<i>Desinfección de botas/wader</i>	<i>Hipoclorito de sodio (Lavandina doméstica)</i>	<i>4%</i>	<i>15 min.</i>
	<i>Secar completamente</i>		<i>&gt; 3 hs.</i>
<i>Desinfección de prendas o telas usadas en el campo</i>	<i>Agua caliente</i>	<i>&gt; 60 °C</i>	<i>30 min.</i>

como alérgicos. Es recomendable utilizar guantes de nitrilo para la manipulación. Mayor detalle de las pautas para minimizar estos riesgos se encuentran disponibles en el trabajo de Greer y col.<sup>(60)</sup>.

No mantener al sol las muestras para análisis moleculares, conservarlas a la sombra y en lo posible en un lugar fresco hasta su traslado al laboratorio.

Los hisopos pueden mantenerse secos a temperatura ambiente (de hasta 23 °C) hasta su refrigeración.

Cuando se trasladen las muestras en vehículo corroborar que no queden en un lugar que se caliente demasiado.

En el caso de muestrear en condiciones demasiado húmedas, se puede colocar el hisopo en etanol al 95% (para evitar proliferación de otros hongos), pero de ser este el caso se recomienda previamente contactarse con el laboratorio que analizará las muestras de ADN ya que en caso de enviarlas de ésta manera se debe contar con un speed vacuum para su procesamiento. En caso de no contar con el mismo, no se recomienda el envío en etanol ya que se podría perder parte de *Bd* en caso de estar presente en el hisopado.

La agrupación o prueba por lotes de hisopos cutáneos de múltiples animales puede realizarse, y se recomienda juntar un máximo de cinco muestras (aunque las débilmente positivas pueden obviarse). Sólo se recomienda juntar los hisopos en los estudios de población cuyo objetivo sea obtener datos de presencia/ausencia en la población o sitio de muestreo<sup>(43)</sup>.

#### **Caja 4.10.2 - Pertinencia de los métodos descritos en esta sección para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de *Bd***

La clasificación está basada en el éxito de los protocolos en las investigaciones a lo largo del tiempo y en diversas regiones del mundo en relación a sensibilidad, especificidad, disponibilidad y costo (para mayores detalles véase el Manual Acuático de OIE<sup>17</sup>). AR: Altamente Recomendado; R: Recomendado; RS: Recomendado en algunas situaciones; NR: No recomendado.

<i>Técnica</i>	<i>Vigilancia Dirigida</i>			<i>Diagnóstico Confirmatorio</i>
	<i>Larva</i>	<i>Juvenil</i>	<i>Adulto</i>	
<i>Diagnóstico directo</i>	RS	RS	RS	NR
<i>Preparación húmeda (frotis, raspado o muda)</i>	R	R	R	R
<i>Técnicas histológicas</i>	R	R	R	RS
<i>Métodos de determinación basados en anticuerpos</i>	RS	RS	RS	R
<i>Análisis moleculares</i>	AR	AR	AR	AR

Los métodos preferidos para el almacenamiento de muestras dependerán del tipo de prueba que se realizará. Por ejemplo, el método qPCR Taqman® funciona mejor con muestras de hisopos secados al aire, pero algunos laboratorios que realizan métodos PCR convencionales prefieren hisopos conservados en etanol. Lo mismo sucede con los hisopos, en relación a las opciones de punta (algodón, polietileno, polipropileno) o mango (plástico, madera). Siempre se debe consultar previamente al laboratorio que realizará los análisis como almacenar muestras después de la recolección.

## Bibliografía

1. Bosch, J. 2003. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. Munibe. Donostia- San Sebastián. N° 16.
2. Lips, K.R.; Diffendorfer, J.; Mendelson, J.R. & Sears, M.W. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology* 6: e72.
3. Pedersen, A.B.; Jones, K.E.; Nunn, C.L. & Altizer, S. 2007. Infectious diseases and extinction risk in wild mammals. *Conservation Biology* 21: 1269-1279.
4. Lavilla, E.O. 2008. Declinaciones Poblacionales y Extinciones en Anfibios de Argentina. Anticipo de Anales de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires. Argentina.
5. Beldomenico, P.M. & Begon, M. 2009. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 21-27.
6. Smith, K.G.; Acevedo-Whitehouse, K. & Pedersen, A.B. 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation* 12: 1-12.
7. Vredenburg, V. T.; Knapp, R.A.; Tunstall, T. & Briggs, C.J. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9689-9694.
8. Ghirardi, R.; Levy, M.G.; López, J.A.; Steciow, M.M. & Perotti, M.G. 2014. *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting anurans in a protected area from Santa Fe province, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 28: 29-31.
9. Ghirardi, R.; Levy, M.G.; López, J.A.; Corbalán, V.; Steciow M.M. & Perotti M.G. 2014. Endangered amphibians infected with the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in austral temperate wetlands from Argentina. *Herpetological Journal* 24: 129-133.
10. Solís, R.; Penna, M.; De la Riva, I.; Fisher, M.C. & Bosch, J. 2015. Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in anurans from the Andes highlands of northern Chile. *Herpetological Journal* 24: 55-59.
11. Whitfield, S.M.; Lips, K.R. & Donnelly, M.R. 2016. Amphibian decline and conservation in Central America. *Copeia* 2016: 351-379.
12. Scheele, B.C.; Foster, C.N.; Hunter, D.A.; Lindenmayer, D.B. & Hear, G.W. 2019. Living with the enemy: Facilitating amphibian coexistence with disease. *Biological Conservation* 236: 52-59.
13. Longcore, J.C.; Pessier, A.P. & Nichols, D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219-227.
14. Letcher, P.M.; Powell, M.J.; Churchill, P.F. & Chambers, J.G. 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycological Research* 110: 898-915.
15. Berger, L.; Speare, R.; Daszak, P.; Green, D.E.; Cunningham, A.A.; Goggin, C.L.; Slocombe, R.; Ragan, M.A.; Hyatt, A.D.; McDonald, K.R.; Hines, H.B.; Lips, K.R.; Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9031-9036.
16. Pessier, A.P.; Nichols, D.K.; Longcore, J.E. & Fuller, M.S. 1999. Cutaneous chytridiomycosis

- in poison dart frogs (*Dendrobates spp.*) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 194-199.
17. OIE. 2012. Manual Acuático. Capítulo 2.1.1. [www.oie.int](http://www.oie.int). Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2011.
  18. Berger, L.; Speare, R. & Kent, A. 1999. Diagnosis of Chytridiomycosis in Amphibians by Histologic Examination. Disponible en: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>.
  19. Green, D.E & Sherman, C.K. 2001. Diagnostic histological findings in Yosemite toads (*Bufo canorus*) from a die-off in the 1970s. *Journal of Herpetology* 35: 92-103.
  20. Weldon, C. & Du Preez, L.H. 2006. Quantitative measurement of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian skin. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 153-161.
  21. Berger, L.; Hyatt, A.D.; Speare, R. & Longcore, J.E. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 51-63.
  22. Berger, L.; Marantelli, G.; Skerratt, L.F. & Speare, R. 2005. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 47-50.
  23. Berger, L.; Speare, R. & Hyatt, A. 1999. Chytrid Fungi and Amphibian Declines: Overview, Implications and Future Directions. En: Campbell, A. (ed.). *Declines and Disappearances of Australian Frogs*. Biodiversity Group Environment Australia, Canberra.
  24. Nichols, D.K.; Pessier, A.P. & Longcore, J.E. 1998. Cutaneous chytridiomycosis: an emerging disease? *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians* 1998: 269-271.
  25. Carey, C.; Cohen, N. & Rollins-Smith, L. 1999. Amphibian declines: An immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 459-472.
  26. Burrowes, P.A.; Joglar, R.L. & Green, D.E. 2004. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica* 60: 141-154.
  27. Boyle, D.G.; Boyle, D.B.; Olsen, V.; Morgan, J.A.T. & Hyatt, A.D. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60:141-148.
  28. Weldon, C.; Du Preez, L.H.; Hyatt, A.D.; Muller, R. & Speare, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10: 2100-2105.
  29. Lips, K.R.; Green, D.E. & Papendick, R. 2003. Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37: 215-218.
  30. Annis, S.L.; Dastor, F.P.; Ziel, D.; Daszak, P. & Longcore, J.E. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40: 420-428.
  31. Livo, L.J. 2004. Methods for Obtaining *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) Samples for PCR Testing. Department of Integrative Physiology, University of Colorado.
  32. Kriger, K.M.; Hero, J.M. & Ashton, K.J. 2006. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 71: 149-154.
  33. Kriger, K.M.; Hines, H.B.; Hyatt, A.D.; Boyle, D. & Hero, J.M. 2006. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 71: 141-148.
  34. Retallick, R.W.R.; Miera, V.; Richards, K.L.; Field, K.J. & Collins, J.P. 2006. A non-lethal technique for detecting the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 77-85.
  35. Brem, F.M. & Lips, K.R. 2008. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic. *Diseases of Aquatic Organisms* 81: 189-202.
  36. Kirshtein, J.D.; Anderson, C.E.; Woods, J.S.; Longcore, J.E. & Voytek, A. 2007. Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* from sediments and water. *Diseases of Aquatic Organisms* 77: 11-15.
  37. Barnes, M.A.; Brown, A.D.; Daum, M.N.; de la Garza, K.A.; Driskill, J.; Garrett, K.; Godstein, M.S.; Luk, A.; Maguire, J.I.; Moke, R.; Ostermaier, E.M.; Sanders, Y.M.; Sandhu, T.; Stith, A. & Suresh, V.V. 2020. Detection of the Amphibian pathogens chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in West Texas, USA, using environmental DNA. *Journal of Wildlife Diseases* 56: 702-706.

38. Branelly, L.A.; Wetzel, D.P.; Ohmer, M.E.B.; Zimmerman, L.; Saenz, V. & Richards-Zawacki, C.L. 2020. Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia* 194: 267-281.
39. Soto-Azat, C.; Clarke, B.T.; Poynton, J.C. & Cunningham, A.A. 2009. Widespread historical presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in African pipid frogs. *Diversity and Distributions* 2009: 1-6.
40. Shin, J.; Bataille, A.; Kosch, T.A. & Waldman, B. 2014. Swabbing often fails to detect amphibian chytridiomycosis under conditions of low infection load. *PLoS ONE* 9: e111091.
41. Berger, L.; Longcore, J.E.; Speare, R.; Hyatt, A. & Skerratt, L.F. 2009. Fungal Diseases in Amphibians. *En: Heatwole, H. & Wilkinson, J.W. (eds.). Amphibian Biology, Amphibian Decline: Disease, Parasites, Maladies, and Pollution.* Surrey Beatty & Sons, NSW, Australia.
42. Pessier, A.P. & Mendelson, J.R. (eds.) 2017. A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs. Ver. 2.0. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group: Apple Valley, MN.
43. Hyatt, A.D.; Boyle, D.G.; Olsen, V.; Boyle, D.B.; Berger, L.; Obendorf, D.; Dalton, A.; Kriger, K.M.; Hero, M.; Hines, H.; Phillott, A.D.; Campbell, R.; Marantelli, G.; Gleason, F.H. & Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 175-192.
44. Miaud, C.; Arnal, V.; Poulain, M.; Valentini, A. & Dejean, T. 2019. eDNA increases the detectability of ranavirus infection in an alpine amphibian population. *Viruses* 11: 526.
45. Spitzen-van der Sluijs, A.; Stark, T.; Dejean, T.; Verbrugghe, E.; Herder, J.; Gilbert, M.; Janse, J.; Martel, A.; Pasmans, F.; Valentini, A. 2020. Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. *Environmental DNA* 2: 565-571.
46. Branelli, L.A.; Wetzel, D.P.; Ohmer, M.E.B.; Zimmerman, L.; Saenz, V. & Richards-Zawacki, C.L. 2020. Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia* 194: 267-281.
47. Mazzoni, R.; Cunningham, A.A.; Daszak, P.; Apolo, A.; Perdomo, E. & Speranza, G. 2003. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases* 9: 995-998.
48. Briggs, C. & Burgin, S. 2004. Congo Red, an effective stain for revealing the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in epidermal skin scrapings from frogs. *Mycologist* 18: 98-103.
49. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
50. Knapp, R.A. & Morgan, J.A.T. 2006. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia* 2006: 188-197.
51. Fellers, G.M.; Green, D.E. & Longcore, J. 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 2001: 945-953.
52. Arellano, M.L. 2012. Susceptibilidad y sensibilidad de algunas especies de anuros a la infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
53. Humason, G.L.; Presnell, J.K. & Schreibman, M.P. (eds.). 1997. Humason's Animal Tissue Techniques (fifth ed.), The John Hopkins University Press, Baltimore.
54. Van Ells, T.; Stanton, J.; Strieby, A.; Daszak, P.; Hyatt, A.D. & Brown, C. 2003. Use of immunohistochemistry to diagnose chytridiomycosis in dyeing poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). *Journal of Wildlife Diseases* 39: 742-745.
55. Berger, L.; Hyatt, A.D.; Speare, R. & Longcore, J.E. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 51-63.
56. Olsen, V.; Hyatt, A.D.; Boyle, D.G. ; Mendez, D. 2004. Co-localisation of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs. *Diseases of Aquatic Organisms* 61: 85-88.
57. Garland, S.; Baker, A.; Phillott, A.D.; Skerratt, L.F. 2010. BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 113-116.
58. Richards-Hrdlicka, K.L. 2012. Extracting the amphibian chytrid fungus from formalin-fixed specimens. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 842-849.

59. Adams, A.J.; La Bonte, J.P.; Ball, M.L.; Richards-Hrdlicka, K.L.; Toothman, M.H. & Briggs, C.J. 2015. DNA extraction method affects the detection of a fungal pathogen in formalin-fixed specimens using qPCR. *PLoS ONE* 10: e0135389.
60. Greer, A.I.; Schock, D.M.; Brunner J.M.; Johnson, R.; Picco, A.M.; Cashins, S.D.; Alford, R.; Skerratt, L.F. & Collins, J.P. 2009. Guidelines for the safe use of disposable gloves with amphibian larvae in light of pathogens and possible toxic effects. *Herpetological Review* 40: 145-147.
61. Perotti, M.G. & Ghirardi, R. 2010. Disposición 000774 de PN sobre "Como desinfectar el material de campo cuando se trabaja en humedales". Ministerio de Turismo, Administración de Parques Nacionales.

## 4.11 TÉCNICAS PARA EL RELEVAMIENTO DE ANFIBIOS EN AMBIENTES CONTAMINADOS

**Rafael C. Lajmanovich<sup>1,2</sup>, Ana P. Cuzziol Boccioni<sup>1,2</sup>, Lucila M. Curi<sup>2,3</sup>,  
Andrés M. Attademo<sup>1,2</sup>, Candela Martinuzzi<sup>1,2</sup>, Agustín Bassó<sup>1</sup>, Carlina  
Colussi<sup>1</sup> & Paola M. Peltzer<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (ESS-FBCB-CONICET), Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina. <http://anfibios-ecotox-conser.blogspot.com/>

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425F-QB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste (FCV, UNNE), Sargento Cabral 2139, (CP: 3400) Corrientes, Argentina.

## Técnicas para el registro de anfibios en ambientes contaminados

El monitoreo de anfibios tiene como objetivo evaluar la presencia, riqueza, abundancia y distribución de poblaciones, ensambles, comunidades y gremios de especies de anfibios y estimar la dinámica de variabilidad de las mismas en un período temporo-espacial determinado<sup>(1)</sup>. Para eso, el investigador a cargo del monitoreo puede valerse de diversos métodos y herramientas como los registros visuales directos, fotográficos, filmaciones, grabaciones, entre otros<sup>(2,3)</sup>.

A continuación, se resumen una serie de consideraciones a tener en cuenta en los diversos métodos para el muestreo de anuros de áreas contaminadas (en especial sectores agroindustriales).

### 4.11.1a. Previo a la salida de muestreo a campo

- Elaborar un diseño experimental/de muestreo detallado y que se adecúe a los objetivos del trabajo.
- Seleccionar los sitios de muestreo en base a las hipótesis y objetivos de su investigación. Definir cuáles serán los sitios “control/es”, con los que se contrastarán los resultados obtenidos en los sitios de interés.
- Considerar el relieve y la escorrentía (porque puede ser un sitio que, si bien no tenga aplicación directa de compuestos químicos tóxicos, esté aguas abajo de un sector agrícola, ganadero, etc.)  
Para la selección de los sitios a muestrear, se pueden utilizar fotografías aéreas e imágenes satelitales actualizadas.
- Georeferenciar los sitios de muestreo mediante el uso de sistemas de posicionamiento por satélite (GPS).  
En caso de que la investigación requiera realizar muestreos en varios sitios, se debe lograr simultaneidad en los mismos, para lo que es necesaria una adecuada planificación y organización (operativas, logísticas, y presupuestarias).
- Adecuar el muestreo no sólo a la estacionalidad reproductiva, sino también a la fenología de las especies más abundantes, y cronograma de aplicación de agroquímicos y otros contaminantes en los distintos sitios a evaluar.  
Determinar el periodo temporal de muestreo, acorde a sus objetivos (período reproductivo de las especies, temporada de aplicación de plagui-



cidas, fenología de los cultivos, vertidos de efluentes industriales, etc.)

- Recolectar muestras en forma simultánea en los sitios alterados o contaminados y en el/los sitios control/es o de referencia.
- Seleccionar el método de muestreo más adecuado acorde a las herramientas disponibles y a los ejemplares que desea recolectar (adultos o larvas).
- Confeccionar una lista detallada del material y herramientas necesarios para la salida a campo: planilla de campo, mapas, GPS, brújulas, linternas, cámaras fotográficas y filmadoras, grabadores, recipientes y bolsas adecuados para tomas de muestras ambientales (suelo, agua, vegetación, etc.) y todo el instrumental considerado necesario para el completo registro de datos.

Verificar la disponibilidad de los mismos previo a la salida al campo, podrá evitar registros incompletos (**Tabla 4.11.1**).

#### **4.10.1b. Durante la salida de muestreo a campo**

Si bien existen numerosas técnicas para el muestreo y registro de anfibios, que ya han sido explicadas en la **Sección 3 Técnicas de relevamiento de la diversidad de anuros** del presente manual, en Argentina, se destacan a continuación algunas que toman relevancia en ambientes contaminados tanto para adultos como para renacuajos.

##### **Adultos**

*Muestreo con trampas de caída*<sup>(4)</sup> (véase<sup>5-8</sup>). Esta técnica en los últimos 15 años ha sido modificada reemplazando el formaldehído para una fijación *in situ* por trampas húmedas con esponjas y agua natural. En la **Figura 4.11.1A** se ejemplifica una trampa de caída viva instalada en un cultivo de soja, y un ejemplo de la disposición de las mismas (**Figura 4.11.1B**).

Los relevamientos de Encuentros visuales y de Transectas Auditivas (véase **Sección 2 Diseño de muestreo**) son comunes de utilizar en ambientes contaminados para la búsqueda activa de anuros. En ese caso la colecta se realiza de forma manual, y de acuerdo al modo de vida de la especie radica el grado de dificultad en la colecta.

##### **Puestas de huevos y larvas**

*Relevamientos de sitios de reproducción*<sup>(9)</sup> es una metodología aplicable para el relevamiento de renacuajos y puestas de huevos de anuros (véase **Sección 3 Técnicas de relevamiento de la diversidad de anuros**). Para la búsqueda



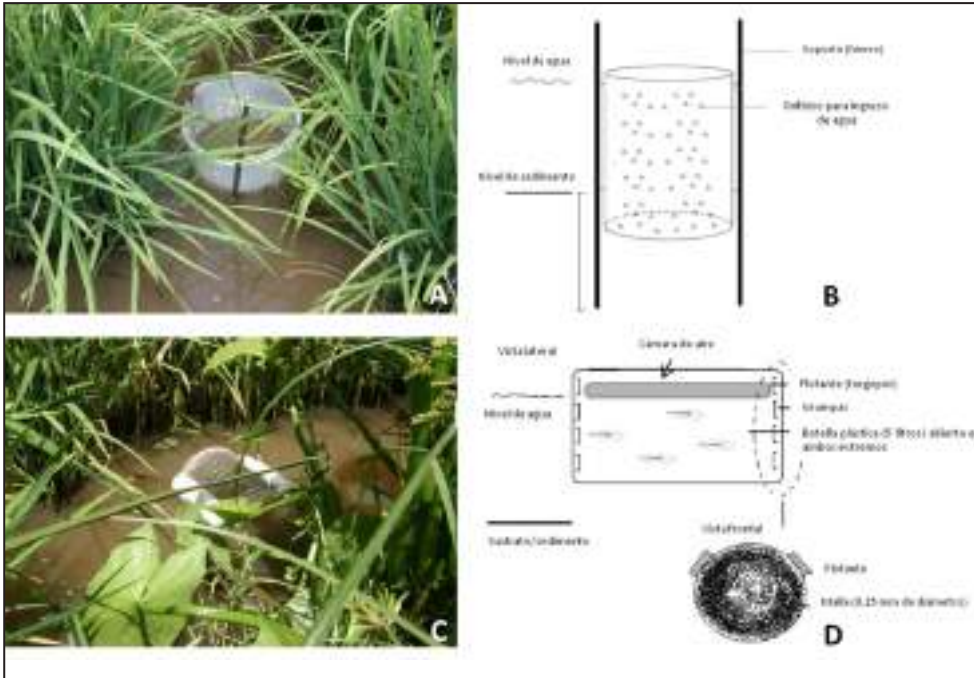
**Figura 4.11.1.** Trampas de caída viva instalada en un cultivo de soja, con una esponja húmeda en el fondo de la trampa (A); esquema de disposición de las mismas en el ambiente (B). Foto: M. A. Attademo.

de puestas de huevos, se tiene en cuenta el modo reproductivo y aquellas características ecológicas de la especie que el investigador conoce que nos facilitará la búsqueda. También se debe tener en cuenta el momento en que se realizará las prospecciones (épocas calurosas, días posteriores a grandes lluvias), lagunas inmersas en campos cultivados y arrozales (contaminación por plaguicidas y nutrientes), vena de la ruta (contaminación por hidrocarburos), lagunas con deriva de efluentes industriales o productos farmacéuticos, entre otros.

*Limnocorrales*<sup>(10)</sup> (**Figura 4.11.2**). Constituyen un tipo de mesocosmos, que se construyen e instalan en cuerpos de aguas que contenga la profundidad adecuada. Estos se utilizan para monitorear renacuajos que fueron expuestos *in situ* en ambientes contaminados luego de un tiempo de exposición determinado por el investigador (véase<sup>11-13</sup>). De acuerdo al tipo ecomorfológico de los renacuajos seleccionados como bioindicadores en el estudio, se utilizarán limnocorrales enterrados en el sedimento (especies bentónicas, **Figura 4.11.2 A-B**), o flotantes para especies nectónicas, **Figura 4.11.2C-D**).

A continuación se mencionan los principales parámetros que deben considerarse durante los muestreos:

- Recolectar muestras de agua, sedimento y registrar parámetros ambientales para una mejor posterior caracterización del ambiente (ejemplificados en la **Tabla 4.11.1**) y evaluar parámetros fisicoquímicos del agua (conductividad, turbidez, amonio, nitritos, nitratos, otros). Las muestras se recolectan en material de vidrio oscuro, y se colocan en una conservadora refrigerada hasta el traslado al laboratorio para su posterior análisis. Para facilitar la medición de estos parámetros, se recomienda la utilización de kits comerciales y medidores de campo por su sencillez en la manipulación, fiabilidad y adaptabilidad a las condiciones de campo.



**Figura 4.11.2.** Tipos de limnocorales de acuerdo al tipo eco-mofológico de los renacuajos utilizados para el monitoreo en ambientes agrícolas. Imagen (A) y esquema (B) de un limnocoral enterrado en el sustrato dentro de un cultivo de arroz; Imagen (C) y esquema (D) de un limnocoral flotante instalado en un cultivo de soja. Fotos: M. A. Attademo y esquemas tomados de Attademo et al.<sup>(13)</sup>

- Se deberá analizar los residuos, analitos activos y/o metabolitos de los contaminantes tanto en el sedimento como en el agua. Se podrá recurrir a Servicios a Terceros de HPLC (Cromatografía Líquida y Gaseosa) dedicados a la temática. Sin estos datos es imposible llegar a una conclusión o conocer el efecto concentración-respuesta biológica.
- Las muestras ambientales tomadas deben conservarse en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  y rotularse adecuadamente, según el objetivo y derivación a servicios especializados de medición.
- Realizar registros fotográficos y auditivos de las condiciones del sitio de muestreo siempre que sea posible, así como también todas aquellas observaciones que considere pertinentes durante el muestreo.

Los requerimientos y recomendaciones para la toma de muestras biológicas dependerá del tipo de estudio al que estén destinadas, pero en general se deben considerar los factores que influyen en la preservación de las mismas: refrigeración o adecuada fijación, condiciones de asepsia, influencia de anestesia. En la **Tabla 4.11.2** se mencionan algunos de los tipos de muestras que pueden colectarse en el campo y las principales consideraciones a tener en cuenta para cada una de ellas.





Provincia/Localidad			Fecha		
Coordenadas			Altitud		
Hora de inicio		Hora final		Forma de recorrido	
T° ambiente		Profundidad agua		Observador/es	
T° agua		pH:			
Humedad					
Actividad: diurna/nocturna/crepuscular		Tipo de ambiente		Amenaza/contaminación /degradación	
Turbiedad (disco de Sechi)		Descripción del ambiente: %arbóreo () %arbustivo () % herbáceo ()		Ecorregión	
Ejemplares					
N°	Género/ especie	Estado/ estadio (A, J, R, M)	Tipo de muestreo	Captura/ fotografía N°	Observación general
1					
2					

**Tabla 4.11.1.** Ejemplo de planilla para el registro de datos a campo en lugares degradados y contaminados.


## Biomarcadores en estudios ecotoxicológicos con anfibios

Los biomarcadores pueden definirse como las diversas respuestas biológicas o cambios mensurables a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico o histológico de los sistemas biológicos en respuesta a xenobióticos o a un estresor ambiental<sup>(14)</sup>. De esta manera, se busca relacionar el estado de salud de un individuo expuesto a un tóxico con la intensidad de los cambios registrados en el biomarcador, considerando el desmejoramiento en su condición fisiológica en función de la concentración del contaminante. Las respuestas de los organismos que se obtienen a través del análisis de biomarcadores también pueden interpretarse como señales de alerta confiables del grado de deterioro de un ambiente determinado<sup>(15)</sup>. En general, se busca que un parámetro presente la suficiente sensibilidad, especificidad y precocidad en su respuesta para su empleo como biomarcador<sup>(16)</sup>. Pero como no siempre son específicos<sup>(14)</sup>, la utilización de distintos tipos de marcadores permite un análisis más exhaustivo, preciso e integrado sobre la acción de los contaminantes.

Existe una gran diversidad de tipos de biomarcadores y criterios para clasificarlos.

Tipo de Muestra	Obtención	Consideraciones
<p><b>Sanguínea</b></p> 	<p>Se puede obtener del plexo venoso lingual, vena abdominal ventral o caudal, o por punción cardíaca en individuos de 2 a 10 g.</p> <p>Para renacuajos, la obtención de sangre requiere el sacrificio de los mismos. La muestra se obtiene desde la región branquial o cardíaca.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El volumen de extracción dependerá del tamaño del espécimen. Téngase en cuenta que el total de sangre equivale aproximadamente al 10% de la masa corporal del organismo, y el máximo extraíble es de hasta el 50% del volumen total.</li> <li>• Utilizar jeringas heparinizadas.</li> <li>• Inmediatamente posterior a la extracción y homogeneizado, realizar frotis y colocar la muestra en capilar sanguíneo (refrigerar).</li> <li>• Para el estudio de parámetros bioquímicos, decantar la muestra hasta la formación del coágulo y centrifugar para obtener suero. Mantener en refrigeración.</li> </ul>
<p><b>Orina</b></p> 	<p>A partir de masajes en la región cloacal.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recipiente colector limpio.</li> <li>• Análisis dentro de las 24 hs. En caso de no ser posible, congelar la mitad de la muestra y al resto adicionarle una gota de formalina al 10%.</li> </ul>
<p><b>Biopsia</b></p> 	<p>Previa anestesia, obtener muestra de parte sana y afectada del tejido (en caso de que sea posible), y suturar la herida.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizar el fijador más conveniente acorde al tejido. Considerar proporciones muestra-fijador y tiempo de fijación. En general, se emplea formalina al 10% (a razón de 10 ml por 1 cm de muestra), durante 24 hs.</li> </ul>
<p><b>Necropsia</b></p> 	<p>Se obtienen muestras hasta 12 hs posteriores a la muerte del espécimen (convenientemente, refrigerado).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijación inmediata de tejidos y órganos no afectados por la necrosis.</li> </ul>

**Tabla 4.11.2.** Principales tipos de muestras de material biológico que pueden obtenerse para estudios ecotoxicológicos, con breve mención su obtención y aspectos a tener en cuenta durante la colecta como a posterior. Fuente: Lajmanovich, R.C. & Chávez Soriano, L.A. (Presentación: *Técnicas diagnósticas para anfibios*).

<p><b>Bacteriológica o micológica</b></p> 	<p>Se hisopa la región de interés o se extrae líquido o porción de tejido en condiciones lo más estériles posibles. Dependiendo del análisis o las especies microbiológicas de interés, se requieren medios comerciales específicos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No utilizar fijadores.</li> <li>• Transportar en bolsas de polietileno o frascos estériles.</li> <li>• Transportar con refrigeración.</li> </ul>
---	--	---

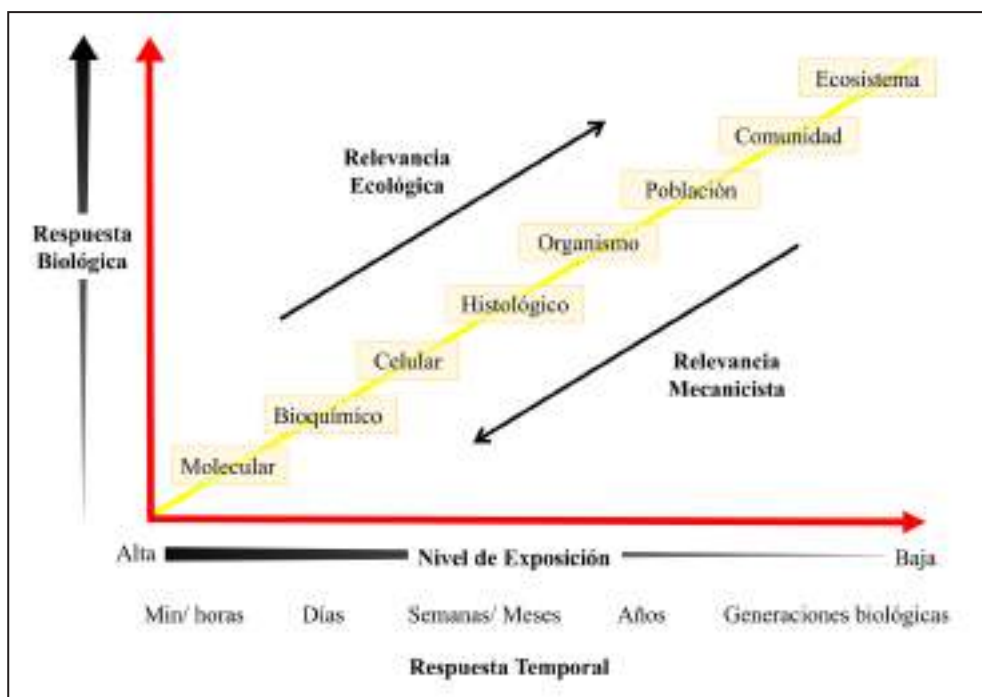
Según si es requerido o no el sacrificio del organismo para la determinación, se distinguen los biomarcadores *destruktivos* y *no destruktivos*, respectivamente.

Según el nivel de organización biológica al que corresponde el parámetro de estudio, se definen biomarcadores *moleculares*, *citogenéticos*, *bioquímicos*, *fisiológicos*, *histológicos*, *morfológicos*, *etológicos*, entre otros<sup>(17-19)</sup>. Al considerar que las respuestas biológicas tienen lugar a raíz de la interacción del agente estresor con biomoléculas en un dado sitio o célula blanco del organismo<sup>(17,20)</sup>, la evaluación de los efectos tóxicos desde la escala molecular hasta niveles de organización superiores que representen la totalidad del organismo, permite una mejor comprensión e inferencia sobre la toxicidad del agente y su mecanismo de acción<sup>(10,21,22,23)</sup> (**Figura 4.11.3**), incluyendo variaciones ontogénicas para el caso de larvas.

Según el tipo de información que brindan, pueden diferenciarse:

*Biomarcadores de exposición*: pueden tratarse de compuestos exógenos (o metabolitos) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente). En el caso de tóxicos acumulativos, la *dosis interna* puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales. Bernard y Lauwerys<sup>(24)</sup> dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores *selectivos* se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (ej.: plomo en sangre) y los *no selectivos* constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (ej. tioésteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas; metalotioneínas en hígado, páncreas y riñón como biomarcadores de exposición a metales; véase **Figura 4.11.4**).

*Biomarcadores de respuesta (o efecto tóxico)*: son indicativos de cambios bioquímicos en un organismo que producen un daño de salud o potencial como

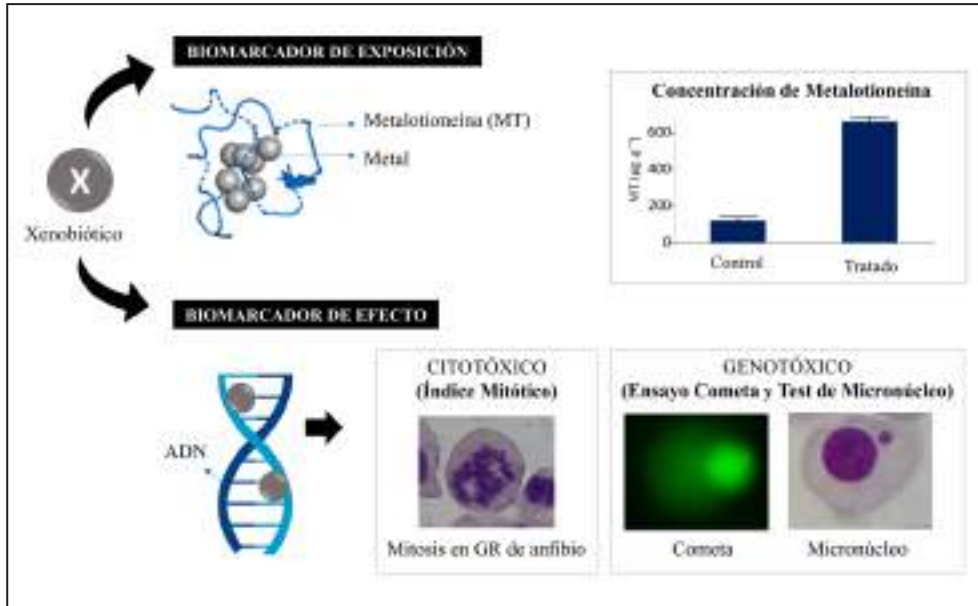


**Figura 4.11.3.** Paradigma de las mediciones en ecotoxicología y su relevancia ecológica Modificado de Chapman<sup>(23)</sup>

resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas (acetilcolinesterasa), aparición de aductos del ADN (**Figura 4.11.4**), incrementos localizados de ARNm, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico.

*Biomarcadores de susceptibilidad:* refieren a la sensibilidad organismo-específica y la capacidad individual de responder al agente.

La mayoría de los estudios ecotoxicológicos se realizan únicamente en la etapa larval de los anfibios, por los siguientes motivos: (1) su desarrollo en ambientes acuáticos, y el hecho de que los contaminantes ingresan a los sistemas por el agua, (2) la disponibilidad de un mayor número de individuos en comparación a las etapas adultas (requerido para la estimación de la significancia estadística de los efectos que se analizan)<sup>(25)</sup>, y (3) la mayor facilidad con la que estos organismos pueden mantenerse en condiciones experimentales. A los efectos de medir las respuestas de parámetros biológicos específicos frente a una única variable (contaminante), las condiciones controladas y restrictivas de los ensayos permiten además atribuir inequívocamente las variaciones en las respuestas de los organismos al factor que se modifica entre los tratamientos.



**Figura 4.11.4.** Ejemplos de biomarcadores de exposición y efecto. Niveles de metalotioneínas adaptados de Falfushynska et al.<sup>(27)</sup>; cometa: Curi et al.<sup>(28)</sup>; eritrocitos (GR): C.L. Colussi.

Por lo tanto, se sabe mucho menos sobre los impactos de los contaminantes en los anfibios adultos y en condiciones naturales<sup>(26)</sup>, donde el contaminante en estudio se integra a una innumerable cantidad de factores que integran el ecosistema con los que posiblemente pueda interactuar. Si bien los impactos conocidos en la etapa larval son fundamentales para alertar sobre los efectos y alentar a una mayor regulación al respecto<sup>(25)</sup>, no debe descuidarse la complejidad de los ambientes naturales que los organismos habitan, y magnitud en la que los efectos puedan agravarse al considerar la combinación de contaminantes a los que están sometidos.

Como para la mayoría de los biomarcadores no existen valores basales para la fauna silvestre, para su valoración es necesario la evaluación de controles (ejemplares de las mismas especies que no estén sometidos a los compuestos cuyos efectos se desea conocer). Para la estimación del riesgo ecotoxicológico, también resulta útil la comparación con estudios previos que reportan las respuestas de otras especies al contaminante en cuestión, o de efectos de contaminantes similares en taxón en estudio.

En la **Tabla 4.11.3** se sintetizan los principales biomarcadores empleados en estudios ecotoxicológicos de Argentina, con breve mención de una variedad de compuestos que se han registrado en distintos cuerpos de agua, sus efectos sobre larvas y anuros adultos como la metodología empleada para determinarlos y sus respectivos autores.



Biomarcador	Método	Compuesto	E.V.	Referencia
<b>a. MORFOLÓGICOS</b>				
Longitud corporal	OL Medición con calibre digital/manual/ AD	Insecticidas (clorpirifos, cipermetrina; imidazolinona, piricarbamato, metilazinfos, malation); Herbicidas (glifosato, 2-4 D, atrazina) Resinas epoxi (bisfenol); Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina, diclofenac) Muestras ambientales (sedimentos y agua de agroecosistemas* sitios ganaderos y urbanos*; minas de fluorita*; aguas con fluoruro*, camas de pollo); Alimentos (soja Bt-resistente)	A L E	12, 29,11, 30, 31,32, 33,34,35, 36,37,38-40, 41,42,28,43,44, 45,46-48,49,50,51
Masa corporal	Balanza digital	Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina, diclofenac); Herbicidas (glifosato, 2-4 D) Muestras ambientales (cama de pollos, agroecosistemas*, suburbanos*, aguas con fluoruro*); Alimentos (soja Bt-resistente)	A L E	12, 29,11, 31, 53,37,42,39, 44,43,54,48
Otros parámetros longitudinales	OL (Medición)	Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina); muestras ambientales (sedimentos)	L	30, 31
Tasa de crecimiento/ Tasa de desarrollo o metamorfosis	OL (Medición longitud) <sup>98</sup>	Muestras ambientales (sedimentos, agroecosistemas*, sitios ganaderos y urbanos*); Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina, diclofenac); Herbicidas (2-4 D)	A L	55,30, 31, 52,36,54
Condición animal/ Factor de condición	OL (determinación de estadios)/ Esqueleto- cronología (determinación de edad) <sup>99</sup>	Herbicidas (atrazina); Resinas epoxi (bisfenol; epíclorhidrina); Muestras ambientales (agroecosistemas, sitios ganaderos y urbanos*)	A L	56,41, 57,36
Condición animal/ Factor de condición	Ecuación parámetros Morfométricos <sup>(100)</sup>	Muestras ambientales (agroecosistemas*, suburbanos*); Herbicida (atrazina); Medicamentos (diclofenac)	A L	12, 29,35,55, 58,59,43,52
Anormalidades morfológicas	OD/OL/Radiografía <sup>(101)</sup>	Muestras ambientales (agroecosistemas*, suburbanos*)	A J	7,60,59
	OL/Diafanización <sup>(102)</sup>	Insecticidas (clorpirifos, cipermetrina, piricarbamato, malation, metilazinfos); Herbicidas (glifosato; atrazina; 2-4 D); Resinas epoxi (bisfenol, epíclorhidrina); Muestras ambientales (camas de pollo; agroecosistemas); Medicamentos (diclofenac)	L E	34, 61,62,53,32,63,41, 57,38, 40,42,28, 54,49,52,51

**Tabla 4.11.3.** Resumen de los principales biomarcadores utilizados en estudios ecotoxicológicos en Argentina. Para cada parámetro, se detalla: las metodologías y/o herramientas empleadas para su análisis (OD: observación directa; OL: observación bajo lupa estereoscópica; AD: análisis digital; MMG: Tinción May-Grünwald-Giemsa; HE: Tinción Hematoxilina-Eosina; AT: Tinción con Azul de Toluidina; EFM: espectrofotometría; HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia); los compuestos específicos o muestras ambientales para los que fueron estudiados (\* refiere a aquellos estudios a campo, en los cuales la composición de las mezclas que contienen los contaminantes no se conoce en su completitud/exactitud debido a la propia naturaleza de la muestra); la etapa de la que se estudió (E.V.), definida según el criterio de los autores en cada trabajo (A: adulto; J: juvenil; M: metamórfico; L: larva; E: embrión, y la referencia bibliográfica correspondiente).

	OL/ Microscopía electrónica de Barrido <sup>(105)</sup>	Muestras ambientales (agua); Resinas epoxi (epiclorhidrina); Herbicidas (2-4 D)	L E	64,33,41, 57,15
	Hibridación in situ de montaje completo con ácido retinoico	Herbicidas (glifosato)	E	65
Índice hepato/gonado somático	Balanza digital	Muestras ambientales (agua); Cobre	L	15, 66
<b>b. HISTOLÓGICOS</b>				
Hígado	HE <sup>(104)</sup>	Herbicidas (glifosato, 2-4 D, atrazina)	A L	39, 40,54
Melanomacró-fagos (cantidad)	HE -Software Image Pro Plus	Herbicidas (glifosato; 2-4 D, atrazina), Insecticidas (clorpirifos); Muestras ambientales (agroecosistemas*)	A L	39, 40,43,54
(morfometría)	HE-Software Image Pro Plus	Muestras ambientales (agroecosistemas*)	A	47
(contenido pigmentario)	Tinciones diferenciales <sup>(105)</sup> Software Image Pro Plus	Herbicida (glifosato)	A	39
(presencia en la dermis)	OL por contraste	Herbicida (atrazina)	L	40
Intestino (grosor de pared)	HE-Software Image Pro Plus	Alimentos (soja BT-resistente)	L	44
Testículos (Anomalías, pigmentos, túbulos seminíferos)	HE	Muestras ambientales (agroecosistemas*)	A	37
Infección parasitaria	MMG	Muestras ambientales (agroecosistemas*)	L	11
Encéfalo	Microscopía electrónica de transmisión <sup>(106)</sup>	Insecticida (cipermetrina)	L	67,68
	AT <sup>(107)</sup>	Insecticida (cipermetrina)	L	67
Proteínas específicas	Inmunohistoquímica	Insecticida (metilazínfos, clorpirifos)	E	61
Fórmula leucocitaria	MGG <sup>(108)</sup>	Muestras ambientales (agroecosistemas*; minas de fluorita*); Insecticidas (clorpirifos); Herbicidas (glifosato, 2-4 D); Plomo acetato	A	79,87,78,46

Recuento de células sanguíneas	Muestra fresca en Cámara de Neubauer <sup>(109)</sup>	Muestras ambientales (agroecosistemas*); Plomo acetato	A	87,91
<b>c. BIOQUÍMICOS</b>				
Acetilcolinesterasa (AChE)	EFM <sup>(110)</sup>	Herbicidas (glifosato; picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio, glufosinato de amonio) Insecticida (malation, clorpirifos; piretroides, dimetoato; piriproxi-fenfos); Otros plaguicidas: metaldehido; Medicamentos (diclofenac); Arsénico	L	69,70,52, 71,45, 72, 73, 74,75,76,51
AChE (plasma)	EFM	Muestras ambientales (agroecosistemas*); Insecticida (clorpirifos); Herbicidas (glifosato, 2-4 D)	A	77, 78,79
AChE (tejidos)	EFM	Muestras ambientales (agua; agroecosistemas*); Insecticida (fenitrotion)	A L	11,80,15,13
Butirilcolin-esterasa (BChE)	EFM <sup>(110)</sup>	Herbicidas (glifosato; picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio, glufosinato de amonio), Muestras ambientales (sedimentos)	L	70,30, 71,72
BChE (plasma)	EFM	Muestras ambientales (agroecosistemas*); Insecticidas (clorpirifos); Herbicida (glifosato, 2-4 D)	A	12, 29,78
BChE (tejidos)		Insecticida (fenitrotion)	L	80
Carboxilestearasa (CbE)	EFM <sup>(111)</sup>	Insecticidas (clorpirifos; piretroides, dimetoato, piriproxi-feno, malation)	L	69,81,45, 73,76,51
CbE (plasma)	EFM	Muestras ambientales (agroecosistemas*); Insecticidas (clorpirifos); Herbicidas (glifosato, 2-4 D)	A	12, 29,78
CbE (tejidos)	EFM	Muestras ambientales (agroecosistemas*)	A L	13
Glutation-S-Transferasa (GST)	EFM <sup>(112,113)</sup>	Muestras ambientales (sedimentos; camas de pollo); Herbicidas (glifosato, picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio), Insecticida (malation, metilazinfos, clorpirifos; piriproxi-feno, dimetoato); Otros plaguicidas: metaldehido; Medicamentos (enrofloxacin, ciprofloxacina, diclofenac); nanopartículas; arsénico	L E	69,61,82,45, 72, 74, 83,30, 31, 52,75,28,76,51
GST (plasma)	EFM	Muestras ambientales (agroecosistemas*); Herbicidas (glifosato, 2-4 D); Insecticidas (clorpirifos)	A	29,78
GST (tejidos)	EFM	Muestras ambientales (agua, agroecosistemas*)	A L	15,43

Catalasa (CAT)	EFM <sup>(114,115)</sup>	Muestras ambientales (sedimentos; camas de pollo) Insecticida (clorpirifos, metilazinfos); Otros plaguicidas: metaldehido; Medicamentos (enrofloxacina, ciprofloxacina)	L E	61,30, 31,75,28,51
CAT (tejidos)	EFM	Muestras ambientales (agua)	L	15
Poliaminas	EFM/ HPLC <sup>(116)</sup>	Insecticidas (metilazinfos; clorpirifos, malation)	L E	69,61,84
Ácido δ-amino levulínico deshidratasa (sangre)	EFM <sup>(117)</sup>	Plomo	A	85,86
Peroxidación Lipídica (hígado)	EFM	Muestras ambientales (agua)	L	15
		Insecticidas (clorpirifos)	L	51
Peroxidación Lipídica (eritrocitos)	Ensayo T-bars <sup>(118)</sup>	Insecticidas (clorpirifos); Herbicidas (glifosato, 2-4 D)	A	78
Glutation (GSH)	EFM	Insecticidas (metilazinfos, clorpirifos)	L E	61,51
Ácido Retinoico	Quimioluminiscencia	Herbicidas (glifosato)	E	65
	HPLC	Muestras ambientales (agroecosistemas)	A	58
Proteínas (totales)	Espectrofotometría <sup>(119)</sup>	Insecticidas (malation, metilazinfos); Plomo acetato	L	69,87,34,84
Proteínas (séricas)	Electroforesis <sup>(120)</sup>	Plomo acetato	A	87
Hormonas tiroideas (T3 y T4)	Inmunoensayo electroquimioluminiscente	Insecticida (piriproxifeno), Herbicida (glifosato), arsénico	L	45,74
<b>d. CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS</b>				
Micronúcleos	MMG / Naranja de acridina <sup>(121)</sup>	Muestras ambientales (sedimentos; agroecosistemas*, minas de fluorita*) Insecticida (endosulfán; cipermetrina; imidacloprid; pirimicarbamatos; piretroides, imidazolinona); Herbicidas (glifosato, glufosinato de amonio; a base de fluocloridona; picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio); Medicamentos (ciclofosfamida); Alimentos (Soja Bt-resistente); Nanopartículas, Cobre	A M L	88,44, 72, 83, 89, 90,91,66)92,11, 30,38, 39, 93,94,95,42,46, 47,50

Otras anomalías nucleares eritrocitarias	MMG	Muestras ambientales (sedimentos, agroecosistemas*, minas de fluorita*); Insecticidas (imidacropirid; imidazolinona, piricarbamatos); Herbicidas (glifosato, glufosinato de amonio, a base de flurocloridona, picloram, metasulfuron-metil, bispiribac-sodio); Alimentos (soja Bt-resistente); arsénico; nanopartículas	A L	12,44, 72, 83, 90,30,38, 39, 93,95,94,42,49,46, 47
Daño ADN (en célula individual)	Ensayo cometa <sup>(122,123)</sup>	Muestras ambientales (cama de pollos); Herbicidas (imazetapir; glifosato; a base de flurocloridona, 2-4 D); Insecticidas (clorpirifos; imidacloprida, imidazolinona); arsénico	A L	38, 93, 97), 94,74, 7,28
Índice mitótico	MMG	Alimentos (soja Bt-resistente); Muestras ambientales (minas de fluorita*). Herbicida (glifosato), arsénico	A L	44, 74,46
Frecuencia de eritroblastos	MMG	Insecticida (pirimicarbamato)	L	92,49
Apoptosis (tejido específico)	Tunel <sup>(124)</sup> /Electroforesis <sup>(125)</sup>	Insecticida (cipermetrina)	L	67,68
<b>e. ETOLÓGICOS</b>				
Comportamiento general/ natatorio	OD/ Registro digital	Insecticidas (cipermetrina, clorpirifos, pirimicarbamato) Plomo, Zinc, Resinas epoxi (bisfenol), muestras ambientales (agroecosistemas)	L	97,53,32,41,42,49, 50,51
	AD Softwares: Smart, MedeaLab	Herbicidas (glufosinato de amonio); Insecticidas (piretroides; imidazolinona, Piriproxifeno) Otros plaguicidas (metaldehido); Medicamentos (diclofenac)	L	52, 71,38,75,45, 73
Alimentación	OD			41
Tasa de depredación	Conteo de larvas consumidas o lastimadas	Insecticida (fenitrotion)	L	80
<b>f. MARCADORES FISIOLÓGICOS</b>				
Función cardíaca	OL/transiluminación/ AD (Software iMovie)	Insecticida (piriproxifeno) Medicamentos (diclofenac); Derivados Plásticos (bisfenol)	L	41,52,45

### Consideraciones finales

Para concluir, resulta importante mencionar que, si bien existe una clasificación relativamente consensuada acerca de los tipos de biomarcadores que pueden aplicarse al estudio ecotoxicológico de anfibios, las respuestas de los organismos no deben ser interpretadas como efectos de una única índole. Como se ha mencionado a lo largo de la sección, las respuestas biológicas pueden explicarse a diferente escala biológica, y esta visión “holística” resulta fundamental para comprender de la mejor manera posible los mecanismos a través de los cuales los contaminantes afectan a los sistemas biológicos.

### Bibliografía

1. Molina, R.; Marcot, B.G. & Leshner, R. 2006. Protecting rare, old growth, forest associated species under the survey and manage program guidelines of the Northwest Forest Plan. *Conservation Biology* 20: 306-318.
2. Heyer, R.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, C. & Foster, M.S. (eds.). 1994. Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Institution, Washington D.C.
3. Sparling, D.W.; Fellers, G.M. & McConnell, L.L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 20: 1591-1595.
4. Corn, P.S. 1994. Straight-line Drift Fences and Pitfall Traps: 109-117. *En: Heyer, R., Donnelly, M. A., Foster, M., & McDiarmid, R. (eds.). Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.*
5. Lajmanovich, R.C. & Peltzer, P.M. 2001. Evaluación de la diversidad de anfibios de un remanente forestal del valle aluvial del río Paraná (Entre Ríos-Argentina). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 12: 12-17.
6. Sánchez, L.C.; Peltzer, P.; Manzano, A.S. & Lajmanovich, R.C. 2007. Dinámica de un ensamble de anuros en un humedal del tramo inferior del río Paraná, Argentina. *Asociación Interciencia* 32: 463-470.
7. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Sanchez, L.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Bionda, C.L. & Basso, A. 2011. Morphological abnormalities in amphibian populations. *Herpetological Conservation and Biology* 6: 432-442.
8. Cuello, M.E.; Úbeda, C.A. & Bello, M.T. 2017. Habitat associations for the endangered frog *Atelognathus patagonicus* within the aquatic environment: key microhabitats for conservation. *Herpetological Conservation and Biology* 12: 410-421.
9. Scott, N.J. & Woodward, B.D. 2001. Relevamientos de Lugares de Reproducción: 113-117. *En: Heyer, W.R.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayek, C. & Foster, M.S. (eds.). Medición y Monitoreo de la Diversidad Biológica. Métodos Estandarizados para Anfibios. Editorial Universitaria de la Patagonia, Chubut.*
10. Sparling, D.W.; Linder, G.; Bishop, C.A., & Krest, S.K. 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. SETAC Books, Boca Raton, FL.
11. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Sánchez-Hernandez, J.C.; Cabagna, M.C.; Attademo, A.M. & Basso, A. 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 185-197.
12. Attademo, A.M.; Cabagna-Zenklusen, M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Junges, C. & Basso, A. 2011. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). *Ecotoxicology* 20: 274-282.
13. Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Basso, A. & Junges, C. 2014. Tissue-specific variations of esterase activities in the tadpoles and adults of *Pseudis paradoxa* (Anura: Hylidae). *Water, Air, & Soil Pollution* 225: 1903.

14. Gupta, R.C. 2014. Respiratory toxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology* 2014: 216-239.
15. Ossana, N.A. 2011. Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
16. Porta, A. 1996. Contaminación ambiental: uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 30: 67-79
17. van der Oost, R.; Beyer, J. & Vermeulen, N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
18. Walker, C.C.; Salinas, K.A.; Harris, P. S.; Wilkinson, S.S.; Watts, J.D. & Hemmer, M.J. 2007. A proteomic (SELDI-TOF-MS) approach to estrogen agonist screening. *Toxicological Sciences* 95: 74-81.
19. Conti, M.E. 2008. Biomarkers for environmental monitoring: 25-46. *En: Conti, M.E. (ed.). Biological Monitoring: Theory and Applications.* Wit Press, UK.
20. Newman, M.C. 2014. *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution.* CRC Press, Florida.
21. Venturino, A.; Rosenbaum, E.; Caballero De Castro, A.; Anguiano, O.L.; Gauna, L.; Fonovich De Schroeder, T. & Pechen De D'Angelo, A.M. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8: 167-186.
22. Connon, R.E.; Geist, J. & Werner, I. 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* 12: 12741-12771.
23. Chapman, P.M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* 44: 7-15.
24. Bernard, A. & Lauwerys, R. 1986. Effects of Cadmium in Human: 135-77. *En: Foulkes, F.C. (ed.). Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 80.* Springer-Verlag, Berlin.
25. Sievers, M.; Hale, R.; Parris, K.M.; Melvin, S.D.; Lanctôt, C.M. & Swearer, S.E. 2019. Contaminant-induced behavioural changes in amphibians: A meta-analysis. *Science of the Total Environment* 693: 133570.
26. Alford, R.A. & Richards, S.J. 1999. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 133-165.
27. Falfushynska, H.; Gnatyshyna, L.; Fedoruk, O.; Mitina, N.; Zaichenko, A.; Stoliar, O. & Stoika, R. 2015. Hepatic metallothioneins in molecular responses to cobalt, zinc, and their nanoscale polymeric composites in frog *Rana ridibunda*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 172: 45-56.
28. Curi, L.M.; Peltzer, P.M.; Martinuzzi, C.; Attademo, M.A.; Seib, S.; Simoniello, M.F. & Lajmanovich, R.C. 2017. Altered development, oxidative stress and DNA damage in *Leptodactylus chaquensis* (Anura: Leptodactylidae) larvae exposed to poultry litter. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143: 62-71.
29. Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Cabagna, M. & Fiorenza, G. 2007. Plasma B-esterase and glutathione S-transferase activity in the toad *Chaunus schneideri* (Amphibia, Anura) inhabiting rice agroecosystems of Argentina. *Ecotoxicology* 16: 533-539.
30. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Cabagna-Zenkhusen, M.C.; Repetti, M.R. & Beldoménico, H. 2013. Effect of exposure to contaminated pond sediments on survival, development, and enzyme and blood biomarkers in veined treefrog (*Trachycephalus typhonius*) tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98: 142-151.
31. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Teglia, C.M.; Martinuzzi, C. & Goicoechea, H.C. 2017. Ecotoxicity of veterinary enrofloxacin and ciprofloxacin antibiotics on anuran amphibian larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 51: 114-123.
32. Agostini, M.G.; Natale, G. S. & Ronco, A.E. 2010. Lethal and sublethal effects of cypermethrin to *Hypsiboas pulchellus* tadpoles. *Ecotoxicology* 19: 1545-1550.
33. Aronzon, C.M.; Sandoval, M.T.; Herkovits, J. & Pérez-Coll, C.S. 2010. Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology* 26: 373-381.
34. Lascano, C.I.; Ferrari, A.; Gauna, L.E.; Cocca, C.; Cochón, A.C.; Verrengia, N. & Venturino, A. 2011. Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101: 240-247.

35. Bionda, C.L.; Salas, N.E.; Caraffa, E.; Baraquet, M. & Martino, A.L. 2011. On abnormalities recorded in an urban population of *Rhinella arenarum* from central Argentina. *Herpetology Notes* 5: 237-241.
36. Bionda, C.D.L.; Babini, S.; Martino, A.L.; Salas, N.E. & Lajmanovich, R.C. 2018. Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation* 14: e00398.
37. Sánchez, L.C.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.; Manzano, A.S.; Junges, C.M. & Attademo, A.M. 2014. First evidence of the effects of agricultural activities on gonadal form and function in *Rhinella fernandezae* and *Dendropsophus sanborni* (Amphibia: Anura) from Entre Rios Province, Argentina. *Acta Herpetologica* 9: 75-88.
38. Pérez-Iglesias, J.M.; Soloneski, S.; Nikoloff, N.; Natale, G.S. & Larramendy, M.L. 2015. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119: 15-24.
39. Pérez-Iglesias, J.M.; Franco-Belussi, L.; Moreno, L.; Tripole, S.; de Oliveira, C. & Natale, G.S. 2016. Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 9852-9861.
40. Pérez-Iglesias, J.M.; Franco-Belussi, L.; Natale, G.S. & de Oliveira, C. 2019. Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental Pollution* 244: 733-746.
41. Hutler Wolkowicz, I.; Svartz, G.V.; Aronzon, C.M. & Pérez Coll, C. 2016. Developmental toxicity of bisphenol A diglycidyl ether (epoxide resin badge) during the early life cycle of a native amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35: 3031-3038.
42. Babini, M.S.; de Lourdes Bionda, C.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2016. Adverse effect of agroecosystem pond water on biological endpoints of common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment* 188: 459.
43. Huespe, I.; Cabagna-Zenkhusen, M.; Curi, L.M.; Peltzer, P.; Attademo, M.A.; Villafane, N. & Lajmanovich, R. 2017. Liver melanomacrophages and Gluthation S-Transferase activity in *Leptodactylus chaquensis* (Anura, Leptodactylidae) as biomarkers of oxidative stress due to Chlorpyrifos exposition. *Acta Biologica Colombiana* 22: 234-237.
44. Lajmanovich, R.C.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Junges, C.M. & Martinuzzi, C.S. 2017. Acute toxicity of apple snail *Pomacea canaliculata*'s eggs on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Toxin Reviews* 36: 45-51.
45. Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Martinuzzi, C.S.; Attademo, A.M.; Basso, A. & Colussi, C.L. 2019. Insecticide pyriproxyfen (Dragón®) damage biotransformation, thyroid hormones, heart rate, and swimming performance of *Odontophrynus americanus* tadpoles. *Chemosphere* 220: 714-722.
46. Pollo, F.E.; Grenat, P.R.; Salinas, Z.A.; Otero, M.A.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2017. Evaluation in situ of genotoxicity and stress in South American common toad *Rhinella arenarum* in environments related to fluorite mine. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 18179-18187.
47. Pollo, F.E.; Grenat, P.R.; Otero, M.A.; Babini, S.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2018. Evaluation in situ of genotoxic and cytotoxic response in the diploid/polyploid complex *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae) inhabiting agroecosystems. *Chemosphere* 216: 306-312.
48. Pollo, F.E.; Cibils-Martina, L.; Otero, M.A.; Baraquet, M.; Grenat, P.R.; Salas, N.E. & Martino, A.L. 2019. Anuran tadpoles inhabiting a fluoride-rich stream: diets and morphological indicators. *Heliyon* 5: e02003.
49. Natale, G.S.; Vera-Candiotti, J.; de Arcaute, C.R.; Soloneski, S.; Larramendy, M.L. & Ronco, A.E. 2018. Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147: 471-479.
50. Salinas, Z.A. 2019. Estudios ecotoxicológicos sobre anfibios anuros asociados a cuerpos de agua bajo distintos tipos de manejo agrícola en agroecosistemas del sureste de la provincia de Córdoba. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.



51. Barreto, E.; Salgado Costa, C.; Demetrio, P.; Lascano, C.; Venturino, A. & Natale, G. 2020. Sensitivity of *Boana pulchella* (Anura: Hylidae) tadpoles to environmentally relevant concentrations of chlorpyrifos: effects at the individual and biochemical level. *Environmental Toxicology and Chemistry* 39: 834-841.
52. Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Martinuzzi, C.; Attademo, A.M.; Curi, L.M. & Sandoval, M.. 2019. Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: Assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of the Total Environment* 683: 624-637.
53. Brunelli, E.; Bernabó, I.; Berg, C.; Lundstedt-Enkel, K.; Bonacci, A. & Tripepi, S. 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 91: 135-142.
54. Curi, L.M.; Peltzer, P.M.; Sandoval, M.T. & Lajmanovich, R.C. 2019. Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2,4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution* 230: 22.
55. Brodeur, J.C.; Sassone, A.; Hermida, G.N. & Codugnello, N. 2013. Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92: 10-17.
56. Brodeur, J.C.; Svartz, G.; Perez-Coll, C.S.; Marino, D.J.G. & Herkovits, J. 2009. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology* 91:161-170.
57. Hutler Wolkowicz, I.R.; Aronzon, C.M. & Coll, C.S.P. 2013. Lethal and sublethal toxicity of the industrial chemical epichlorohydrin on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) embryos and larvae. *Journal of Hazardous Materials* 263: 784-791.
58. Teglia, C.M.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Goicoechea, H.C. & Lajmanovich, R.C. 2015. Plasma retinoids concentration in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) from rice agroecosystems, Santa Fe province, Argentina. *Chemosphere* 135: 24-30.
59. Guerra, C. & Araújo, E. 2016. Amphibian malformations and body condition across an agricultural landscape of northwest Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 121: 105-116.
60. Agostini, M.G.; Kacolis, F.; Demetrio, P.; Natale, G.S.; Bonetto, C. & Ronco, A.E. 2013. Abnormalities in amphibian populations inhabiting agroecosystems in northeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 104: 163-171.
61. Lascano, C.I.; Sotomayor, V.; Ferrari, A. & Venturino, A. 2009. Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicológica Argentina* 17: 8-19.
62. Lajmanovich, R.C.; Sandoval, M.T. & Peltzer, P. M. 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 612-618.
63. Svartz, G.V. & Pérez-Coll, C.S. 2013. Comparative toxicity of cypermethrin and a commercial formulation on *Rhinella arenarum* larval development (Anura: Bufonidae). *International Journal of Environmental Health* 6: 320-329.
64. Herkovits, J.; Perez-Coll, C.S. & Herkovits, F.D. 1996. Ecotoxicity in the Reconquista River, province of Buenos Aires, Argentina: a preliminary study. *Environmental Health Perspectives* 104: 186-189.
65. Paganelli, A.; Gnazzo, V.; Acosta, H.; López, S.L. & Carrasco, A.E. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology* 23: 1586-1595.
66. Ossana, N.A.; Castañé, P.M.; Poletta, G.L; Mudry, M.D. & Salibián, A. 2010. Toxicity of waterborne copper in premetamorphic tadpoles of *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84: 712-715.
67. Izaguirre, M.F.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Soler, A.P. & Casco, V.H. 2000. Cypermethrin-Induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65: 501-507.
68. Casco, V.H.; Izaguirre, M.F.; Marín, L.; Vergara, M.N.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P. & Soler, A.P. 2006. Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum*

- tadpoles induced by cypermethrin. *Cell Biology and Toxicology* 22: 199-211.
69. Venturino, A.; Gauna, L.; Bergoc, R.M. & Pechen de D'Angelo, A.M. 2001. Toxicokinetics of malathion in larval stages of the toad *Bufo arenarum* (Hensel): Effect of exogenous spermidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70: 142-150.
  70. Junges, C.M.; Vidal, E.E.; Attademo, A.M.; Mariani, M. L.; Cardell, L.; Negro, A.C.; & Zalazar, C.S. 2013. Effectiveness evaluation of glyphosate oxidation employing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UVC process: toxicity assays with *Vibrio fischeri* and *Rhinella arenarum* tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 48: 163-170.
  71. Peltzer, P.M.; Junges, C.M.; Attademo, A.M.; Bassó, A.; Grenón, P. & Lajmanovich, R.C. 2013. Cholinesterase activities and behavioral changes in *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. *Ecotoxicology* 22: 1165-1173.
  72. Lajmanovich, R.C.; Junges, C.M.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Cabagna-Zenklusen, M.C. & Basso, A. 2013. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution* 224: 1404.
  73. Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Martinuzzi, C.S.; Attademo, A.M.; Basso, A.; Maglianese, M.I. & Colussi, C.L. 2018. B-esterases and behavioral biomarkers in tadpoles exposed to pesticide Pyrethroid-TRISADA®. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 10: 237-244.
  74. Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, A.M.; Martinuzzi, C.S.; Simoniello, M.F.; Colussi, C.L.; Cuzziol Boccioni, A.P. & Sigrist, M. 2019. First evaluation of novel potential synergistic effects of glyphosate and arsenic mixture on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles. *Heliyon* 5: e02601.
  75. Attademo, A.M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M. & Junges, C.. 2016. Acute toxicity of metaldehyde in the invasive rice snail *Pomacea canaliculata* and sublethal effects on tadpoles of a non-target species (*Rhinella arenarum*). *Water, Air, & Soil Pollution* 227: 400.
  76. Martinuzzi, C.S.; Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Mac Loughlin, T. M.; Marino, D.J.; & Lajmanovich, R.C. 2020. Comparative toxicity of two different Dimethoate formulations in the common toad (*Rhinella arenarum*) tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 104: 35-40.
  77. Lajmanovich, R.; Sánchez-Hernández, J.C.; Stringhini, G. & Peltzer, P. 2004. Levels of serum Cholinesterase activity in the Rococo toad (*Bufo paracnemis*) in agrosystems of Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72: 586-591.
  78. Lajmanovich, R.C. Attademo, A.M.; Simoniello, M.F.; Poletta, G.L.; Junges, C.M.; Peltzer, P.M. & Cabagna-Zenklusen, M.C. 2015. Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2, 4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, & Soil Pollution* 226: 1-12.
  79. Cabagna, M.C.; Lajmanovich, R.C.; Stringhini, G.; Sanchez-Hernandez, J.C. & Peltzer, P. M. 2005. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology* 2: 373.
  80. Junges, C.M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, A.M. & Basso, A. 2010. Predator—prey interactions between *Synbranchus marmoratus* (Teleostei: Synbranchidae) and *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Amphibia: Hylidae): Importance of lateral line in nocturnal predation and effects of fenitrothion exposure. *Chemosphere* 81: 1233-1238.
  81. Attademo, A.M.; Peltzer, P.M.; Lajmanovich, R.C.; Cabagna-Zenklusen, M.; Junges, C.M.; Lorenzatti, E. & Grenón, P. 2015. Biochemical changes in certain enzymes of *Lysapsus limellium* (Anura: Hylidae) exposed to chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113: 287-1294.
  82. Ferrari, A.; Lascano, C.; de D'Angelo, A.M.P. & Venturino, A. 2011. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 153: 34-39.
  83. Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Martinuzzi, C.S.; Attademo, A.M.; Colussi, C.L.; & Basso, A. 2018. Acute toxicity of colloidal silicon dioxide nanoparticles on amphibian larvae: emerging environmental concern. *International Journal of Environmental Research* 12: 269-278.
  84. Pires, N.; Maiaale, S.; Venturino, A. & Lascano, C. 2020. Differential effects of azinphos-methyl and chlorpyrifos on polyamine oxidative metabolism during the embryonic development of *Rhinella arenarum* and its relation to oxidative stress. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 163: 14-22.

85. Perí, S.I.; Arrieta, M.A.; Fink, N.E. & Salibián, A. 1998. Z) e/ta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity in blood of *Bufo arenarum* (Anura). *Biological Research* 31: 339-342.
86. Arrieta, M.A.; Bruzzone, L.; Apartín, C.; Rosenberg, C.E.; Fink, N.E. & Salibián, A. 2004. Biosensors of inorganic lead exposure and effect in an adult amphibian. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 224-230.
87. Chiesa, M.E.; Rosenberg, C.E.; Fink, N.E. & Salibián, A. 2006. Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): Effects of sublethal lead acetate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50: 384-391.
88. Campana, M.A.; Panzeri, A.M.; Moreno, V.J. & Dulout, F.N. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology* 26: 99-103.
89. Lajmanovich, R.C.; Cabagna, M.; Peltzer, P.M.; Stringhini, G.A. & Attademo, A.M. 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 587: 67-72.
90. Lajmanovich, R.C.; Cabagna-Zenklusen, M.C.; Attademo, A.M.; Junges, C.M.; Peltzer, P.M.; Basso, A. & Lorenzatti, E. 2014. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 769: 7-12.
91. Cabagna, M.; Lajmanovich, R.C.; Peltzer, P.M.; Attademo, M. & Ale, E. 2006. Induction of micronucleus in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Toxicological and Environmental Chemistry* 88: 729-737.
92. Candiotti, J.V.; Natale, G.S.; Soloneski, S.; Ronco, A.E. & Larramendy, M.L. 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere* 78: 249-255.
93. Pérez-Iglesias, J.M.; de Arcaute, C.R.; Nikoloff, N.; Dury, L.; Soloneski, S.; Natale, G.S. & Larramendy, M.L. 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104: 120-126.
94. Nikoloff, N.; Natale, G.S.; Marino, D.; Soloneski, S. & Larramendy, M.L. 2014. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100: 275-281.
95. Ruiz de Arcaute, C.; Pérez-Iglesias, J.M.; Nikoloff, N.; Natale, G.S.; Soloneski, S. & Larramendy, M.L. 2014. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecological Indicators* 45: 632-639.
96. Pérez-Iglesias, J.M.; Ruiz de Arcaute, C.; Natale, G.S.; Soloneski, S. & Larramendy, M.L. 2017. Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 503-508.
97. Herkovits, J. & Pérez-Coll, C.S. 1991. Antagonism and synergism between lead and zinc in amphibian larvae. *Environmental Pollution* 69: 217-221.
98. Teplitsky, C.; Plenet, S. & Joly, P. 2003. Tadpoles' response to fish introduction. *Oecologia* 134: 270-277.
99. Castanet, J. 1982. Recherches sur la croissance du tissu osseux des reptiles. Application: la méthode squelettochronologique. Thèse de Doctorat d'État, Paris.
100. Bagenal, T.B. & Tech, F.W. 1978. Methods for Assessment of a Fish Production in Fresh Waters: 101-136. *En: Bagenal, T.B. (ed.). Age and Growth*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
101. Gibbons, J.W. & Greene, J.L. 1979. X-ray photography: a technique to determine reproductive patterns of freshwater turtles. *Herpetologica*: 86-89.
102. Wassersug, R. 1976. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formaline-fixed vertebrates. *Stain Technology* 51: 131-134.
103. Anderson, T.F. 1952. A method for eliminating gross artefacts in drying specimens. In *Extrait du Congress de Microscopic Electronique*. Paris. 567

104. Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques. Fourth Edition. W.H- Freeman and Company, San Francisco.
105. Agius, C. 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Developmental & Comparative Immunology* 5: 597-606.
106. Martón, L. 1934. La microscopie electronique des objets biologiques. *Bulletin de l'Académie Royale des Sciences de Belgique Series* 5 20: 439-446.
107. Herlin, R.; Marnay, J.; Jacob, J.H.; Ollivier, J.M. 1983. A study of the mechanism of staining of the toluidine blue dye test. *Endoscopy* 15: 4-7.
108. Dacie, J.V. & Lewis, S.M. 1984. Practical Hematology. Churchill Livingstone, New York.
109. Varela, M.E. & Sellares, M.E. 1937. Sobre la morfología hemática del *Bufo arenarum* (Hensel). *Revista de la Sociedad Argentina de Biología* 13: 351-361.
110. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres Jr, V. & Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
111. Gomori, G. 1953. Human esterases. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 42: 445-453.
112. Habig, W.H.; Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
113. Habdous, M.; Vincent-Viry, M.; Visvikis, S. & Siest, G. 2002. Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta* 326: 131-142.
114. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro: 121-126. *En: Methods in Enzymology* Vol. 105. Academic Press.
115. Beers, R.F. & Sizer, I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195: 133-140.
116. Seiler, N. & Knödgen, B. 1980. High-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination of the natural polyamines and their monoacetyl derivatives. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 221: 227-235.
117. Berli, N.A. & Schalle, R. K.H. 1974. European standardized method for the determination of 8-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 12: 389-39.
118. Ohkawa, H.; Ohishi, N. & Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.
119. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol cells. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265.
120. Bertini, F. & Cei, J.M. 1960. Observaciones electroforéticas en seroproteínas de poblaciones argentinas de *Bufo arenarum*. *Revista de la Sociedad Argentina de Biología* 36.
121. Hayashi, M.; Sofuni, T. & Ishidate, M.Jr. 1983. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research* 1983: 241-247.
122. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. & Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.
123. Poletta, G.L.; Larriera, A.; Kleinsorge, E. & Mudry, M.D. 2008. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 650: 202-209.
124. Modak, S.P. & Bollum, F.J. 1970. Terminal lens cell differentiation. *Experimental Cell Research* 62: 421-432.
125. Aaij, C. & Borst, P. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* 269: 192-200.

## 4.12 ÁREAS PRIORITARIAS PARA LA CONSERVACIÓN

**Eduardo Etchepare**

<sup>1</sup> CONICET. Facultad Regional Concordia. Universidad Tecnológica Nacional. Salta 277. Concordia, Entre Ríos, Argentina.

A pesar de que el interés por la biodiversidad ha tomado mayor dimensión en las últimas décadas, su conservación no resulta todavía una prioridad en la agenda social y política. En este sentido, existen claras evidencias sobre el deterioro de los ambientes naturales y pérdida de especies, impactos negativos que han aumentado severamente en el último medio siglo. Diferentes trabajos advierten sobre el comienzo de una masiva extinción de especies producida por causas antropogénicas, la denominada sexta extinción<sup>(1-7)</sup>, que en conjunto con el calentamiento global, el mal uso y distribución de los recursos naturales, constituyen los mayores retos ambientales a los que ha de enfrentarse la humanidad durante los próximos años<sup>(8-10)</sup>.

Si bien la necesidad de conservar los recursos, sobre todo aquellos que redundan en un beneficio económico, se ha planteado reiteradamente a lo largo de la historia, recién en la década del '80 se consolida como una ciencia multidisciplinaria que hoy se denomina Biología de la Conservación<sup>(11-13)</sup>. También conocida como "*ciencia de la crisis*", es una disciplina que trasciende el campo académico y plantea la necesidad de brindar soluciones a problemas concretos de conservación, como, por ejemplo: cómo y dónde conservar y manejar las áreas protegidas, cómo detener la pérdida de la biodiversidad y de hábitats, cómo recuperar especies y poblaciones en riesgo de extinción. Frente a estos interrogantes, se presentó la necesidad de debatir cómo establecer prioridades, cuestionar la eficiencia de los espacios ya protegidos y elaborar nuevas herramientas para mejorar los diagnósticos frente a la toma de decisiones.

Debido a la complejidad y tiempo necesario para conocer las interacciones entre especies, el funcionamiento de los ecosistemas y su historia evolutiva, la Planeación Sistemática surgió como una de las ramas de la Biología de la Conservación para brindar un protocolo claro que permite, mediante la identificación de sitios o áreas prioritarias, proponer redes de áreas protegidas que aseguren a largo plazo el mantenimiento de la biodiversidad y de los procesos que la sustentan<sup>(14,15)</sup>, buscando de esta manera hacer más eficientes los escasos recursos destinados a conservación. Si bien este proceso en sí, no garantiza conservar la biodiversidad, constituye el marco fundamental sobre el cual se deben constituir las acciones de conservación<sup>(15)</sup>.

Conceptualmente, las áreas prioritarias para la conservación son representaciones espaciales del territorio, que incluyen particularidades ambientales, biológicas, físicas, sociales, económicas, culturales y políticas determinadas, y necesarias para lograr los objetivos y metas planteadas. Algo muy importante a tener en cuenta en este ejercicio de planificación es que las áreas identificadas deben presentar necesariamente un riesgo inminente o ser vulne-

rables a un proceso natural, antrópico o ambos, que pongan en riesgo su permanencia. De esta manera se puede distinguir entre otros términos relacionados (pero no homólogos) como áreas claves, aptas, potenciales, relevantes o importantes para la conservación.

En este esquema estructurado en distintos pasos (ver más adelante) que se presenta desde una planeación sistemática, se establecen objetivos explícitos con el fin de resolver un problema de optimización de manera cuantitativa. Para esto, los conceptos de complementariedad, irremplazabilidad y vulnerabilidad, son claves. Con esto se pretende buscar la máxima representatividad de los elementos de interés y cumplir con las metas de conservación mediante diferentes soluciones al menor costo posible (**eficiencia**).

**Complementariedad:** Representa el concepto clave sobre el que se basa la planeación sistemática para la conservación. Este método de optimización consiste en la elección de áreas prioritarias que conjuntamente posean la mayor diversidad biológica o elementos elegidos como sustitutos posibles. Se basa en fórmulas matemáticas que minimizan o maximizan ciertas condiciones, maximizando en este caso la representatividad de los atributos elegidos como sustitutos (número de especies focales, especies raras, amenazadas, endémicas, poblaciones, porcentaje de distribución, comunidades, procesos ecológicos, ambientes) y minimizando la superficie acumulada. El procedimiento se inicia con el área (celda) que contiene a la mayoría de los sustitutos elegidos o elementos únicos, luego se los elimina de la matriz y de forma secuencial, con estos datos reducidos, se vuelve a elegir el área más rica y se repite el procedimiento de eliminar los sustitutos o elementos ya representados y eligiendo el área más rica, hasta llegar a representar a todos los sustitutos o elementos con varias soluciones igualmente eficientes y económicas en términos de la superficie necesaria.

**Irremplazabilidad o unicidad:** mide el valor de conservación de un sitio y el grado en que este puede o no ser reemplazado por otro, o por combinaciones de otros sitios, teniendo en cuenta la cobertura que ofrece de los sustitutos elegidos en relación con los objetivos y metas de conservación definidos.

**Vulnerabilidad:** probabilidad o inminencia de destrucción o pérdida del ambiente que presenta un área seleccionada.

Existen distintos programas computacionales para la selección complementaria de áreas prioritarias para la conservación que incorporan diferentes al-

goritmos como WorldMap, C-Plan, CPLEX, Marxan, ResNet, greedy algorithm, Target, LQGraph, MultCSync, ConsNet, FOCALIZE y ZONATION<sup>(16-24)</sup>. Sin embargo, el único que identifica soluciones óptimas de áreas prioritarias es el algoritmo CPLEX (ver<sup>25</sup>).

Los algoritmos utilizados en el proceso de priorización de áreas para la conservación se pueden dividir en tres grupos:

- Algoritmos óptimos o exactos: ofrecen la solución más eficiente (económica) para minimizar el área y maximizar la representación de los sustitutos de biodiversidad (CPLEX).
- Algoritmos heurísticos: la selección final no necesariamente es la óptima, pudiéndose obtener un conjunto subóptimo de áreas. Utilizan parámetros o reglas determinados por el usuario que pueden determinarse, inclusive, de manera jerárquica como la complementariedad, rareza, amenazas, endemismos (ej. ResNet, greedy algorithm).
- Algoritmos metaheurísticos: Se aplican a problemas que no tienen un algoritmo específico que resulten en una solución eficiente. Al no ser tan rígidos, utilizan reiteradamente algoritmos heurísticos para mejorar la selección y aproximarse a una óptima (ej. Marxan o ConsNet). Entre los metaheurísticos más eficientes se encuentran el reconocido o templado simulado, la búsqueda tabú, y los algoritmos genéticos<sup>(15,22,26)</sup>.

En términos de la eficiencia de representatividad, los algoritmos de optimización son preferibles a los heurísticos<sup>(16-18,25)</sup>.

## **Procedimientos para la selección de áreas prioritarias para la conservación**

En primera instancia se debe comprender que un proceso de priorización se realiza con la finalidad de responder a un problema de optimización, en el que las áreas finalmente seleccionadas deben ser eficientes, viables y aplicables para su permanencia y manejo en términos económicos, políticos y sociales. Este planteo es necesario debatirlo e integrarlo, sobre todo aquellos que realmente se interesen por trabajar en biología de la conservación. Si bien es necesario poner la evidencia científica a disposición de las políticas públicas y los tomadores de decisión, si esta premisa no se incorpora, el camino entre la investigación y su real implementación quedará truncado.

La bibliografía donde se discuten los procedimientos necesarios para identificar áreas prioritarias para la conservación es abundante<sup>(14,15,17,27-41)</sup>.



De forma simplificada, se pueden encontrar dos grupos metodológicos, los cualitativos (experiencia de los expertos) y los cuantitativos (aproximaciones estadísticas) que no son excluyentes. Por el contrario, la planificación sistemática se desarrolla mejor cuando los especialistas locales participan activamente en la planeación<sup>(14)</sup>.

**Métodos cualitativos:** Prevalece la opinión de los expertos. Históricamente, este método se ha utilizado para la selección de áreas naturales protegidas (ANP). Sin embargo, como el campo de la planeación estuvo mayormente dominado por técnicos y gestores, se han registrado diferentes deficiencias y problemas relacionados con los sistemas de ANP. Uno de los principales está relacionado con la falta de representatividad de la biodiversidad en general y de las diferentes ecorregiones, debido a que las ANP han sido seleccionadas sobre la base de criterios diversos, no necesariamente basados en maximizar la representatividad de especies y ecosistemas, y/o la persistencia de sus poblaciones. Algunos criterios frecuentemente utilizados para determinar áreas para conservación, han sido: el atractivo paisajístico; los usos recreativos; la compensación por daños ambientales; la disponibilidad de tierras fiscales; zonas económicamente poco rentables; condiciones desfavorables para el asentamiento humano; áreas con escasa intervención humana; la presencia de especies amenazadas; la riqueza de vertebrados; la presencia de comunidades vegetales casi desaparecidas o con gran presión de uso y la representatividad de las subunidades biogeográficas<sup>(6,14,33,42-45)</sup>. Como varios de estos criterios son oportunistas, no necesariamente los sistemas de ANP protegen de manera representativa toda la diversidad regional, y en algunos casos se ha reportado que los espacios conservados existentes no poseen mayor representatividad en su biodiversidad que la obtenida mediante una selección al azar de una superficie similar a la protegida por dicho sistema<sup>(46)</sup>. Otro cuestionamiento que surge es la subjetividad de los expertos para la definición de las áreas, aumentando la incertidumbre y el margen de error al no ser criterios repetibles y consistentes. Por otro lado, las ventajas están dadas por ser un método simple, rápido, muy flexible y relativamente sencillos de aplicar.

**Métodos cuantitativos:** Consisten en diferentes aproximaciones estadísticas, algoritmos y parámetros técnicos-científicos que ayudan a mejorar sustancialmente a cumplir con los principios de representatividad (muestra significativa de la variabilidad biológica), persistencia (supervivencia a largo plazo de las especies, mantener poblaciones viables y procesos naturales) y economía (ver la definición de eficiencia antes mencionada). Con este méto-

do se logra reducir la incertidumbre, presentando la propiedad de ser transparentes (comprensión del proceso de selección), universales, estandarizados y repetibles, criterios esenciales para que la planificación sea sistemática. Actualmente existe gran cantidad de software que permiten integrar información ambiental, biológica, física, social, económica, cultural y política de manera cuantitativa. A su vez se pueden generar modelos predictivos de los diferentes elementos de la biodiversidad, a diferentes escalas espacio-temporales. Estos métodos poseen varias limitaciones y críticas por parte de la comunidad científica a seguir: (1) presuponer que las especies están en equilibrio con las variables ambientales ingresadas; (2) ausencia de interacciones interespecíficas (depredación, competencia, polinización, parasitismo, etc.); (3) ausencia de componentes espaciales (por ejemplo, ocasionalmente la correlación espacial resulta de la existencia de asociaciones entre variables independientes) y componentes temporales (factores históricos, barreras geográficas actuales o pasadas, procesos de extinción o dispersión); (4) dificultad para generar predicciones confiables para especies generalistas; (5) sesgos de muestra; (6) dependencia de la escala espacial utilizada; y (7) los resultados varían entre los algoritmos (ver<sup>47,48</sup> para una revisión).

Una de las grandes críticas de este método es que rara vez los resultados son contrastados en el territorio dificultando la aplicabilidad de los mismos, quedando muchas veces remitidos al ámbito académico. Por otro lado, a pesar que los datos sobre los patrones de distribución espacial de las especies en la actualidad son abundantes y accesibles, y los software cada vez son más potentes, pocas veces son chequeados y depurados aumentando los errores de comisión, falsos positivos o sobrepredicción (elementos que no perteneciendo a una clase aparecen en ella) o errores de omisión o falsos negativos (elementos que perteneciendo a esa clase no aparecen en ella por estar erróneamente incluidos en otra).

La mejor experiencia se presenta cuando ambos métodos se conjugan en uno mixto, es decir la base de datos a utilizar, es chequeada por expertos, los algoritmos ajustados a la realidad del territorio y las áreas prioritarias propuestas son discutidas por diferentes actores involucrados en su ejecución.

Si la intención va más allá de solo presentar los resultados e interesa pensar en una planificación sistemática, tendiente a su implementación efectiva, se puede resumir de manera general todo el proceso en los siguientes pasos (para más detalles ver<sup>14,15</sup>):

1) *Identificación de los actores sociales involucrados en la conservación del lugar:* Los tomadores de decisión, comunidades, terratenientes, expertos regionales, los que disponen de recursos para el proceso y su ejecución.

2) *Compilación, evaluación y depuración de datos sobre biodiversidad y socioeconómicos*: Registros georeferenciados de especies, revisión exhaustiva de bibliografía sobre distribución espacial de las especies, revisión de colecciones biológicas, parámetros ambientales, datos socioeconómicos (uso y valor de la tierra), confección de nuevos inventarios de especies, catalogar aquellas especies focales, raras amenazadas y endémicas (Ver recomendaciones en: Confección de base de datos).

3) *Identificación de los sustitutos o subrogados de la biodiversidad*: Especies, elementos del paisaje, tipos de hábitat, etc. Necesariamente, esto involucra aceptar el supuesto de que su riqueza o abundancia está relacionada (**RELACIÓN COMPROBADA**) con la presencia de un gran número de especies de otros taxones conocidos y su protección promoverá la conservación de todo o gran parte del sistema (ver<sup>49-53</sup>). Actualmente, la manera de aumentar la eficiencia de los sustitutos es trabajar con indicadores multitaxonómicos.

4) *Establecimiento de los objetivos y las metas de conservación*: Definición de criterios explícitos medibles y susceptibles de evaluarse para la representación de los subrogados en las áreas prioritarias: riqueza, diversidad, rareza, endemismos y vulnerabilidad de especies, número y tamaño específico de poblaciones, porcentaje o cobertura espacial de los ensambles o categorías ambientales, sociales, económicos y políticos. Establecer criterios de diseño como conectividad, tamaño, dispersión, alineación, forma y replicación. Cuando se llega a este punto, el propósito para la priorización debe ser claro y consistente.

5) *Revisión de áreas de conservación preexistentes*: A pesar de los cuestionamientos sobre el sistema de ANP, los elementos representados en ellas no se deberían descartar. Sí bien no existen inventarios sistemáticos y completos para muchos grupos taxonómico para la mayoría de las ANP de Argentina, lo ideal es comenzar por un análisis de vacíos y omisiones en conservación de la biodiversidad con los datos disponibles. Este proceso determina los elementos que están ausentes, o representados de manera insuficiente en el sistema de ANP, y con base en ello se identifican nuevas áreas prioritarias.

6) *Priorización de nuevas áreas*: En esta etapa se complementan los objetivos y metas de conservación propuestos. En este punto resulta central aplicar el criterio de complementariedad antes mencionado e incorporar criterios de diseño.

7) *Análisis de riesgos, vulnerabilidad y persistencia de la biodiversidad*: En esta etapa se pueden desarrollar diferentes modelos matemáticos para estimar la viabilidad poblacional y garantizar la continuidad de los procesos ecológicos. También se puede evaluar la vulnerabilidad de las áreas detectadas a los factores externos.

8) *Repetición y ratificación del proceso de priorización desde la etapa 6.*

9) *Selección multicriterio de las áreas según la factibilidad de implementación:* Dentro de un proceso de optimización pueden resultar diferentes soluciones igualmente efectivas. En esta etapa se analiza la viabilidad de cada solución con diversos criterios (usos del suelo, criterios biológicos, diseño y ubicación de las áreas) y se eligen las mejores soluciones.

10) *Implementación del plan de conservación:* Decidir la categoría de conservación que se pretende adjudicar a cada área, preponderando en la ejecución aquellas que presenten mayor número de amenazas.

11) *Reevaluación periódica del sistema de áreas:* Monitorear la efectividad del plan y las acciones propuestas para sostener los criterios por lo cual fueron seleccionadas. Establecer umbrales de alarma.

Se puede agregar la necesidad de precisar claramente la escala geográfica donde se desarrollará el ejercicio de planeación. De esto dependerá el tipo de información que se logre obtener y la certeza brindada. Escalas biogeográficas grandes dan una idea de cuáles son las regiones donde focalizar los esfuerzos. Trabajar con unidades espaciales más pequeñas, permite instrumentar estrategias de conservación más concretas y adoptadas a nivel del paisaje.

Para detectar las áreas prioritarias para la conservación, cumplir con las 6 primeras etapas resulta fundamental, sobre todo definir de manera explícita los objetivos y las metas. Estas etapas representan el punto de partida para promover políticas públicas basadas en evidencia científica y destinar mejor los recursos financieros para su implementación.

En Argentina durante las dos últimas décadas, el ejercicio de priorización mostró notables avances a través de numerosas publicaciones. Sin embargo, la selección de áreas para conservar todavía se rige por criterios oportunistas.

Dentro del ámbito herpetológico la mayoría de los sustitutos elegidos fueron los escamados (serpientes y lagartos), registrándose pocos aportes sobre anfibios. En este sentido, esta ausencia representa una oportunidad de estudio para uno de los grupos más amenazados a nivel mundial.

### Caja 4.12.1 - Bases de datos

Javier Nori<sup>1</sup> & Eduardo Etchepare<sup>2</sup>

Las bases de datos de registros de ocurrencia de biodiversidad constituyen la materia prima a partir de la cual, entre otras cosas, es posible generar hipótesis de distribuciones de especies u otras entidades taxonómicas. En estas, los datos primarios sobre biodiversidad corresponden a información que describe ocurrencias. Son datos crudos que describen en su forma básica y lo menos interpretada posible, lo que ha sido observado o recolectado, cuándo y dónde sucedió<sup>(54)</sup>. Estos datos crudos primarios pueden estar acompañados por información adicional que proporcionan un mayor detalle. En general las bases de datos se presentan en forma de matriz o tabla en la cual cada celda represente un campo de información, cada fila representa a un registro de ocurrencia y cada columna representa información de distintas variables asociadas a cada registro (e.g. especie, familia, localidad de presencia, latitud, longitud, etc.).

Para la confección de la base de datos se puede recurrir a diferentes fuentes: (1) datos obtenidos del trabajo en campo, (2) resultados de la colecta directa que se encuentran depositados en las colecciones biológicas, (3) bases de datos en línea, (4) revisión exhaustiva y crítica de la literatura específica y (5) datos proporcionados por colaboradores.

En la actualidad existen inmensas bases de datos en repositorios online que son sumamente utilizadas. Un ejemplo es Global Biodiversity Information Facilities ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)), una organización internacional y una red de investigación financiada por gobiernos de todo el mundo, destinada a proporcionar a cualquier persona, en cualquier lugar, acceso abierto y gratuito a datos sobre cualquier tipo de forma de vida que hay en la Tierra. En el caso de usar dichos repositorios, se hace indispensable la existencia de información extra asociada a cada dato, la cual permita hacer un “depurado” de los datos y utilizar sólo aquellos registros más confiables. Existen protocolos recientes y aceptados en el ámbito científico como el propuesto por Maldonado et al.<sup>(55)</sup>. Entre esta información extra se debe valorar, por ejemplo:

**Fuente del registro:** Es necesario valorar si el dato primario corresponde a un registro de colección herpetológica o a una observación humana sin material de referencia.

**Colectores y Curadores:** Esto permite en muchos casos tener una idea certera sobre el grado de experticia de las personas que tomaron y curaron el registro en cuestión.

**Colección que alberga el material de referencia:** Si bien es arbitrario, esto puede dar una idea sobre la actualización taxonómica del registro en cuestión, y el acceso al material de los expertos en el grupo. En términos generales, es más confiable utilizar registros que

*proviene de colecciones cercanas a los expertos en los grupos taxonómicos analizados.*

**Año y persona encargada de determinación taxonómica:** *Esto da una idea bastante certera sobre la validez y grado de actualización del status taxonómico de información utilizada.*

*Los datos proporcionados por colaboradores se refieren a formar una red de personas (ej: guardaparques y pobladores de áreas cercanas al sitio de muestreo) previamente entrenadas en la toma y captación del dato. Es decir, se los capacita en cómo capturar un ejemplar en el caso de ser necesario (y sin correr riesgos), cómo tomar una fotografía, cuáles son los caracteres de importancia taxonómica que debe incluir la foto y datos adicionales necesarios para hacer el registro más confiable como: horario de actividad, lugar, coordenadas geográficas, etc. Esta red constituye una ayuda adicional muy valiosa, pero con mucho margen de error en el caso de no prestar particular atención a lo antes mencionado. A su vez, en este entrenamiento previo, los colaboradores pueden ser capacitados para conservar ejemplares que puedan encontrar muertos de manera accidental como son los atropellados en rutas y caminos. En este sentido, los celulares constituyen una buena herramienta, permitiendo a los colaboradores capturar imágenes de buena calidad e incorporar información en el mismo archivo como coordenadas geográficas, fecha y hora de la toma. Adicionalmente, se puede suministrar a los voluntarios escalas gráficas para ser utilizadas al momento de tomar la foto. Estos datos, pueden incluirse en la base de datos, siempre y cuando se confíe en la resolución de la imagen, cuenten con los requerimientos necesarios, y en la base de datos depurada se especifique su origen (datos adicionales). Uno de los problemas son los cambios en la clasificación taxonómica de las especies, que al no tener el material testigo no se podrá seguir utilizando este dato si los caracteres taxonómicos necesarios para diferenciarlos no pueden distinguirse en la imagen.*

*Sea cual fuere la fuente de datos, la confección final de la base de datos debe ser sometida a un proceso de integración, depuración, actualización y verificación de los registros recopilados. En este sentido y en función de la información asociada a cada registro, es posible hacer una interpretación de la calidad del mismo. Por ejemplo, para constatar y validar la existencia de un registro, en muchos casos estos están asociados a una evidencia directa (especímenes, archivos sonoros, imágenes, tejidos, huellas, etcétera) que constituyen el respaldo físico y que se alberga en colecciones biológicas, lo que garantiza que esa evidencia física perdure a largo plazo. En otros casos, existe evidencia indirecta (observaciones) realizadas y documentadas por especialistas lo que genera un registro, siendo el soporte de los últimos de menor calidad y ampliamente criticados en el ámbito científico<sup>(56)</sup>.*

*La calidad de un registro no depende sólo de su respaldo, sino además de la cantidad y precisión de la información asociada al mismo. En este sentido es importante aclarar que un dato puede ser de alta calidad para un propósito, pero de baja calidad para otro. Por*

*ejemplo, si un usuario quiere conocer qué especies se distribuyen en un municipio dado, los registros de ejemplares que contengan información sobre la región geográfica (país, estado, municipio) donde fueron recolectados u observados, son aptos para su uso y serán utilizados para generar el listado de especies presentes en el municipio. Si dicho usuario requiriera mayor precisión para ubicar los sitios de presencia de la especie en el municipio, los registros de ejemplares que no cuenten con una coordenada geográfica no serán aptos para utilizarse.*

*Por otra parte, ordenar de manera precisa la información ahorra tiempo al momento de utilizarla. Por ejemplo, en el proceso de validación de los datos, se puede encontrar de manera frecuente errores en las determinaciones taxonómicas, errores nomenclaturales, asignación de nombres que han sido sinonimizados, errores en los nombres de las localidades de colecta, falta de referencia geográfica y de información para asignar una georreferencia.*

*Cuando se finaliza la validación, un gran número de datos serán descartados, sin embargo se contará con una base de datos robusta, confiable y con un nivel de precisión que permitirá utilizarla en diferentes estudios con distintos objetivos.*

*Una recomendación para el momento de la confección de la base de datos es incluir la mayor cantidad de columnas posibles (familia, género, especie, coordenadas geográficas, localidad, municipio, provincia, país, colectores, origen de los datos colectados, foto, observación, bibliografía, colección, etc.).*

*Algunos cuestionamientos que se presentan al integrar información de distintas fuentes, es que los datos pudieron ser obtenidos mediante métodos no estandarizados y con esfuerzo variable (encuentros ocasionales, muestreo sesgado por el colector o la finalidad del inventario, correlación espacial, datos de museos de referencia que acaparan la información de un área, etc.), lo que puede provocar que determinadas especies, poblaciones y regiones geográficas sean sobrerrepresentadas, con una elevada cantidad de registros, y otras subrepresentadas. En este sentido, se pueden aplicar diferentes técnicas para determinar si los registros se encuentran concentrados en una localidad. Poder cuantificar el número de ejemplares colectados por localidad o fecha, dará una idea sobre el esfuerzo de muestreo en un área geográfica determinada; esto se puede acompañar por un diagrama de distribución de frecuencias. A su vez, se puede simplificar unificando la unidad de análisis a celdas, por ejemplo. Por otro lado, existen diferentes métodos de estimación del número de especies que indican la completitud de un inventario que pueden ayudar a determinar cuan completa está la base de datos en una región determinada<sup>(67,58)</sup>. Finalmente, se puede evaluar la distribución geográfica de todas las especies mediante la construcción de mapas de distribución con diferentes softwares GIS y prestar atención a los registros “outlier”, es decir a aquellos que sobresalen de manera anormal y extrema de la muestra*

o del patrón de distribución general. En particular el programa de uso libre QGIS ([www.qgis.org](http://www.qgis.org)), permite construir mapas de calor mediante el algoritmo densidad de núcleo o mapa de calor e identificar sitios de concentración de registros y sitios con vacíos de información que ayudará a dirigir los esfuerzos para obtener una base de datos representativa.

Un ejemplo donde se utiliza frecuentemente una base de datos es la construcción de modelos de nicho ecológico; para esto la precisión de la localización geográfica resulta de suma importancia. Dada la naturaleza correlativa de estos modelos, unos pocos kilómetros de error en la localización de un registro en un ambiente climáticamente heterogéneo (como un sitio de pendiente pronunciada), podría generar serios problemas en el ajuste y la salida de nuestro modelo<sup>(59)</sup>. Lógicamente esto es relativo a la heterogeneidad del ambiente habitado por la especie, así en un ambiente llano y climáticamente homogéneo un error de pocos kilómetros podría no generar serios problemas de ajuste en nuestro modelo. Así, resulta de suma importancia que el modelador valore en función del ambiente en que se modela y la especie en cuestión, la precisión geográfica requerida en su base de datos.

Del mismo modo, la existencia de material de referencia de un dato resulta de suma importancia en torno al modelado de nicho ecológico. La principal importancia de la existencia de este material depende de la posibilidad de revisarlo, y así poder constatar / validar / actualizar el status taxonómico de ese dato. Siendo que los modelos de nicho ecológico son prácticamente en su totalidad realizados a nivel de especie, es importante tener la posibilidad de validar el status taxonómico de la especie en caso de ser necesario. En este sentido, resulta importante también la presencia de material genético de referencia asociado al ejemplar, lo cual también podría darnos certezas sobre el status taxonómico de la especie en caso de ser necesario. En el caso de anfibios y reptiles de Argentina, esto resulta importante por la cantidad de arreglos taxonómicos, que se generan anualmente<sup>(60,61)</sup>.

Finalmente, la base de datos puede utilizarse en una gran variedad de análisis, por eso debe ser siempre dinámica, actualizada y continuamente sometida al proceso de validación, desarrollo que se puede acompañar con la consulta a especialistas en taxonomía y distribución espacial de determinados grupos taxonómicos.

<sup>1</sup> Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA-CONICET) and Centro de Zoología Aplicada, FCEfyN, Universidad Nacional de Córdoba, Rondeau 798, Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup> CONICET. Facultad Regional Concordia. Universidad Tecnológica Nacional. Salta 277. Concordia, Entre Ríos, Argentina.



## Bibliografía

1. Wilson, E.O. 1985. The biological diversity crisis. *BioScience* 35: 700-706.
2. Lugo, A.E. 1988. Estimating Reductions in Diversity of Tropical Forest Species: 17-39. *En: Wilson, E.O. & Peter, F.M. (eds.). Biodiversity. National Academy Press. Washington*
3. Leakey, R. & Lewin, R. 1997. The Sixth Extinction: patterns of life and the future of humankind. *Journal of Leisure Research* 29: 476.
4. Pimm, S.L.; Russell, G.J.; Gittleman, J.L. & Brooks, T.M. 1995. The future of biodiversity. *Science* 269: 347- 350.
5. Thomas, J.A.; Telfer, M.G.; Roy, D.B.; Preston, C.D.; Greenwood, J.J.D.; Asher, J.; ... & Lawton, J.H. 2004. Comparative losses of British butterflies, birds, and plants and the global extinction crisis. *Science* 303: 1879-1881.
6. Ceballos, G.; Garcia, A. & Ehrlich, P.R. 2010. The sixth extinction crisis. Loss of animal populations and species. *Journal of Cosmology* 8: 1821-1831.
7. Barnosky, A.D.; Matzke, N.; Tomiya, S.; Wogan, G.O.; Swartz, B.; Quental, T.B., ... & Ferrer, E.A. 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471: 51-57.
8. Ripple, W.J.; Wolf, C.; Newsome, T.M.; Galetti, M.; Alamgir, M.; Crist, E. ... & 15,364 scientist signatories from 184 countries. 2017. World scientists' warning to humanity: a second notice. *BioScience* 67: 1026-1028.
9. Ritchie, H. & Roser, M. 2020. CO<sup>2</sup> and Greenhouse Gas Emissions. Disponible en: <https://ourworldindata.org/co2-and-other-greenhouse-gas-emissions>. Último acceso: 15 de mayo de 2021.
10. WWF. 2020. Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss. Almond, R.E.A.; Grooten, M. & Petersen, T. (eds). WWF, Gland. Switzerland.
11. Soulé, M.E. & Wilcox, B.A. 1980. Conservation Biology: An Evolutionary Ecological Perspective. Sunderland, Mass. Sinauer.
12. Soulé, M.E. 1985. What is conservation biology? *BioScience* 35: 727-734.
13. Soulé, M.E. 1991. Conservation: tactics for a constant crisis. *Science* 253: 744-750.
14. Margules, C.R. & Pressey, R.L. 2000. Systematic conservation planning. *Nature* 405: 243-253.
15. Margules, C. & Sarkar, S. 2009. Planeación Sistemática de la Conservación. UNAM-Conabio. Mexico.
16. Csuti, B.; Polasky, S.; Williams, P.H.; Pressey, R.L.; Camm, J.D.; et al. 1997. A comparison of reserve selection algorithms using data on terrestrial vertebrates in Oregon. *Biological Conservation* 80: 83-97.
17. Balmford, A. 2002. Selecting Sites for Conservation: 74-104. *En: Norris, K. & Pain, D.J. (eds.). Conserving Bird Biodiversity. General Principles and their Application. Cambridge University Press. Cambridge, RU.*
18. Rodrigues, A.S.L. & Gaston, K.J. 2002. Optimization in reserve selection procedures-why not? *Biological Conservation* 107: 123-129.
19. Moilanen, A.; Franco, A.M.; Early, R.I.; Fox, R.; Wintle, B. & Thomas, C.D. 2005. Prioritizing multiple-use landscapes for conservation: methods for large multi-species planning problems. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences* 272: 1885-1891.
20. Fandiño-Lozano, M. & Van Wyngaarden, W. 2007. Focalize-Demo. User Manual. Grupo ARCO. Bogotá, Colombia. Disponible en: [www.grupoarco.info/productos.htm](http://www.grupoarco.info/productos.htm). Último acceso: 5 de mayo de 2021.
21. Vanderkam, R.P.D.; Wiersma, Y.F. & King, D.J. 2007. Heuristic algorithms vs. linear programs for designing efficient conservation reserve networks: Evaluation of solution optimality and processing time. *Biological Conservation* 137:349-358.
22. Ciarleglio, M.; Sarkar, S. & Barnes, J.W. 2008. ConsNet Manual Version, 1.0. University of Texas, Austin. Disponible en: [http://uts.cc.utexas.edu/~consbio/Cons/consnet\\_home.html](http://uts.cc.utexas.edu/~consbio/Cons/consnet_home.html). Último acceso: 5 de mayo de 2021.
23. Franklin, J. 2010. Mapping Species Distributions: Spatial Inference and Prediction. Cambridge University Press. New York.
24. Soberón, J. 2014. Commentary on ditch, stitch and pitch: the niche is here to stay. *Journal of Biogeography* 41: 414-417.
25. Ochoa-Ochoa, L.; Vázquez, L.B.; Urbina-Cardona, J.N. & Flores-Villela, O. 2009.

Priorización de Áreas para Conservación de la Herpetofauna Utilizando Diferentes Métodos de Selección: 89-107. *En*: Koleff, P. & Urquiza-Haas, T. (eds.). Planeación para la Conservación de la Biodiversidad Terrestre en México: Retos en un País Megadiverso. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. México.

26. Vélez, M.C. & Montoya, J.A. 2007. Metaheurísticos: una alternativa para la solución de problemas combinatorios en administración de operaciones. *Revista Eia* 8: 99-115.
27. Shafer, C.L. 1999. National park and reserve planning to protect biological diversity: Some basic elements. *Landscape and Urban Planning* 44: 123-153.
28. Groves, C.R.; Jensen, D.B.; Valutis, L.L.; Redford, K.H.; Shaffer, M.L.; et al. 2002. Planning for biodiversity conservation: Putting conservation science into practice. *BioScience* 52: 499 -512.
29. Margules, C.R.; Pressey, R.L. & Williams, P.H.. 2002. Representing biodiversity: Data and procedures for identifying priority areas for conservation. *Journal of Biosciences* 27: 309-326.
30. Cowling, R.M. & Pressey, R.L. 2003. Reserve selection algorithms and the real world. *Conservation Biology* 15: 275-277.
31. Razola, I.; Rey Benaya, J.M.; de la Montaña, E. & Cayuela, L. 2006. Selección de áreas relevantes para la conservación de la biodiversidad. *Ecosistemas* 15: 34-41.
32. Ceballos, G.; Díaz-Pardo, E.; Espinosa, H.; Flores-Villela, O.; García, A.; Martínez, L., ... & Santos-Barrera, G. 2009. Zonas críticas y de alto riesgo para la conservación de la biodiversidad de México. *Capital natural de México* 2: 575-600.
33. March, I.J.; Carvajal, M.A.; Vidal, R.M.; San Román, J.E. & Ruiz, G. 2009. Planificación y Desarrollo de Estrategias para la Conservación de la Biodiversidad: 545-573. *En*: Sarukhán, J. (ed.), *Capital Natural de México vol. II: Estado de Conservación y Tendencias de cambio*. Conabio. México, D.F.
34. Koleff, P. & Urquiza-Haas, T. 2011. Planeación para la Conservación de la Biodiversidad Terrestre en México: Retos en un País Megadiverso. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad—Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. México, D.F.
35. Darbyshire, I.; Anderson, S.; Asatryan, A.; Byfield, A.; Cheek, M.; Clubbe, C.; ... & Radford, E.A. 2017. Important Plant Areas: revised selection criteria for a global approach to plant conservation. *Biodiversity and Conservation* 26: 1767-1800.
36. Giraudo, A.R. & Arzamendia, V. 2018. Descriptive bioregionalisation and conservation biogeography: what is the true bioregional representativeness of protected areas? *Australian Systematic Botany* 30: 403-413.
37. Sarquis, A. 2018. Conservación de la avifauna de Entre Ríos (Argentina): uso de métodos biogeográficos y de optimización para evaluar la efectividad de las áreas protegidas. Tesis doctoral. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11185/1122>. Última consulta: 1 de junio de 2021.
38. Andrade-Díaz, M.S.; Sarquis, J.A.; Loiselle, B.A.; Giraudo, A.R. & Díaz-Gómez, J.M. 2019. Expansion of the agricultural frontier in the largest South American Dry Forest: Identifying priority conservation areas for snakes before everything is lost. *PloS One* 14: e0221901.
39. Cristaldi, M.A.; Sarquis, J.A.; Arzamendia, V.; Bellini, G.P. & Giraudo, A.R. 2019. Human activity and climate change as determinants of spatial prioritization for the conservation of globally threatened birds in the southern Neotropic (Santa Fe, Argentina). *Biodiversity and Conservation* 28: 2531-2553.
40. de Castro Pardo, M.; Martínez, P.F.; Martínez, J.M.G. & Martín, J.M.M. 2020. Modelling natural capital: A proposal for a mixed multi-criteria approach to assign management priorities to ecosystem services. *Contemporary Economics* 14: 22-38.
41. Martín, G.M.; González, B. & Monjeau, A. 2021. Continental assessment of South American marsupial conservation priorities: A methodological approach using a spatially explicit conservation indicator. *Biological Conservation* 256: 109045.
42. Arzamendia, V. & Giraudo, A.R. 2004. Usando patrones de biodiversidad para la evaluación y diseño de áreas protegidas: las serpientes de la provincia de Santa Fe (Argentina) como ejemplo. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 335-348.

43. Giraudo, A.R.; Krauczuk, E.R.; Arzamendia, V. & Povedano, H. 2005. Análise Crítica das Áreas Protegidas na Mata Atlântica da Argentina: 245-261. *En: Galindo-Leal, C. & Gusmão Câmara (eds.). Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas.* Fundação SOS Mata Atlântica. Belo Horizonte.
44. Gil, G. & Moreno, C.E. 2007. Los Análisis de Complementariedad Aplicados a la Selección de Reservas de la Biosfera: Efecto de la Escala: 63-70. *En: Halffter, G.; Guevara, S. & Melic, A. (eds.). Hacia una Cultura de Conservación de la Diversidad Biológica.* Monografías Tercer Milenio, S.E.A. Zaragoza.
45. Etchepare, E.G.; Giraudo, A.R.; Arzamendia, V.; Bellini, G.P. & Álvarez, B.B. 2017. Eficiencia de las unidades de conservación definidas en la Reserva Natural Iberá (Argentina) en la protección de la diversidad de reptiles. *Iheringia. Série Zoologia* 107: e2017011
46. Rebelo, A.G. & Siegfried, W.R. 1992. Where should nature reserves be located in the Cape Floristic Region, South Africa? Models for the spatial configuration of a reserve network aimed at maximizing the protection of floral diversity. *Conservation Biology* 6: 243-252.
47. Elith, J.; Graham, H.; Anderson, R.P.; Dudik, M.; Ferrier, S.; Guisan, A.; Hijmans, R.J.; Huettmann, F.; Leathwick, J.R.; Lehmann, A.; et al. & Zimmermann, N.E. 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129-151.
48. Mateo, R.; Felicísimo, A. & Muñoz, J. 2011. Modelos de distribución de especies: Una revisión sintética. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 217-240.
49. Noss, R.F. 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology* 4: 355-364.
50. Dale, V.H. & Beyeler, S.C. 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecological Indicators* 1: 3-10.
51. Moore, J.L.; Balmford, A.; Brooks, T.; Burgess, N.D.; Hansen, L.A.; Rahbek, C.; & Williams, P.H. 2003. Performance of sub-Saharan vertebrates as indicator groups for identifying priority areas for conservation. *Conservation Biology* 17: 207-218.
52. Moreno, C.E.; Sánchez-Rojas, G.; Pineda, E. & Escobar, F. 2007. Shortcuts for biodiversity evaluation: a review of terminology and recommendations for the use of target groups, bioindicators and surrogates. *International Journal of Environment and Health* 1: 71-86.
53. Grantham, H.S.; Pressey, R.L.; Wells, J.A. & Beattie, A.J. 2010. Effectiveness of biodiversity surrogates for conservation planning: different measures of effectiveness generate a kaleidoscope of variation. *PLoS One* 5: e11430.
54. Soberón, J.; Jiménez, R.; Koleff, P. & Golubov, J. 2010. La Informática sobre la Biodiversidad: Datos, Redes y Conocimiento. *En: Toledo, V.M. (ed.). La Biodiversidad de México.* Fondo de Cultura Económica, México.
55. Maldonado, C.; Molina, C.I.; Zizka, A.; Persson, C.; Taylor, C.M.; Albán, J.; Chilquillo, E.; Rønsted, N. & Antonelli, A. 2015. Estimating species diversity and distribution in the era of Big Data: to what extent can we trust public databases? *Global Ecology and Biogeography* 24: 973-984.
56. Gutiérrez, E.E. & Pine, R.H. 2017. Specimen collection crucial to taxonomy. *Science* 355: 1275.
57. Moreno, C.E. 2001. Métodos para Medir la Biodiversidad. M&T—Manuales y Tesis SEA,
58. Pineda-López, R. 2019. Estimadores de la Riqueza de Especies. *En: Moreno, C.E. (ed.). La Biodiversidad en un Mundo Cambiante: Fundamentos Teóricos y Metodológicos para su Estudio.* Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo/Libermex, Ciudad de México.
59. Peterson, A.T.; Soberón, J.; Pearson, R.G.; Anderson, R.P.; Martínez-Meyer, E.; Nakamura, M. & Araujo, M.B. 2011. *Ecological Niches and Geographic Distributions (MPB-49).* Princeton University Press.
60. Faivovich, J.; Nicoli, L.; Blotto, B.L.; Pereyra, M.O.; Baldo, D.; Barrionuevo, J.S.; Fabrezi, M.; Wild, E.R. & Haddad, C.F.B., 2014. Big, bad, and beautiful: Phylogenetic relationships of the Horned Frogs (Anura: Ceratophryidae). *South American Journal of Herpetology* 9: 207-227.
61. Lobo, F.; Barrasso, D.A.; Paz, M. & Basso, N.G. 2018. Phylogenetic relationships within a patagonian clade of reptiles (Liolaemidae: *Phymaturus*) based on DNA sequences and morphology. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 56: 549-569.

## 4.13 CIENCIA CIUDADANA: MÁS QUE UNA HERRAMIENTA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

**Camila Deutsch<sup>1,2</sup> & Gabriela Agostini<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires. Grupo de Estudios sobre Biodiversidad en Agroecosistemas. Ciudad Universitaria, Pabellón II. Güiraldes 2160, C1428EGA, CABA, Argentina.

<sup>2</sup> COANA, Conservación de Anfibios en Agroecosistemas, La Plata, Argentina.

Como su nombre lo indica, la ciencia ciudadana (CC) relaciona dos conceptos: la investigación científica y la participación ciudadana<sup>(1)</sup>. Este enfoque implica la intervención de voluntarixs no profesionales en la recopilación de datos con fines científicos<sup>(1-4)</sup>. Los proyectos de CC no solo benefician a lxs científicxs que obtienen datos de grandes extensiones geográficas durante largos periodos de tiempo, sino que también lxs participantes adquieren conocimientos sobre los organismos que observan a la vez que se comprometen y sensibilizan sobre diversas problemáticas ambientales<sup>(5,6)</sup>. Aunque la CC es considerada frecuentemente como una metodología de aparición reciente, hace más de doscientos años, disciplinas como la arqueología, la astronomía y la biología, han construido conocimiento nutriéndose de observaciones y datos colectados por “científicxs ciudadanxs”<sup>(3,7,8)</sup>. Sin embargo, la característica principal que diferencia a la CC moderna de su forma histórica es que se trata de una actividad accesible a una amplia mayoría y no solo a un grupo selecto<sup>(3)</sup>. En las últimas dos décadas, la relativa facilidad de acceso a internet y el desarrollo de aplicaciones para dispositivos móviles han incrementado la visibilidad y potenciado los proyectos de CC, lo cual se ha visto reflejado en el creciente número de artículos científicos que emplean esta herramienta<sup>(9,10)</sup>. Probablemente, uno de los primeros proyectos de CC haya sido el Christmas Bird Count en el 1900 en los Estados Unidos, para el cual voluntarixs se reunían con el fin de realizar censos de aves<sup>(3,8)</sup>. De esta manera, muchos proyectos iniciaron con el simple objetivo de coleccionar información a una mayor escala espacio-temporal y a bajo costo. Sin embargo, en la actualidad, los usos y aplicaciones que se pueden alcanzar con el enfoque de CC se han expandido y diversificado<sup>(3,10,11)</sup>.

Con el objetivo de generar una descripción más completa del campo de la CC, Wiggins y Crowston<sup>(12)</sup> examinaron una amplia variedad de proyectos y los agruparon en cinco categorías que se distinguen básicamente por la aplicación y el alcance de los datos recabados. De esta manera, pueden distinguirse aquellos proyectos aplicados en investigación, en conservación, en acción, en educación y virtuales<sup>(12)</sup>. En los proyectos aplicados a la investigación, los voluntarixs proporcionan a lxs investigadorxs grandes cantidades de datos que contribuyen a los objetivos de las investigaciones y al seguimiento y gestión de los recursos naturales a largo plazo. Por su parte, los proyectos aplicados en conservación abordan cuestiones relativas a la gestión del medio ambiente, fomentando la tutela de los ciudadanos y la sensibilización a través de proyectos educativos. Los proyectos aplicados en acción fomentan la intervención de los participantes en problemáticas locales, utilizando la investigación científica como herramienta para apoyar la agenda ambiental. Este tipo de CC emplea metodologías “bottom up”, para las cuales los proyectos no son concebidos ni planificados por científicos,

si no por ciudadanos. En los proyectos aplicados a la educación, el foco no está puesto en la recolección de datos sino en trabajar y en sensibilizar a la sociedad desde el enfoque de la CC<sup>(13,14)</sup>. De esta manera, educadores, estudiantes y científicos llevan a cabo en conjunto, proyectos de CC que tienen como primer objetivo difundir y concientizar a lxs participantes sobre alguna problemática ambiental. Finalmente, los proyectos virtuales tienen un objetivo similar al de los aplicados en investigación, con la diferencia de que la producción y validación del conocimiento científico está mediada principalmente por la participación en línea.

Se han desarrollado proyectos de CC aplicados a la investigación que monitorean una amplia diversidad de organismos<sup>(15)</sup>. Como se mencionó anteriormente, algunos de los más antiguos y conocidos a nivel mundial son aquellos que se focalizan en aves como eBird<sup>(16)</sup>, la United States Breeding Bird Survey<sup>(17)</sup> y Christmas Bird Count<sup>(18)</sup>. A pesar del éxito de las contribuciones a la ornitología, el uso de CC en herpetología ha sido limitado<sup>(15)</sup>. Las razones que explican este fenómeno pueden ser deducidas con facilidad. Por un lado, la mayoría de las especies de anfibios y reptiles no son carismáticas, son crípticas y desconocidas para el público general, y muchas otras son temidas y despreciadas<sup>(19,20)</sup> limitando la participación ciudadana en estos proyectos<sup>(15,21)</sup>. Particularmente, los anfibios son difíciles de detectar para un público no experto ya que la mayoría de las especies tienen actividad nocturna y sus picos de actividad se relacionan a momentos de lluvias. Sin embargo, existen varios proyectos de ciencia participativa que registran datos de biodiversidad a escala global e incluyen a los anfibios entre un gran número de taxa (e.g. iNaturalist) y también es incipiente el uso de enfoques de CC para recabar información sobre anfibios y reptiles específicamente<sup>(15,22-25)</sup>. Un ejemplo concreto es el Global Amphibian BioBlitz creado en 2011 a través de la plataforma iNaturalist, y que hasta la fecha ha registrado más de 4500 especies de anfibios en todo el mundo.

Gran parte de los programas de CC que recolectan datos a nivel de especies, tienen como objetivo identificar la distribución, la abundancia y tendencias poblacionales<sup>(26-29)</sup>. De esta forma, numerosas experiencias alrededor del mundo han aplicado esta metodología en modelados de distribución de especies nativas<sup>(30-35)</sup> y exóticas<sup>(36,37)</sup>. Además, la CC ha realizado importantes contribuciones en el marco de investigaciones orientadas a explorar el efecto de modificaciones antrópicas sobre anfibios como causantes de declinaciones poblacionales y extinciones<sup>(38)</sup>. Por ejemplo, varios trabajos han explorado el efecto de las rutas y caminos en las poblaciones de anfibios basándose en datos obtenidos de proyectos de CC<sup>(39-42)</sup>. Asimismo, se han utilizado estas fuentes de datos para indagar acerca del efecto de la modificación del há-

bitat<sup>(38)</sup>, cambios en el uso de la tierra<sup>(43)</sup> y la prevalencia de enfermedades emergentes sobre poblaciones de anfibios<sup>(44)</sup>. También la CC puede ser utilizada para abordar conflictos de coexistencia entre humanos y fauna<sup>(19,45)</sup> y como una poderosa herramienta en proyectos de conservación<sup>(7,13,46-51)</sup>.

Para el planeamiento de programas de CC existe una extensa literatura la cual facilita las etapas de diseño e implementación<sup>(2,14,52)</sup> que además permite maximizar los resultados y obtener datos de calidad<sup>(1,53)</sup>. Varios de estos autores acuerdan en la necesidad de corroborar la calidad y exactitud de los datos a través de protocolos estandarizados de verificación. En este sentido, Baker y colaboradores<sup>(54)</sup> realizaron un análisis exhaustivo de los distintos esquemas de verificación empleados en proyectos de CC y presentan alternativas novedosas para la verificación de datos.

## Antecedentes en Sudamérica

El enfoque participativo de la CC ha tenido un escaso desarrollo y aplicación en Sudamérica hasta la primera década del 2000<sup>(9)</sup>. Siguiendo la tendencia global, la amplia mayoría de los proyectos de CC o estudios que incorporaron datos provenientes de ciencia participativa en Latinoamérica se focalizan en especies carismáticas (mamíferos y aves)<sup>(55,56)</sup>. Recientemente, el lanzamiento y promoción de plataformas que promueven la participación ciudadana en la recolección de datos y registros a nivel regional (e.g. ArgentiNat; Ecoregistros, iNaturalist) han logrado alentar la búsqueda e inclusión de registros de biodiversidad, entre ellos, anfibios.

Durante los últimos años surgieron en Sudamérica proyectos focalizados en este grupo de vertebrados que involucran a la CC con objetivos educativos, de investigación y de conservación. En la Reserva Nacional de Junín (Perú) el Grupo Rana (<https://www.gruporana.org/>) implementa un programa de CC para obtener registros de dos anfibios amenazados: la Rana de Junín y la Wancha de Junín (*Telmatobius macrostomus* y *Telmatobius brachydactylus*, respectivamente) centrando sus actividades en la educación ambiental, incluyendo salidas de campo para estudiantes locales y adultos de comunidades campesinas<sup>(57)</sup>. En Chile se está empleando esta metodología en varios proyectos. Uno de ellos lo impulsa la ONG Ranita de Darwin (<https://www.ranitadedarwin.org/observa-ranas>) con un proyecto de CC llamado “Observa Ranas” que busca recopilar información de los anfibios chilenos invitando a la comunidad a inscribirse como científicxs voluntarixs y proporcionar sus registros utilizando una página web. El proyecto de investigación Rana Africana (*Xenopus laevis*) (<https://www.instagram.com/proyectoranaafricana/>) es otro ejemplo, aunque el foco está puesto en una especie exótica.

En Argentina esta metodología ha sido escasamente explorada como una herramienta para el muestreo de anfibios<sup>(30)</sup> y en la actualidad solo tres proyectos de CC se encuentran activos. El proyecto Rana Andina Austral (<https://www.instagram.com/proyectoranaandinaaustral/>) ha impulsado un programa de CC con el objetivo de reunir registros de la Rana Andina (*Telmatobius contrerasi*), una especie que no es detectada en el país desde el año 2005. Otra iniciativa de CC vigente está a cargo de Save the Frogs Buenos Aires (<https://www.facebook.com/buenosairesstf/>) bajo el nombre de “Anfibios de la Ciudad de Buenos Aires” cuyo principal objetivo es motivar el registro de especies de anfibios en las reservas y áreas verdes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Además, se busca promover en la ciudadanía la valoración de la anfibiafauna de la Ciudad de Buenos Aires, reconocer sitios de importancia para la conservación de anfibios, y aportar a la realización de inventarios y monitoreos en sitios de importancia. En este caso, el proyecto “Anfibios de la Ciudad de Buenos Aires” realiza el relevamiento a través de la plataforma de iNaturalist (<https://www.inaturalist.org/>) donde los usuarios (observadores), previamente registrados, cargan desde la página web o aplicación móvil observaciones directas (fotos y audios). La información que se recaba de cada registro incluye fotografías, videos o audios, jerarquía taxonómica, nombre del lugar donde se realizó la observación (se puede cargar manualmente con datos de georreferenciación), fecha y hora del registro, origen del individuo (silvestre o cautiverio), estadios (adulto, juvenil, larva o huevo), sexo y comportamiento del individuo. Hasta el momento, la iniciativa cuenta con 29 observadores de los cuales 15 han aportado en los últimos dos años más de 80 registros confirmados (12 especies, 7 géneros y 4 familias de anuros) en el área de la Ciudad de Buenos Aires. Regularmente los miembros del proyecto realizan charlas con la finalidad de difundir y enseñar a usar la aplicación móvil. El intenso trabajo a través de las redes y las notas de divulgación resultan herramientas claves para generar el compromiso de los ciudadanos y motivarlos a participar (Maruscak, com. pers.). Adicionalmente, en el 2020 a través de un trabajo colaborativo entre la escuela Northfields y Save the Frogs Buenos Aires se generó un proyecto de observación y registro llamado “Anfibios de Tigre y Escobar” que motivó el registro de anfibios de la zona por parte de los estudiantes de la institución<sup>(58)</sup>.

En el marco de la iniciativa COANA (<https://www.coana.com.ar/>) el proyecto “Gigante de las Pampas”<sup>(59)</sup> coordina el tercer programa de CC focalizado en una especie de anfibio, vigente hasta el momento en Argentina (ver **Sección 6.3 Gigante de las Pampas**).



### Caja 4.13.1 - Publicación y comunicación de resultados negativos

*Dado que las normas internacionales de publicación en revistas/libros científicos priorizan resultados novedosos y positivos, resulta limitada la información proveniente de investigaciones o proyectos con abordajes de CC que no resultaron exitosos<sup>(60)</sup>. En este sentido, cuando los proyectos de CC no logran los resultados esperados, las experiencias no son publicadas ni en revistas científicas ni en ningún otro formato, limitando ampliamente la información disponible sobre experiencias no replicables, personal necesario, herramientas de comunicación, grupos objetivo y grupos de investigación involucrados. Resulta necesario comenzar a desarrollar nuevas formas de comunicar los resultados de las experiencias de CC, ya sean positivos o negativos, para propiciar escenarios posibles en que los proyectos de CC puedan desarrollarse. A nivel global, pueden utilizarse sistemas de información de ciencia abierta y participativa<sup>(60)</sup> como la Open Science Framework (<https://osf.io/>) y a nivel regional la Red Iberoamericana de Ciencia Participativa (<http://cienciaparticipativa.net/>) que ofrecen un espacio alternativo para hacer visibles nuestros trabajos y experiencias.*

## Tips para un proyecto de CC exitoso en Argentina

Muchos trabajos han publicado valiosa información y recomendaciones generales para llevar a cabo un proyecto de CC exitoso. Para ello se recomienda ampliamente consultar los siguientes autores: Conrad y Hilchey<sup>(53)</sup>; Vohland y colaboradorxs<sup>(52)</sup>; Rutten y colaboradorxs<sup>(61)</sup>. Sin embargo, se observa una crítica falta de publicaciones con herramientas para mejorar la participación y establecer programas de CC en los países en vías de desarrollo<sup>(62)</sup>. Haciendo una breve revisión de lo publicado hasta el momento y sumando lo aprendido por experiencia, se presenta una breve lista de tips orientados a la implementación de programas de CC para el estudio de anfibios en Argentina.

- **Complemento de formatos para la obtención de datos.** Como se expuso anteriormente, el limitado acceso a internet en muchos lugares del mundo y de nuestro país en particular, obliga a incorporar herramientas alternativas a las más ampliamente utilizadas como las aplicaciones móviles y las plataformas web<sup>(63)</sup>. En este sentido, la implementación de encuestas presenciales puede incrementar sustancialmente la eficacia de la estrategia de CC en áreas con baja accesibilidad a internet<sup>(62)</sup>.

- **Promoción de los proyectos de CC a través de actividades educativas y de comunicación.** La motivación y predisposición de la ciudadanía a las propuestas de CC son un factor clave para el éxito de los proyectos. A la hora de plantear la estrategia de un programa de CC se debe contemplar en el diseño, una importante inversión de recursos humanos y tiempo en la promoción de la iniciativa con los miembros de la ciudadanía. Aunque es posible que los fondos destinados a las actividades de comunicación sean significativamente menores a los costos que implica una campaña de campo, debe ser considerada una inversión monetaria para impresión de cartelería, folletería y visita a localidades remotas. Fundamentalmente en las primeras etapas del proyecto, estas actividades de comunicación resultan importantes para dar a conocer el proyecto en aquellas localidades de mayor interés<sup>(14,46)</sup>. Para ello, se pueden utilizar diversos medios de comunicación, desde comunicados de prensa y artículos de revistas, hasta folletos y presentaciones<sup>(14)</sup>. La articulación con entidades educativas y el desarrollo de talleres o cursos resulta esencial para generar un vínculo más estrecho con la comunidad. Esto se ve potenciado aún más en comunidades campesinas o aborígenes donde la escuela tiene un rol primordial como punto de congregación y encuentro de la población. La estrategia de reclutamiento de científicxs ciudadanxs puede ser general o dirigida a algún grupo específico dentro de la comunidad<sup>(46)</sup>. En este último caso, es importante que los métodos de comunicación se ajusten a la audiencia deseada<sup>(14)</sup>.
- **Herramientas de Marketing.** Logos, slogans, juegos y productos pueden atraer y mantener la participación de lxs ciudadanxs sobre todo en programas de CC que trabajan con especies no carismáticas<sup>(64,65)</sup>.
- **Reclutamiento/Identificación de replicadores locales.** La evidencia indica que la identificación, apoyo y compromiso de actores locales es un factor clave para el éxito de una estrategia de CC<sup>(66)</sup>. En el caso de comunidades pequeñas y aisladas (e.g. con baja accesibilidad a internet), la identificación de actores clave de la sociedad que puedan replicar las actividades del programa de CC, es fundamental para mantener en vigencia las actividades, generar lazos con las comunidades y alentar la participación de lxs pobladorxs. Los mejores ejemplos de actores clave son lxs docentes, funcionarixs públicos locales y naturalistas aficionados. Adicionalmente, si éstxs colaboradorxs reciben capacitaciones y el entrenamiento necesario pueden, eventualmente, desenvolverse en monitoreos continuos de las especies apoyando las tareas de campo de lxs investigadorxs.

- **Intercambio constante con lxs participantes.** Ningún programa de CC llevado a cabo en territorio será exitoso si no se logran vínculos estrechos y sostenidos en el tiempo con las comunidades. La generación de vínculos sólidos incluye, entre otras cosas, la posibilidad de brindar una respuesta rápida y efectiva a las consultas que surjan de lxs ciudadanxs participantes.

## Bibliografía

1. Brown, E.D. & Williams, B.K. 2019. The potential for citizen science to produce reliable and useful information in ecology. *Conservation Biology* 33: 561-569.
2. Shirk, J.L.; Ballard, H.L.; Wilderman, C.C.; Phillips, T.; Wiggins, A.; Jordan, R.; McCallie, E.; Minarchek, M.; Lewenstein, B.V.; Krasny, M.E. & Bonney, R. 2012. Public participation in scientific research: a framework for deliberate design. *Ecology and Society* 17: 29.
3. Silvertown, J. 2009. A new dawn for citizen science. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 467-471.
4. Trumbull, D.J.; Bonney, R.; Bascom, D. & Cabral, A. 2000. Thinking scientifically during participation in a citizen-science project. *Science education* 84: 265-275.
5. Frigerio, D.; Richter, A.; Per, E.; Pruse, B. & Vohland, K. 2021. Citizen Science in the Natural Sciences: 79-96. *En: Vohland, K.; Land-Zandstra, A.; Ceccaroni, L.; Lemmens, R.; Perelló, J.; Ponti, M.; Samson, R. & Wagenknecht, K. (eds.). The Science of Citizen Science.* Springer, Cham, Suiza.
6. Noordwijk, T.C.G.E.; Bishop, I.; Staunton-Lamb, S.; Oldfield, A.; Loisele, S.; Geoghegan, H. & Ceccaroni, L. 2021. Creating Positive Environmental Impact Through Citizen Science: 373-395. *En: Vohland, K.; Land-Zandstra, A.; Ceccaroni, L.; Lemmens, R.; Perelló, J.; Ponti, M.; Samson, R. & Wagenknecht, K. (eds.). The Science of Citizen Science.* Springer, Cham, Suiza.
7. Oberhauser, K. & Prysby, M.D. 2008. Citizen science: creating a research army for conservation. *American Entomologist* 54: 103-104.
8. Miller-Rushing, A.; Primack, R. & Bonney, R. 2012. The history of public participation in ecological research. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10: 285-290.
9. Bonney, R.; Shirk, J.L.; Phillips, T.B.; Wiggins, A.; Ballard, H.L.; Miller-Rushing, A.J. & Parrish, J.K. 2014. Next steps for citizen science. *Science* 343: 1436-1437.
10. Dickinson, J.L.; Shirk, J.; Bonter, D.; Bonney, R.; Crain, R.L.; Martin, J.; Phillips, T. & Purcell, K. 2012. The current state of citizen science as a tool for ecological research and public engagement. *Frontiers in Ecology and the Environment* 10:291-297.
11. Pocock, M.J.; Tweddle, J.C.; Savage, J.; Robinson, L.D. & Roy, H.E. 2017. The diversity and evolution of ecological and environmental citizen science. *PLOS ONE* 12: e0172579.
12. Wiggins, A. & Crowston, K. 2011. From Conservation to Crowdsourcing: A Typology of Citizen Science. *En: Proceedings of the 44th Annual Hawaii International Conference on Systems Sciences*, Koloa, Hawaii.
13. Bela, G.; Peltola, T.; Young, J. C.; Balázs, B.; Arpin, I.; Pataki, G.; Hauck, J.; Kelemen, E.; Kopperoinen, L.; Van Herzele, A.; Keune, H.; Hecker, S.; Suskevics, M.; Roy, H.E.; Itkonen, P.; Kulvik, M.; Laszlo, M.; Basnou, C.; Pino, J. & Bonn, A. 2016. Learning and the transformative potential of citizen science. *Conservation Biology* 30: 990-999.
14. Bonney, R.; Cooper, C.R.; Dickinson, J.; Kelling, S.; Phillips, T.; Rosenberg, K.V. & Shirk, J. 2009. Citizen science: a developing tool for expanding science knowledge and scientific literacy. *BioScience* 59:977-984.
15. Price, S.J. & Dorcas, M.E. 2011. The Carolina Herp Atlas: an online, citizen-science approach to document amphibian and reptile occurrences. *Herpetological Conservation and Biology* 6: 287-296.
16. Sullivan, B.L.; Aycrigg, J.L.; Barry, J.H.; Bonney, R.E.; Bruns, N.; Cooper, C.B... & Kelling, S. 2014. The eBird enterprise: An integrated approach to development and application of citizen science. *Biological Conservation* 169: 31-40.

17. Sauer, J.R.; Link, W.A.; Fallon, J.E.; Pardieck, K.L. & Ziolkowski, Jr.D.J. 2013. The North American Breeding Bird Survey 1966-2011: summary analysis and species accounts. *North American Fauna* 79: 1-32.
18. LeBaron, G. 2009. The 109th Christmas Bird Count. *American Birds* 63: 2-7.
19. Deutsch, C.; Grisolia, J.; Bilenca, D. & Agostini, M.G. 2021. Human attitudes as threats in amphibians: the case of the Ornate Horned Frog (*Ceratophrys ornata*). *Human Dimensions of Wildlife* 26: 210-227.
20. Frynta, D.; Peléšková, Š.; Rádlová, S.; Janovcová, M. & Landová, E. 2019. Human evaluation of amphibian species: A comparison of disgust and beauty. *The Science of Nature* 106: 1-19.
21. Vergara-Ríos, D.; Montes-Correa, A.C.; Urbina-Cardona, J.N.; De Luque-Villa, M.A.; Cattán, P.E. & Granda, H.D. 2020. Local community knowledge and perceptions towards amphibians in urban and rural settings: Tools for biological conservation. *Square Research* 1-20.
22. Lee, T.S.; Kahal, N.L.; Kinas, H.L.; Randall, L.A.; Baker, T.M.; Carney, V.A.; Kendell, K.; Sanderson, K. & Duke, D. 2021. Advancing Amphibian Conservation through Citizen Science in Urban Municipalities. *Diversity* 13: 1-15.
23. Marsh, D.M. & Cosentino, B.J. 2019. Causes and consequences of non-random drop-outs for citizen science projects: lessons from the North American amphibian monitoring program. *Freshwater Science* 38: 292-302.
24. Pittman, S.E. & Dorcas, M.E. 2006. Catawba River corridor coverboard program: a citizen science approach to amphibian and reptile inventory. *Journal of the North Carolina Academy of Science* 142-151.
25. Rowley, J.J.; Callaghan, C.T.; Cutajar, T.; Portway, C.; Potter, K.; Mahony, S.; Trembath, D.F.; Flemmons, P. & Woods, A. 2019. FrogID: Citizen scientists provide validated biodiversity data on frogs of Australia. *Herpetological Conservation and Biology* 14: 155-170.
26. Devictor, V.; Whittaker, R.J. & Beltrame, C. 2010. Beyond scarcity: citizen science programmes as useful tools for conservation biogeography. *Diversity and Distributions* 16: 354-362.
27. Feldman, M.J.; Imbeau, L.; Marchand, P.; Mazerolle, M.J.; Darveau, M. & Fenton, N.J. 2021. Trends and gaps in the use of citizen science derived data as input for species distribution models: A quantitative review. *PLoS ONE* 16: e0234587.
28. Howard, E.; Aschen, H. & Davis, A.K. 2010. Citizen science observations of monarch butterfly overwintering in the southern United States. *Psyche: A Journal of Entomology* 1-6.
29. Pocock, M.J. & Evans, D.M. 2014. The success of the horse-chestnut leaf-miner, *Cameraria ohridella*, in the UK revealed with hypothesis led citizen science. *PLOS ONE* 9: e86226.
30. Deutsch, C.; Bilenca, B. & Agostini, G. 2017. In search of the horned frog (*Ceratophrys ornata*) in Argentina: complementing field surveys with citizen science. *Herpetological Conservation and Biology* 12: 664-672.
31. Hoyos, D.A.G.; Molina, W.H.; Rafael, M. & Méndez-Arrieta, A. La Rana Lechera (*Trachycephalus typhonius*) en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Herpetología* 3: 105-107.
32. Matutini, F.; Baudry, J.; Pain, G.; Sineau, M. & Pithon, J. 2021. How citizen science could improve species distribution models and their independent assessment. *Ecology and Evolution* 11: 3028-3039.
33. Rohman, M.; Prasetyo, L.B. & Kusriani, M.D. 2021. Predicting spatial distribution of Asian Horned Frog (*Megophrys montana* Kuhl & Van Hasselt 1882) in Java Island using citizen science's data. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 771: 012027.
34. Tiago, P.; Pereira, H.M. & Capinha, C. 2017. Using citizen science data to estimate climatic niches and species distributions. *Basic and Applied Ecology* 20: 75-85.
35. Wangyal, J.T.; Bower, D.S.; Sherub, S.T.; Wangdi, D.O.R.J.I.; Rinchen, K.A.D.O.; Phuntsho, S.; ... & Das, I. 2020. New herpetofaunal records from the Kingdom of Bhutan obtained through citizen science. *Herpetological Review* 51: 790-798.
36. Callaghan, C.T. & Brooks, D.M. 2020. Using citizen science to study exotic and invasive birds. *Invasive Birds: Global Trends and Impacts* 363.
37. Johnson, B.A.; Mader, A.D.; Dasgupta, R. & Kumar, P. 2020. Citizen science and invasive alien species: An analysis of citizen science initiatives using information and communications technology (ICT) to collect invasive alien species observations. *Global Ecology and Conservation* 21: e00812.

38. Liu, G.; Rowley, J.J.; Kingsford, R.T. & Callaghan, C.T. 2021. Species' traits drive amphibian tolerance to anthropogenic habitat modification. *Global Change Biology* 27: 3120-3132.
39. Cosentino, B.J.; Marsh, D.M.; Jones, K.S.; Apodaca, J.J.; Bates, C.; Beach, J. ... & Willey, A. 2014. Citizen science reveals widespread negative effects of roads on amphibian distributions. *Biological Conservation* 180: 31-38.
40. Heigl, F.; Horvath, K.; Laaha, G. & Zaller, J.G. 2017. Amphibian and reptile road-kills on tertiary roads in relation to landscape structure: using a citizen science approach with open-access land cover data. *BMC Ecology* 17: 1-11.
41. Gutierrez-Sanabria, D.R. 2017. Evaluación del riesgo de las carreteras nacionales para la fauna silvestre y el uso de ciencia ciudadana como herramienta para el monitoreo de fauna silvestre atropellada en Costa Rica. Tesis de Maestría, Universidad Nacional, Costa Rica.
42. Sterrett, S.C.; Katz, R.A.; Fields, W.R. & Grant, E.H.C. 2019. The contribution of road-based citizen science to the conservation of pond-breeding amphibians. *Journal of Applied Ecology* 56: 988-995.
43. Todd, B.D.; Rose, J.P.; Price, S.J. & Dorcas, M.E. 2016. Using citizen science data to identify the sensitivity of species to human land use. *Conservation Biology* 30: 1266-1276.
44. Group, E.A.; Pope, K.L.; Wengert, G.M.; Foley, J.E.; Ashton, D.T. & Botzler, R.G. 2016. Citizen scientists monitor a deadly fungus threatening amphibian communities in northern coastal California, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 52: 516-523.
45. Ostermann-Miyashita, E.F.; Pernat, N. & König, H.J. 2021. Citizen science as a bottom-up approach to address human—wildlife conflicts: From theories and methods to practical implications. *Conservation Science and Practice* 3: e385.
46. Cooper, C.B.; Dickinson, J.; Phillips, T. & Bonney, R. 2007. Citizen science as a tool for conservation in residential ecosystems. *Ecology and Society* 12: 11.
47. Haywood, B.K.; Parrish, J.K. & Dolliver, J. 2016. Place-based and data-rich citizen science as a precursor for conservation action. *Conservation Biology* 30: 476-486.
48. Jordan, R.; Gray, S.; Howe, D.; Brooks, W.; Ehrenfeld, J. 2011. Knowledge gain and behavioral change in citizen-science programs. *Conservation Biology* 25: 1148-1154.
49. McKinley, D.C.; Miller-Rushing, A.J.; Ballard, H.L.; Bonney, R.; Brown, H.; Cook-Patton, S.C.; ... & Soukup, M.A. 2017. Citizen science can improve conservation science, natural resource management, and environmental protection. *Biological Conservation* 208: 15-28.
50. Soteropoulos, D.L.; De Bellis, C.R.; Witsell, T. 2021. Citizen science contributions to address biodiversity loss and conservation planning in a rapidly developing region. *Diversity* 13: 255.
51. Toomey, A.H. & Domroese, M. C. 2013. Can citizen science lead to positive conservation attitudes and behaviors? *Human Ecology Review* 20: 50-62.
52. Vohland, K.; Land-Zandstra, A.; Ceccaroni, L.; Lemmens, R.; Perelló, J.; Ponti, M.; Samson, R. & Wagenknecht, K. 2021. The Science of Citizen Science. Springer, Cham, Suiza.
53. Conrad, C.C. & Hilchey, K.G. 2011. A review of citizen science and community-based environmental monitoring: issues and opportunities. *Environmental Monitoring and Assessment* 176: 273-291.
54. Baker, E.; Drury, J.P.; Judge, J.; Roy, D.B.; Smith, G.C. & Stephens, P.A. 2021. The verification of ecological citizen science data: current approaches and future possibilities. *Citizen Science: Theory and Practice* 6: 1-14.
55. Terán-Sánchez, S.; Díaz-Arango, A.; Arias-Monsalve, H.F. & Ramírez-Chaves, H.E. 2021. New records of mammals of the Coffee Region, Central Andes of Colombia using citizen science. *Neotropical Biology and Conservation* 16: 27.
56. DeGroote, L.W.; Hingst-Zaher, E.; Moreira-Lima, L.; Whitacre, J.V.; Slyder, J.B. & Wenzel, J. W. 2021. Citizen science data reveals the cryptic migration of the Common Potoo *Nyctibius griseus* in Brazil. *Ibis* 163: 380-389.
57. Damián-Baldeón, O. & Castillo, L. 2018. Herramientas Educativas Enfocada en Anfibios: Desaparición de las Ranas, Adaptado a América Latina y el Perú. Asociación Grupo Ultram, Amphibian Ark, Clorox, Discovery Education & Animal Planet. Lima, Perú.
58. Maruscak, N.; Rudak, R.M. & Sabán, M. 2021. Conociendo los anfibios de Tigre y Escobar: Educación formal, virtualidad y ciencia ciudadana. Exposición oral en 1er. Congreso Latinoamericano de Ciencia Ciudadana.
59. Deutsch, C.; Marin da Fonte, L.F.; Maneyro, R.; Kindel, A.; Dallagnol-Vargas, N.;

- Duarte-Freire, M. & Agostini, G. 2018. In search of the Giant of the Pampas: Gathering conservation efforts in Argentina, Brazil and Uruguay. *Froglog* 26: 22-24.
60. Nosek, B.A.; Spies, J.R. & Motyl, M. 2012. Scientific utopia: II. Restructuring incentives and practices to promote truth over publishability. *Perspectives on Psychological Science* 7: 615-631.
  61. Rutten, M.; Minkman, E. & Van Der Sanden, M. 2017. How to get and keep citizens involved in mobile crowd sensing for water management? A review of key success factors and motivational aspects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water* 4: e1218.
  62. Iacovides, I.; Jennett, C.; Cornish-Trestrail, C. & Cox, A.L. 2013. Do Games Attract or Sustain Engagement in Citizen Science? A study of Volunteer Motivations: 1101-1106. *Err*: Mackay, W.E. (ed.). CHI'13 Extended Abstracts on Human Factors in Computing Systems. ACM, New York, USA.
  63. Verissimo, D.; Vaughan, G.; Ridout, M.; Waterman, C.; MacMillan, D. & Smith, R.J. 2017. Increased conservation marketing effort has major fundraising benefits for even the least popular species. *Biological Conservation* 211: 95-101.
  64. Le Coz, J.; Patalano, A.; Collins, D.; Guillén, N.F.; García, C.M.; Smart, G.M.; ... & Braud, I. 2016. Crowdsourced data for flood hydrology: Feedback from recent citizen science projects in Argentina, France and New Zealand. *Journal of Hydrology* 541: 766-777.

## **5. PROCEDIMIENTOS Y PREPARACIÓN DE MATERIAL PARA INCORPORAR A UNA COLECCIÓN BIOLÓGICA**

**Soledad Palomas**

*Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy,  
CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.*

Las colecciones biológicas o de historia natural pertenecen, en general, a instituciones estatales o privadas como: universidades, museos, institutos del CONICET. Ambos estamentos deben garantizar la perpetuidad, resguardo y conservación de los acervos depositados en ellas. Asimismo, las colecciones deben ser de carácter público o privado, pero sí, estar a disponibilidad de quienes la requieran, como investigadores, docentes, profesionales, estudiantes, entre otros. Estas condiciones (perpetuación y carácter público), se promueven en todo el ámbito de la investigación. Tal es así, que muchas revistas científicas y sus editores solicitan de forma explícita que el material *voucher* (o testigo), colectado y/o fotografiado provenga o sea depositado en alguna colección de referencia para su resguardo y conservación antes de la aceptación y publicación del manuscrito. De esta manera se asegura la disponibilidad de los datos y del material testigo, para futuros estudios. En Argentina, se cuenta con Colecciones Herpetológicas debidamente institucionalizadas, donde se puede realizar el depósito de los ejemplares o material *voucher*. Algunas colecciones se reseñan en la **Tabla 5.1.1**.

Además del material *per se*, las colecciones salvaguardan diferentes tipos de datos asociados al ejemplar, como por ejemplo, las grabaciones de cantos de anuros, datos ecológicos, geográficos y taxonómicos. Tal es así, que hoy se puede acceder a fonotecas que disponen de archivos de audio, oscilogramas y espectrogramas de individuos de numerosas especies. Más recientemente, se ha impulsado a que las colecciones biológicas incluyan el *voucher* fotográfico para aquellas especies, que sólo se encuentran en una alta categoría de amenaza, impidiendo esto su colecta. De este modo, es posible suplantar el ejemplar testigo observado, con varias fotografías que permitan un alto detalle taxonómico del ejemplar, para una correcta clasificación. Es importante destacar, que el material fotográfico, es sólo para casos especiales; que, en condiciones normales, no suplanta de ninguna manera al ejemplar *voucher* colectado. Además, los datos que acompañan a estos registros fotográficos son lo suficientemente completos para asegurar la confiabilidad y calidad del registro incorporado, aumentando así su valor de referencia. Por mencionar algunos ejemplos: la Colección Bioacústica del Laboratorio de Genética Evolutiva perteneciente al Instituto de Biología Subtropical (CONICET-UNaM) con su acrónimo LGE-B de la provincia de Misiones, posee una fonoteca donde se pueden incorporar cantos de anfibios. La Colección Herpetológica Lic. Blanca Beatriz Alvarez de la Universidad Nacional del Nordeste (acrónimo: UNNEC), en la provincia de Corrientes; posee una colección de avistajes (acrónimo: UNNEC-A), donde incorpora imágenes fotográficas asociadas con una gran cantidad de datos como la georreferenciación, medidas morfométricas y datos ambientales de los individuos fotografiados. Asimismo, complementando la misma colección, la Fonoteca Zoológica de la Universi-



Nombre de la Colección y acrónimo	Institución a la que pertenece	Provincia	Categoría de acervo que posee. Ej: ejemplares fijados, tejidos, fonotecas	Técnico (Nombre/s, y contacto)	Curador (nombre y contacto)
Colección Biológica del Instituto de Ciencias Básicas (ECRA) <sup>1</sup>	Universidad Nacional de San Juan, Facultad de Filosofía Humanidades y Artes, Instituto de Ciencias Básicas.	San Juan	Ejemplares fijados	no	Responsable: Dr. Eduardo Sanabria Curador de vertebrados: Dr. Alejandro Laspiur <i>coleccion.ecra@gmail.com</i>
Colección Herpetológica "Blanca Beatriz Álvarez" (UNNEC) <sup>2</sup>	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura - Universidad Nacional del Nordeste	Corrientes	Ejemplares fijados, esqueletos, fonoteca, avistajes	no	Victor Hugo Zaracho <i>herpetologia@exa.unne.edu.ar</i>
Colección Herpetológica del IADIZA (CH-IADIZA) <sup>3</sup>	Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (IADIZA-CONICET)	Mendoza	Ejemplares fijados, esqueletos, fonoteca, fotografías, tejidos	Benjamín Bender (CPA de CONICET) <i>jbender@mendoza-conicet.gov.ar</i>	Valeria Corbalán <i>corbalan@mendoza-conicet.gov.ar</i>
Colección Herpetológica del Laboratorio de Genética Evolutiva (LGE) <sup>4</sup>	Instituto de Biología Subtropical (CONICET-UNaM)	Misiones	Ejemplares fijados (adultos, huevos, larvas, series de desarrollo), ejemplares diafanizados, tejidos para estudios de ADN y ARN, muestras de citogenética, fonoteca.	Pablo Javier Torres	Diego Baldo <i>diegobaldo@gmail.com</i>
Colección de Herpetología (MLPA para anfibios y MLPR para reptiles) <sup>5</sup>	Museo de La Plata	Buenos Aires	Ejemplares enteros en alcohol, Tejidos en frezeer Pieles y colección osteológica en seco Material teñido y diafanizado en glicerina	no	Curador Jorge D. Williams <i>williams@fnyim.unlp.edu.ar</i> Encargado Leandro Alcalde <i>alcalde@ipla.edu.ar</i>

**Tabla 5.1.1.** Colecciones Herpetológicas en Argentina. Información sobre características de sus acervos custodia.

<p>Colectión del Grupo de estudio sobre Anfibios del Laboratorio de Biodiversidad y Conservación de Tetrápodos (GA)<sup>6</sup></p>	<p>Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL)</p>	<p>Santa Fe</p>	<p>Ejemplares fijados, tejidos, registros de presencia acompañados por material de soporte (audios, videos, fotografías)</p>	<p>Dr. Javier A. López y Dra. Romina Ghirardi</p>
			no	

1. ECRA: La Colección Biológica del Instituto de Ciencias Básicas, acrónimo "ECRA", posee dos colecciones vertebrados e invertebrados. Recibe ejemplares fijados húmedos para la colección de vertebrados. La colección de invertebrados recibe ejemplares secos que estén debidamente montados, o húmedos. Ambas colecciones tienen como requisito que el material que llegue a la provincia debe estar acompañado de la documentación legal correspondiente (guía de tránsito y permiso de captura) además de los datos completos referentes a la captura de los ejemplares (fecha de captura, lugar, coordenadas, altura, etc). Via de contacto es [coleccion.ecra@gmail.com](mailto:coleccion.ecra@gmail.com)
2. UNNEC: Requisito para incorporar ejemplares: copia de la documentación que avale legalmente su colección (permisos ante los organismos correspondientes y guía de tránsito). Fonoteca: archivos de sonido, preferentemente en formato .wav. Avistajes: imágenes en alta calidad, preferentemente más de una . En todos los casos se solicitan datos mínimos como colector, localidad y fecha.
3. CHADIZA: El requisito mínimo para incorporar material es que cuente con datos de procedencia. Otros datos como fecha de captura, colector, coordenadas y hábitat son requeridos pero no obligatorios, al igual que la documentación legal correspondiente (permisos de captura, guías de tránsito). Los especímenes deben estar en buenas condiciones para ser ingresados como material fijado. Actualmente la colección sólo cuenta con material fijado, pero es posible la incorporación de otros tipos de acervo.
4. LGE: Todos los materiales que se deseen ingresar a las colecciones deben estar acompañados del mayor número de datos precisos sobre identidad taxonómica, localidad, geolocalización, fecha de obtención, colector/a/es/as y, de cualquier otra información complementaria como: características morfológicas que pueden modificarse al momento de la colección (pigmentos, formas, etc), emplazamiento geológico, descripción del ambiente, sexo, abundancia, frecuencia, horario, hospedador, sustrato, método o arte de obtención, etc.
5. MLPA: La colección herpetológica del Museo de la Plata recibe el siguiente tipo de material de anfibios y reptiles: (1) especímenes completos conservados en alcohol 70% que pueden o no estar acompañados con hisopados salivales o muestras de tejido para estudios de ADN, (2) esqueletos teñidos y diafanizados conservados en glicerina, (3) material de cortes histológicos siempre que se acrediten especímenes de referencia, y (4) restos óseos hallados a campo que resulten importantes para incrementar el conocimiento de la distribución geográfica de una especie (ej. caparazones de tortuga, cráneos de yacaré, etc.). El material ingresado debe contar con la documentación de respaldo correspondiente según el caso, salvo excepciones que se hacen con material procedente de atropellamientos en rutas o en caso que se acredite su captura y muerte accidental en ocasión de estar realizando otros estudios (por ejemplo trampas de caída para captura muerta de artrópodos).
6. GA: La Colección del Grupo de estudio sobre Anfibios del Laboratorio de Biodiversidad y Conservación de Tetrápodos, del Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL) recibe material de anfibios y reptiles. La información mínima requerida para el ingreso de material es: localidad, geolocalización, fecha de obtención, colector/a/es/as y de cualquier otra información complementaria (p.e. tipo de ambiente, horario, sustrato/microhábitat, actividad —alimentándose, en amplexo, cortejando, vocalizando—, características morfológicas que puedan modificarse al momento de la colección/fijación/conservación como colores, etc.). Contacto: [jalopez@inail.unl.edu.ar](mailto:jalopez@inail.unl.edu.ar); [yojalg@gamil.com](mailto:yojalg@gamil.com)

dad Nacional del Nordeste (acrónimo: FZ UNNE) también permite el ingreso, a su acervo, de registros de audio de artrópodos y vertebrados.

A pesar de la importancia que tiene la incorporación de material biológico en una colección de referencia, no es del todo habitual recibir capacitación en esta área en las carreras universitarias vinculadas con esta práctica. A menudo, durante las primeras experiencias de campo realizadas por estudiantes o investigadores en sus etapas iniciales se pueden cometer errores con los trámites y autorizaciones previas que hay que realizar, en los procedimientos para coleccionar ejemplares y en los detalles a tener en cuenta. Un aspecto que nunca se debe dejar de considerar respecto al material biológico que se está colectando, es que constituye un Patrimonio Provincial, Nacional y de la Humanidad. Es por ello que la preparación y el diseño de un estudio comienza mucho antes que la salida al campo, y resulta fundamental considerar los trámites administrativos. Seguramente, una primera experiencia se adquiere al presentar los planes de trabajo y/o proyectos de investigación ante un Comité de Evaluación y/o de Ética; quienes someterán a análisis cada una de las secciones del escrito, incluida la metodología.

Previamente a la logística que toda campaña requiere, es muy importante considerar los requisitos legales existentes y la necesidad de contar con los trámites aprobados para los permisos de colectas de las Provincias, Áreas Protegidas Provinciales y/o Privadas y/o Áreas Protegidas Nacionales. Asimismo, se debe considerar los requisitos específicos para la gestión de las guías de tránsito, necesarias para trasladar el material biológico colectado entre provincias, en el caso que así fuera.

En esta sección, se presentan comentarios y/o sugerencias específicas para ser tomadas en cuenta en la planificación de los estudios y la elaboración de proyectos, que involucren la colecta o utilización de ejemplares. Además, se detallan los trámites, procedimientos, métodos y técnicas adecuadas que se necesitan para que una colección de referencia pueda dar ingreso al material biológico de estudio. Acondicionar de la mejor manera posible todo el material y las muestras colectadas con los datos correspondientes, es una ayuda invaluable para las personas vinculadas con el manejo y la custodia de las colecciones biológicas; dado que esto agiliza todo el proceso de incorporación.

Todo recurso extraído de la naturaleza puede ser considerado como un aporte a la conservación de la biodiversidad; por lo que es importante optimizar cada ejemplar para el estudio de diversos temas (parasitología, genética, taxonomía, anatomía, histología, citogenética, etc.), pudiendo así ser utilizado por varios investigadores.

## Requisitos para ingresar material a las colecciones de referencia

### Permisos de Colecta

La normativa sobre fauna silvestre se incluye en la Ley Nacional 22.421 Conservación de la Fauna Silvestre. Aquí se indican los dos primeros artículos de esta ley en el **Anexo 5.1.1**. La misma se puede encontrar de manera completa en: Normativa de fauna silvestre. En Argentina, cada provincia es autónoma y autárquica en la toma de decisión para reglamentar el uso y manejo de sus recursos naturales, pudiendo adherirse de esta manera a la totalidad de la Ley 22.421, o sólo en algunos artículos; o también elaborar sus propias leyes provinciales. Es por ello que la reglamentación de los Permisos de Colecta Científica puede presentarse como Resoluciones Ministeriales, Disposiciones o Ley Provincial. Las dependencias que regulan la colecta científica pueden variar de provincia en provincia, pudiendo nombrar algunos ejemplos como la provincia de Tucumán: Dirección de Flora, Fauna Silvestre y Suelos que pertenece al Ministerio de Desarrollo Productivo; Misiones: Ministerio de Ecología, Recursos Naturales, Renovables y Turismo; Mendoza: Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable que se encuentra dentro de la Dirección de Recursos Naturales Renovables.

En cuanto a la Administración de Parques Nacionales (APN), organismo público encargado de mantener el Sistema Nacional de Áreas Protegidas, se encuentra sectorizada por delegaciones regionales: Noroeste, Noreste, Centro, Patagonia y Patagonia Austral. Actualmente, poseen un sistema de gestión de permisos y trámites administrativos, llamado Gestión de Permisos de Investigación (GePIIn; ver **Anexo 5.1.2**). Se debe tener en cuenta que el tiempo del trámite dependerá de cada seccional regional de APN, área protegida y/o de cada provincia. Por lo tanto, es fundamental iniciar lo más temprano posible la presentación de los requisitos solicitados, antes de avanzar en la planificación de una campaña o salida al campo. Es difícil realizar un resumen general de esta diligencia, ya que las variantes son muy diversas. Más abajo se listan los requisitos generales que se solicitan en la mayoría de las dependencias; además de comentarios y recomendaciones sobre situaciones que se han presentado a lo largo de las experiencias de estos trámites en el país.

Lista de Requisitos:

Datos del Responsable.

Copia de DNI.

Nota de solicitud de colecta científica y/o formulario de solicitud (ver **Anexo 5.1.3**).

Nota de aval de institución a la que pertenece el investigador o grupo de trabajo (ver **Anexo 5.1.4**).

Copia de proyecto/plan de trabajo.

Lista de ejemplares a coleccionar (género y especie) con cantidades.

Fechas probables de campaña.

Localidades o área geográfica a muestrear.

Lista de colectores (con DNI, dirección, cargo, institución a la que pertenecen y CV abreviado).

Los permisos emitidos por todas las dependencias poseen un tiempo de vigencia de uno o dos años. En muy pocos casos, algunos organismos suelen emitir las autorizaciones con plazos coincidentes con el tiempo de ejecución del proyecto y/o plan de tesis.

Es fundamental adoptar un trabajo multidisciplinario con las personas encargadas de la ejecución de dicho trámite en las diferentes entidades, compartiendo los conocimientos de manera recíproca. La información compartida de ambas partes facilitará las futuras diligencias. Resulta valioso realizar algunas recomendaciones prácticas sobre situaciones que pueden surgir durante las campañas y que son importantes de atender.

Al finalizar un viaje de campo es posible que sea necesario gestionar las guías de tránsito para poder circular entre diferentes provincias con material biológico; por lo tanto, es recomendable coordinar con el organismo involucrado, la hora de regreso de la campaña para poder informar los ejemplares colectados y poder obtener dichas guías. Muchos herpetólogos realizan sus muestreos a lo largo de la Cordillera Argentina, donde muchas de las provincias del sector cordillerano poseen sus capitales a varios kilómetros de allí. En esta situación, se debe considerar que quizás haya que realizar varios kilómetros de desvío de las rutas previstas de campaña, para efectuar la solicitud de la guía de tránsito y, el posterior retorno al recorrido programado. Una estrategia muy bien generada en algunas provincias patagónicas se basa en poseer oficinas ubicadas en otros sectores provinciales; las mismas disponen de autorizaciones para la emisión de guías de tránsito para salir de la provincia. Este tipo de estrategias son sumamente valoradas, por favorecer a la logística que las campañas requieren.

Con respecto a la lista de ejemplares a recolectar, cuando se pretende estudiar una o varias especies definidas, es sencillo completar este ítem que

solicitan los permisos. Sin embargo, cuando se trabaja con relevamiento de la diversidad de especies, muchas veces no podemos adelantar con exactitud qué especies vamos a encontrar, ni mucho menos la cantidad de individuos. Es posible guiarse con publicaciones que realizan síntesis generales de la diversidad en regiones o provincias para incluir las especies en la lista solicitada como la Categorización del Estado de Conservación de la Herpetofauna de la República Argentina<sup>(1)</sup>, que permitirá estimar de manera general las especies que pueden estar presentes en el área de estudio. Se aconseja realizar una aclaración (en el pie de la lista) que en caso de encontrar alguna especie que no esté incluida en la lista, se dará aviso de inmediato a la repartición nacional o provincial correspondiente.

Las fechas tentativas de campañas y las localidades o áreas geográficas a muestrear o monitorear son, por lo general, condición obligatoria a ser incluidas en detalle dentro de las notas o formularios de permisos de colecta. Resulta muy claro que, en diferentes áreas geográficas, como con diferentes especies de anfibios, son muchos los factores que intervienen tanto en la programación de las fechas de campaña como así también en la selección del área a muestrear, por lo que puede resultar muy difícil o casi imposible planificar con tanta precisión una fecha exacta o la dimensión del área a visitar. En los casos que las autoridades de control lo permitan, se puede optar por considerar como fechas de campaña, un rango de 5 a 7 días mensuales, para todos los meses del año. Para especies que, por datos bibliográficos o experiencia previa, sabemos en qué meses se encuentran en su máxima actividad, se mantiene el rango de días, pero se especifican los meses. Por ejemplo: *“se realizarán las campañas entre los días 6 al 10 de los meses de: septiembre, octubre, noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo”*. Para el caso de las áreas geográficas, se pueden colocar todos los departamentos de la provincia o las localidades que rodean el sitio específico de muestreo. Se sugiere hacer una mención, especificando que las fechas y los lugares detallados, estarán sujetos a las condiciones climáticas y a la accesibilidad de los caminos, entre otros imprevistos de logística.

En algunas provincias, se solicita la compra de una estampilla que debe adquirirse en otra repartición pública alejada. La misma va con la documentación requerida, permitiendo recién así el ingreso de los formularios a través de mesa de entradas.

Se tiene conocimiento que algunos estamentos solicitan de manera indispensable que el investigador, o grupo de trabajo, dé aviso previo a los viajes. Algunas de las razones se deben a que ponen a disponibilidad personal para acompañamiento dentro de las áreas visitadas, como así también, para facilitar la accesibilidad de los lugares de estudio.

Se presentan situaciones muy particulares donde algunos estamentos, en convenio con universidades o institutos que poseen Comités de Ética con reglamentos sobre el cuidado de animales en laboratorios, solicitan a los investigadores que el plan o proyecto esté aprobado por las mismas. Asimismo, requieren la realización de cursos sobre manipulación de animales de laboratorio -que muchas veces son de otro orden taxonómico- incluso cuando el plan posee solamente trabajo de campo.

### **Métodos de preparación de material biológico: fijación y conservación**

Los estudios sobre la preparación del material biológico han ido evolucionando y adoptando diversas técnicas. En Argentina, y a través de las publicaciones de Scrocchi y Kretzschmar<sup>(2)</sup>, quienes aportaron sus conocimientos y experiencias a la herpetología de este país; sentaron las bases sobre la metodología de fijación y conservación de ejemplares para colecciones. Con el avance en nuevos insumos, las técnicas de base se encuentran en continuo perfeccionamiento e innovación.

Esta sección comienza aclarando que fijar no es lo mismo que conservar. El formol (o formaldehído) es un fijador y el alcohol, un conservante. Son dos compuestos químicos diferentes, por lo que no se recomienda usar de manera inversa (formol para conservar — alcohol para fijar), salvo en casos especiales.

La fijación adecuada de los ejemplares colectados se debe realizar con formol al 10%; para su posterior conservación en alcohol 70%. Siguiendo con la importancia de optimizar el material colectado para diversos estudios, en el proceso de fijación se debe tener en cuenta el orden, método y tipo de fijación para cada técnica. Más adelante, en este mismo apartado, se irán detallando algunas situaciones con ejemplos, de modo que se pueda apreciar de manera correcta cada paso del proceso.

#### **Preparación de líquido fijador y conservante**

Aunque parezca un cálculo matemático sencillo y fácil de realizar, para algunas personas no lo es. Esto es cuestión de costumbre y práctica, y realizar las preparaciones a “ojímetro” ¡no!, de ninguna manera. Por varias razones, primero y principal podemos arruinar la muestra y el ejemplar, que costó dinero, tiempo y la vida de un individuo; en segundo lugar, se desperdicia químico y en tercer lugar, exponemos nuestra salud a vapores más concen-

trados. Antes de dar las proporciones y algunos tips de preparación de los químicos, se hace hincapié en esto: ¡todo recipiente debe estar debidamente rotulado! El rótulo debe indicar la sustancia que contiene y el porcentaje al cual está diluida o preparada.

## Anécdota

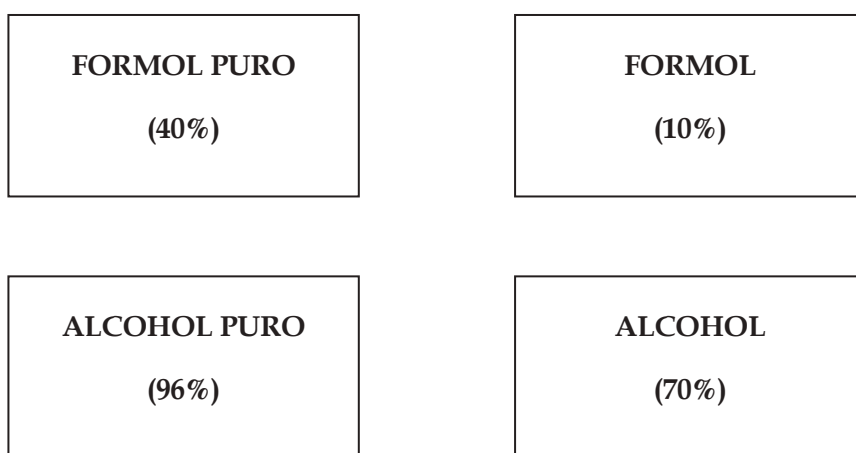
*Herpetólogo de la provincia de Corrientes y becario doctoral, preparando el equipo de campaña para realizar sus muestreos en la región fitogeográfica del Chaco Seco, más específicamente Fuerte Esperanza, Dpto. Gral. Güemes, Provincia de Chaco. En el laboratorio de uso común entre varios docentes, investigadores, técnicos, pasantes y alumnos; el becario se dirigió al armario de los químicos y separó el formol en su recipiente original, procediendo a su preparación al 10% en un envase descartable. Al día siguiente emprendió su viaje de unos 480 km aproximadamente, realizó todo el trabajo metodológico de muestreo y su posterior extracción y fijación de muestras para estudios de biología trófica y reproductiva. Ya de regreso al laboratorio, el becario procedió a realizar la técnica histológica (deshidratación de la muestra, inclusión en parafina, armado de tacos histológicos, cortes en micrótomo, desparafinado de las muestras, coloración) que lleva varios días. Ya con el producto final, y en el microscopio analizando los cortes, comenzó a observar que algo no andaba bien. Las células no poseían sus paredes bien definidas, y no se podían observar los detalles celulares de las estructuras fijadas, como por ejemplo: el contorno de la membrana nuclear; asimismo se detectaron procesos de apoptosis celular. Días siguientes, tomó las muestras de contenido estomacal y, nuevamente, algo no estaba bien. Las piezas de insectos estaban muy blandas y poco definidas, lo cual dificulta la manipulación y determinación de las especies ingeridas. Ya consciente que había un problema de fijación, buscó los ejemplares colectados y se encontró que estaban en proceso de descomposición. Con varias pruebas a favor de una mala preparación del líquido conservante, buscó el recipiente original de Formaldehído y recorrió los laboratorios consultando si alguien había utilizado dicho químico. Por supuesto que se dio con la noticia, no sólo que se había diluido el formaldehído y NO SE HABÍA ROTULADO, sino que además, se había preparado a "ojímetro". En conclusión, primero: el becario perdió las muestras estacionales de mayor actividad reproductiva de sus colectas; segundo: costó la vida de ejemplares, que no pudieron ser optimizados para varios estudios; tercero: se perdió dinero de subsidios de proyectos y de estipendios que se aportaron para la realización de la campaña; cuarto: se desperdiciaron insumos y químicos de alto costo económico, utilizados para el estudio histológico y quinto: tiempo, transcurrieron aproximadamente dos meses de análisis de muestras. Se pretende, que con esta situación se pueda observar y valorar la importancia de un sencillo rótulo, fácil de hacer y que no se invierte más de 5 minutos en su elaboración.*

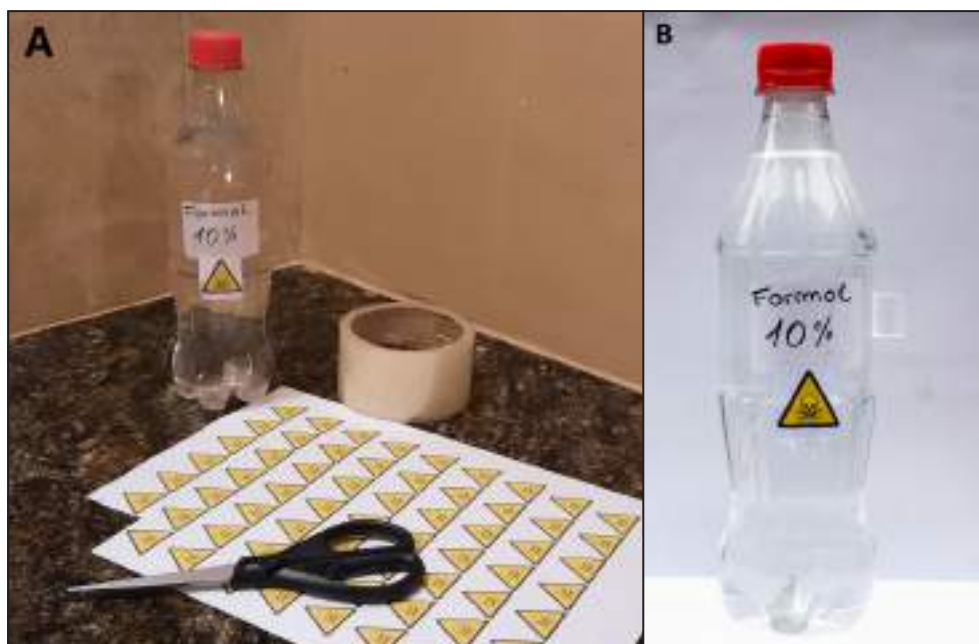


*Aclaración:* el formol apropiado, que convencionalmente se adquiere en las científicas, viene en su presentación de concentración al 40%. Teniendo en cuenta lo anterior, cuando se hace referencia a FORMOL PURO, se habla de FORMOL 40%. El alcohol de uso farmacéutico, en cambio, posee su presentación de concentración al 96%. En este caso, también se lo llama ALCOHOL PURO, aunque el alcohol al 100%, que sería verdaderamente PURO, es llamado ALCOHOL ABSOLUTO. Se tiene que tener mucho cuidado cuando se habla de los porcentajes, razón por la cual, se sugiere estandarizar la terminología con todos los integrantes de un laboratorio. De todas maneras, se debe colocar la información del porcentaje en los rótulos de envases, que se utilicen para recarga o transporte de los químicos.

### Rótulos

El uso de pictogramas en los rótulos y envases, es sumamente importante. Por lo tanto, es muy práctico, tener siempre a mano plantillas A4 de papel adhesivo, que contenga varios pictogramas ya impresos (**Figura 5.1.1**).





**Figura 5.1.1.** Botella de PET rotulada detallando el contenido y su porcentaje, con el pictograma correspondiente. Fotos: A. Chavarría.

El uso de botellas descartables de bebidas gaseosas para la preparación de formol, son muy prácticas y herméticas; las mismas poseen un sistema de tapa a rosca eficiente que evita derrames, son económicas y resistentes. El inconveniente que se tiene con ellas, es que a menudo, también son usadas para transportar agua para beber. Es aquí donde surge el problema, debido a que el vapor de formol no es detectado de inmediato, como sí lo es el alcohol, si no están rotuladas correctamente, se corre el riesgo de ingerir formol por equivocación. Por lo tanto, se insiste en tener mucha precaución y siempre rotular los envases debidamente.

#### **Preparación de fijador: Formol al 10%**

Antes de comenzar a utilizar cualquier químico, se deben colocar guantes para evitar el contacto con la piel si accidentalmente se producen derrames. El proceso de preparación del formol incluye una medida de formol puro (40%) en nueve medidas de agua. Se puede utilizar un vaso medidor (vasos precipitados, beaker, erlenmeyer o probetas), pero en el caso de no tener disponible o ante alguna dificultad durante los trabajos en campo, se puede hacerlo con cualquier recipiente; siempre que se mantengan las proporciones. Dependiendo del tamaño del recipiente a recargar, podemos utilizar como medidores: vasos descartables, frascos de conservas, entre otros. (**Figura 5.1.2**). De este modo se puede obtener formol al 10%, al utilizar una medida de formol puro (40%) y nueve medidas de agua. Se puede repetir la acción hasta llenar el recipiente.



**Figura 5.1.2.** Algunas opciones de envases, con tamaños y capacidad de carga, para tener de referencia a la hora de diluir el alcohol o formol. Fotos: A. Chavarría.

### Preparación de conservante: Alcohol al 70%

La preparación del alcohol, como líquido conservante se realiza con siete medidas de alcohol y tres medidas de agua. Los recipientes con medidas que generalmente encontramos en los laboratorios, ya sean vasos precipitados, beaker, erlenmeyer o incluso probetas; son con unidades en mililitros (**Figura 5.1.3**). Por lo cual encontramos, por ejemplo: de 250 ml y vienen graduadas en: 50, 100, 150, 200 y 250 ml, u otros de 500 ml graduados en 100, 200, 300, 400 y 500 ml. Se dificulta el cálculo matemático con estos instrumentos. Aunque son económicamente costosas, algunos laboratorios poseen probetas de 1000 ml (**Figura 5.1.4**). Sin embargo, y en casos excepcionales, se puede recurrir también a recipientes no convencionales como instrumento medidor.

¿Qué sucede cuando se cuenta con un envase original de 1 lt. de alcohol, pero que ya está utilizado y no posee la totalidad del contenido; y se necesita preparar alcohol al 70%? Es muy común que suceda esta situación con el alcohol, ya que este líquido conservante es utilizado para varias técnicas de laboratorio. Aquí sí serán de utilidad los vasos precipitados, probetas, erlenmeyer, etc. donde se puede verter el contenido del recipiente de alcohol y saber la cantidad exacta tenemos. Una vez obtenido este dato, se realiza una ecuación muy sencilla: una regla de tres simple. Se presentan a continuación unos ejemplos:

El contenido de la botella de alcohol es de: 670 ml ► esta cantidad corresponde al 70%, y se desea estimar cuánto será el 30% de agua que se debe agregar.

Ejemplo 1:

70% \_\_\_\_\_ 670 ml alcohol

30% \_\_\_\_\_ X= 287,14 ml agua

$30 \times 670 \text{ ml} / 70 = 287,14 \text{ ml}$



**Figura 5.1.3.** Vasos precipitados generalmente usados en los laboratorios. Foto: A. Chavarría.

Ejemplo 2:

70% \_\_\_\_\_ 420 ml alcohol

30% \_\_\_\_\_ X= 180 ml agua

Ejemplo 3:

70% \_\_\_\_\_ 5,5 lts. alcohol

30% \_\_\_\_\_ X= 2,35 lts. agua

### **Cama de fijación, fijación, postura del ejemplar y lavado**

Para esta tarea se necesitan: servilletas de papel, bandeja de isopor, gasa, pipetas, un recipiente hermético, pinza histológica, tijera, jeringa y aguja, plástico para cubrir la superficie donde se va a trabajar, guantes, gafas, formol al 10% y número de campo con iniciales o acrónimo.

Se aconseja realizar el proceso de fijación bajo campana de laboratorio para evitar aspirar los vapores del formol. En el caso de no poseer en el laboratorio, es importante ubicarse cerca de ventanas donde haya corriente de aire. Cuando esta actividad se realiza en el campo, es muy efectivo hacerlo al aire libre y, en lo posible, cerca del acceso a agua potable por si ocurren derrames o accidentes con el líquido fijador.



**Figura 5.1.4.** Probeta con graduación de 1000 ml. Foto: S. Palomas.

#### *a- Cama de fijación*

En el recipiente hermético, tapizar la superficie con varias capas de gasa o servilletas de papel; se pretende que las varias capas permitan retener el líquido fijador y en consecuencia, lograr una buena fijación. Posteriormente, se debe bañar la superficie del recipiente cubierto por la gasa, con formol al 10%; inmediatamente cerrarlo y dejarlo listo para incorporar los ejemplares. Se reitera, se aconseja rotular el recipiente hermético con la especificación: “Cama de fijación” y con pictograma correspondiente.

Se promueve el uso de gasa que se venden por metro en las tiendas de venta de telas, por ser reutilizables, reduciendo además la cantidad de papel con fijador que será desechado. Si se acuerda destinar un recipiente hermético para el uso sólo de cama de fijación, también se está economizando líquido fijador, ya que sólo se van cambiando los ejemplares en proceso de fijación y renovando el químico muy de vez en cuando.

## Número de campo/Acrónimo

Para la confección de las etiquetas que van sujetas a los ejemplares colectados, se recomienda el uso de papel Tyvek®. Hoy en día, se puede acceder más fácilmente a este tipo de producto. Como particularidad, posee una gran resistencia y adhesión de tintas pigmentadas. Permiten su inmersión en alcohol, sin alterar la escritura, sólo tener en cuenta que este producto posee un lado indicado para la escritura. Se debe tomar el papel con la mano y frotarlo suavemente a la sensibilidad de la yema de los dedos, el lado más suave es el idóneo para escribir. Con respecto a las tintas pigmentadas, se venden de varias marcas y espesores. Se llaman estilógrafos o microfibras descartables, y algunas marcas conocidas son Rotring®, Edding® y Pizzini®, entre otras; son por lo general muy buenas. Los pigmentos con los que son elaboradas estas tintas son muy resistentes al agua, a la luz y, sobre papel Tyvek® resistentes exitosamente al alcohol. Los espesores o grosores de las microfibras, juegan un rol fundamental a la hora de elaborar rótulos y etiquetas, ya que las puntas y grosores más finas, nos permiten más precisión para escritura más pequeña. Comúnmente, se utiliza el grosor N° 0.3 para etiquetas grandes, y N° 0.2 o N° 0.1 para etiquetas y rótulos pequeños, como así también para números de campo. Sobre la utilización combinada de las microfibras y el papel tyvek®, se ha observado que en ocasiones particulares, de mucha humedad en el ambiente o humedad del papel (por estar guardado en lugares húmedos), al escribir sobre el tyvek® la tinta se abre y se corre instantáneamente. Hay casos en que no se observa ninguna alteración al momento de la escritura, pero al ingresar la etiqueta al alcohol rápidamente, empieza a correrse dentro del líquido. Es por estas situaciones que se aconseja:

- 1- Guardar los papeles en lugares secos, lejos de la humedad.
- 2- Luego de escribir sobre el papel tyvek®, dejar secar bien la tinta por un rato prolongado. Esto dependerá del lugar donde se encuentre realizando la tarea. Si el ambiente está regulado por acondicionadores de aire, con unos cuantos minutos estará listo. En el caso de haber humedad en el ambiente, dejar una hora e ir probando.
- 3- Si se sospecha que el papel tyvek® no estaba almacenado en un lugar idóneo, antes de su utilización, exponerlo bajo la corriente de frío de un acondicionador de aire por unos minutos. Esto eliminará la humedad que pueda contener el papel tyvek®.
- 4- Si no se dispone de mucho tiempo, se puede proceder a utilizar microfibras de grosores N° 0.1 o N° 0.2, ya que descargan menos cantidades de tinta, evitando así el exceso de tinta y una mayor rapidez al secado.
- 5- Las microfibras cuando son nuevas, suelen provocar grandes descargas de tinta a las primeras escrituras, pero luego se normalizan. Por eso, se recomienda no utilizar microfibras nuevas en situaciones de ambientes húmedos.

### b- Fijación

Durante el procesamiento de las muestras, la fijación del ejemplar es el último paso. Por ello, antes de manipular químicos, vamos a colocar el número de campo en el individuo con las iniciales correspondientes o acrónimo sujetos en el miembro posterior, debajo de la articulación (rodilla) (**Figura 5.1.5**).



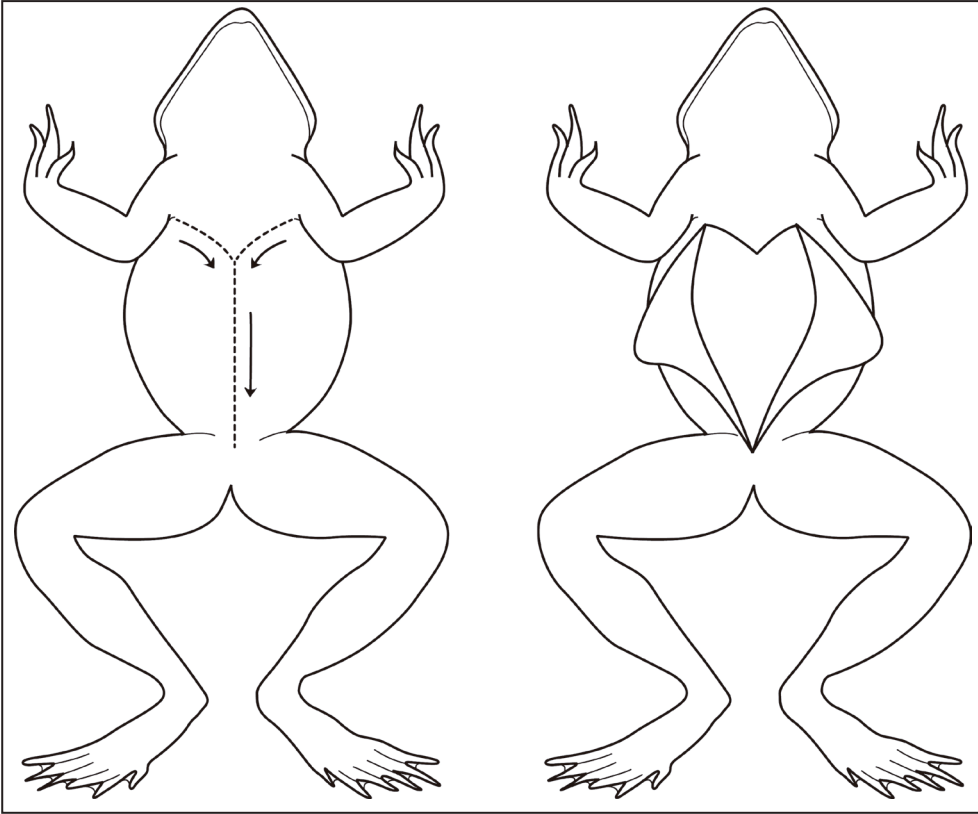
**Figura 5.1.5.** Número de campo y procedimiento de atado en el miembro posterior, a la altura de la rodilla. Ilustración: J. A. Ramírez.

El método de fijación dependerá si el estudio requiere o no extracción de muestra del individuo. El motivo por el cual se hace esta distinción se debe a que habrá un proceso de disección involucrado, lo que implica que el líquido fijador no será contenido en el cuerpo de la misma forma.

1. Fijación con extracción de muestras: Generalmente, las disecciones en anfibios se realizan en la región ventral, en forma de Y (**Figura 5.1.6**). Una vez extraídas las muestras, se hacen bolitas o pelotitas con papel servilleta de diferentes tamaños (**Figura 5.1.7**) Estas bolitas se colocan a modo de relleno en el interior del cuerpo del individuo; y es aconsejable acomodar los órganos que persisten para lograr mantener su ubicación, y de este modo evitar que se dañen. Luego, se procede a bañar todo el interior con formol al 10% (se aconseja hacerlo con una pipeta y dentro de la cama de fijación). A continuación, se debe acomodar la piel diseccionada cubriendo todo el vientre para permitir una buena postura e imagen del ejemplar que será ingresado a una colección biológica de referencia.
2. Fijación sin extracción de muestras: El procedimiento debe realizarse con gafas para cubrir los ojos. En este método donde el ejemplar se conserva de manera intacta, se realiza una pequeña punción en la base del abdomen con una jeringa y aguja mediana a fina para introducir el líquido fijador. Si el contenido cargado en la jeringa es poco, no se saca la aguja del ejemplar; se procede a desmontar la aguja de la jeringa para recargar y volver a montar la aguja. Esto evitará que la jeringa se tranque y se suelte por presión, esparciendo en forma de lluvia, el químico por la mesa de trabajo y por el rostro del operador.

#### *c- Postura del ejemplar*

La postura debe ser de “descanso”, y para ello se debe ubicar el ejemplar en la cama de fijación acomodando con las pinzas los miembros posteriores y anteriores. Con mucho cuidado y suavidad, se aconseja separar bien los dedos,



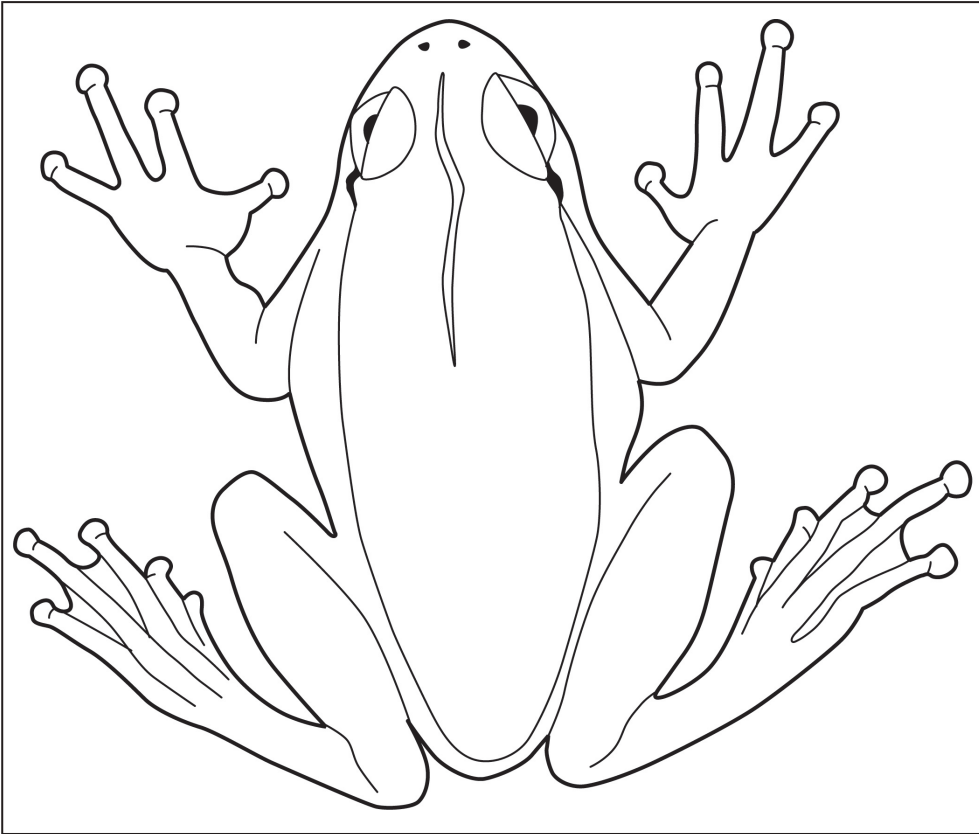
**Figura 5.1.6.** Disección en forma de “Y” para anfibios. Ilustración: J. A. Ramírez.

para permitir una fijación correcta de los mismos, como así también de las membranas interdigitales en el caso de las especies que posean. Esto permitirá una buena observación y determinación de las especies, ya que tanto los dedos con discos adhesivos como las membranas interdigitales son de importancia taxonómica para algunas especies. Otro modo de lograr una buena postura es tomando el ejemplar con pinzas desde los miembros anteriores e ir apoyándolo en dirección posteroanterior. Es una práctica sencilla, que con mucha paciencia, se va mejorando la postura de los individuos a fijar (**Figura 5.1.8**).



**Figura 5.1.7.** Bolitas de papel servilleta para incluir dentro del cuerpo del individuo. Foto: S. Palomas.





**Figura 5.1.8.** Postura de descanso para fijación de ejemplares. Ilustración: J. A. Rodríguez.

Con el ejemplar ya fijado y con la postura correcta dentro de la cama de fijación, se procede a cubrirlo con gasa o papel servilleta para posteriormente embeberlo muy bien con formol al 10%. Se debe cerrar el recipiente herméticamente y se debe dejar fijando aproximadamente 12 horas.

Frecuentemente no es necesario inyectar líquido conservante a los ejemplares de pequeño tamaño, ya que al estar inmersos en la cama de formol se fijan muy bien. Sin embargo, a raíz de promover la optimización de los ejemplares para diversos estudios, se aconseja inyectarlos para que el formol bañe completamente los órganos y piezas óseas. Estos individuos así inyectados podrán ser utilizados para otros estudios, como se mencionó anteriormente. Se sabe que el fijador por excelencia para histología es el Bouin, pero una buena fijación con formol, permite utilizar los ejemplares de colecciones para complementar estudios histológicos.

#### *d- Lavado*

Se deben extraer primero las bolitas de papel servilleta que fueron incorporadas en el interior del ejemplar, e ir depositando los individuos en un recipiente con abundante agua. Se debe renovar el agua unas 3 veces como

mínimo, dejando unas cuantas horas entre renovación y renovación. En un tiempo atrás, se dejaba el recipiente con los ejemplares bajo un hilo de agua corriente constante para ir produciendo un lavado constante. Sin embargo, en la actualidad, ya con una conciencia incorporada en la sociedad sobre el cuidado de los recursos naturales; es que se opta por realizar procesos de renovación de agua.

Cuando se realizan viajes de campaña de varios días, el equipo y equipaje que se transporta es mucho mayor; por ello, se deben reducir los envases grandes para transportar líquido conservante (alcohol 70%). De este modo, un buen método para transportar los ejemplares hasta el lugar de destino es la cama de fijación. Es decir, se puede prolongar el proceso de fijación de los ejemplares dejándolos en la cama de fijación por los días que dure la campaña. Ya en el laboratorio, se da inicio al lavado de los individuos para su posterior conservación en alcohol 70%.

### **Conservación de ejemplares**

La conservación de los ejemplares es mucho más sencilla, y es el paso a seguir, luego del lavado de los individuos. Como ya se viene mencionando en este apartado, la conservación se realiza con alcohol al 70%. Se aconseja utilizar frascos de vidrio para almacenar anfibios; en lo posible se recomienda que las tapas sean de metal. Los frascos de mermeladas, pickles, anchoas funcionan muy bien como contenedores. Para resguardar las tapas de los vapores de alcohol se debe colocar un plástico no muy grueso cubriendo toda la boca del frasco, incluso dejando un excedente a modo de “pollerita” por fuera de la tapa. Los plásticos transparentes que se usan como mantel o para el forrado de libros y cuadernos, llamados cristal o hule son idóneos. También se puede economizar utilizando el plástico envoltorio de los packs de gaseosas; que puede solicitarse en los supermercados o almacenes antes de ser desechados. Finalmente, no se debe olvidar de rotular el frasco con el contenido líquido y detallando el taxón incluido.

### **Eutanasia**

Etimológicamente, la palabra eutanasia proviene del latín *euthanasia*: que significa ‘muerte sin dolor’ y del griego antiguo *εὐθανασία* /*euthanasía*: ‘muerte digna’. En sentido aplicativo: es el “arte de sacrificar o matar animales de forma piadosa, evitando el sufrimiento físico y psíquico”<sup>(3)</sup>. Este autor propone que una eutanasia bien realizada es aquella que logra con rapidez el estado de inconciencia del individuo hasta alcanzar la muerte.

A lo largo de los años, las prácticas de eutanasia en anuros han ido evolucionando paulatinamente a raíz de nuevos estudios sobre la incidencia de fármacos en este grupo de vertebrados. Anteriormente, una de las prácticas más efectivas eran los métodos físicos como el desmedulamiento y la exposición a bajas temperaturas. La técnica de desmedular sigue siendo una de las más efectivas ya que provoca una muerte rápida y sin dolor, sin embargo requiere de mucho entrenamiento y práctica por parte de la persona que lo realiza. Dado que estos ejemplares serán vouchers de trabajos científicos incorporados a colecciones biológicas, los cuales pueden ser utilizados para estudios posteriores, es necesario tener en cuenta que en la práctica de este método perjudicamos anatómicamente al ejemplar.

La técnica de enfriamiento y congelación, antiguamente muy utilizada y efectiva, recibió muchas críticas por parte de algunos científicos y Comités de Ética, los cuales a través de mucha insistencia, prohibieron su uso. La principal causa del conflicto hace referencia a la formación de cristales de hielo en los tejidos cuando se expone al animal a bajas temperaturas mientras aún está consciente, provocando esto un intenso dolor. Cabe destacar, que el argumento sobre la prohibición de esta técnica de enfriamiento y congelación carece de una base empírica. Recientemente, varios científicos han realizado numerosas investigaciones sobre esta técnica de eutanasia, principalmente refrescando conceptos sobre la biología térmica y los efectos fisiológicos en respuesta a las bajas temperaturas de los herpetozoos. Aquí, los investigadores ponen en duda que estos taxones experimenten dolor alguno al enfriamiento, dado que existen especies adaptadas a fuertes variaciones térmicas extremas que carecen de receptores de respuesta al frío. De hecho, los resultados de los estudios, principalmente basados en nociceptores -receptores sensoriales del sistema nervioso central, especializados en proporcionar información sobre el daño tisular-, evidencian que la asociación del dolor con el enfriamiento y congelación no es posible, ya que las bajas temperaturas eliminan la actividad cerebral de los ectotermos. En conclusión, cuando los cristales de hielo se forman en los tejidos periféricos, el cerebro está casi tan frío como esos tejidos; y por lo tanto, es incapaz de percibir o responder a los nociceptores<sup>(4)</sup>.

Con respecto a los usos de fármacos, técnicas ya más actuales, se puede mencionar al metanosulfonato, más conocido como MS222, el cual es uno de los anestésicos más utilizados en acuicultura en la Unión Europea y Estados Unidos desde su introducción en 1967. Existen publicaciones científicas argentinas donde se utiliza el MS222; de todas maneras es un fármaco poco usado por inconvenientes en la accesibilidad y por costo económico.

En Argentina el uso de fármacos en la eutanasia de anfibios, ha generado resultados muy efectivos, prácticos y económicos. El fármaco utilizado por excelencia son los geles tópicos odontológicos a base de benzocaína en distintos porcentajes que se consiguen en farmacias, son de venta libre y de muy fácil aplicación. El intercambio de gases a través de la piel que poseen los anfibios favorece directamente la absorción del anestésico, y esto genera un efecto eficaz. Sin embargo, es necesario decir que se ha observado una reacción diferente al anestésico entre los distintos géneros de anfibios, etapas de vida e incluso condiciones de manipulación y estrés.

Una de las marcas de anestésicos que más se sabe sobre su aplicación y efecto es Muelita® de Laboratorios CABUCHI, que se encuentra en su presentación en gel y líquida en concentraciones de 2%, 5%, 10% y 20% FORTE. Es necesario aclarar que en varios casos las concentraciones no son directamente proporcionales al tamaño del individuo, pero si están relacionadas con algunas especies. Esto se puede atribuir a que intervienen factores de las pieles de algunas especies. Por ejemplo, en el caso de los Microhylidos. Convencionalmente se utiliza Muelita® al 10%, incluso en animales más grandes como sapos y escuerzos, pero en los ejemplares de *Elachistocleis*, se ha tenido que recurrir a Muelita® 20% FORTE. En el caso de *Dermatonotus muelleri*, no sólo se utilizó la concentración de 20%, sino que la dosis aplicada tuvo que ser mayor.

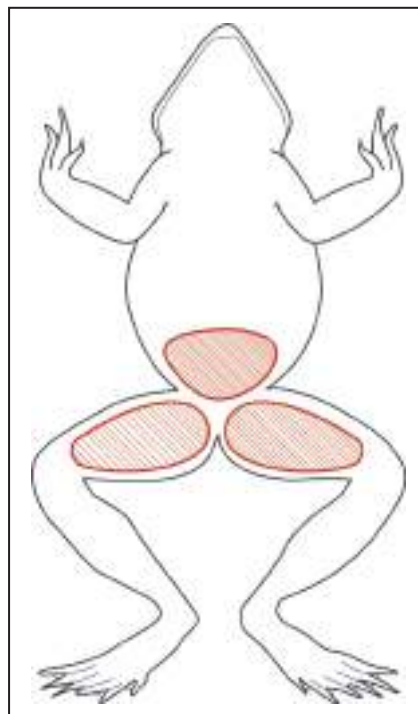
Al momento de la captura o traslado, tanto en adultos como juveniles y larvas, se corre el riesgo de provocarles estrés. Definitivamente, esto influye directamente en la aplicación del anestésico. Por ello, se aconseja evitar movimientos bruscos o sacudidas de las bolsas plásticas que contienen los adultos capturados, o los recipientes con larvas. Además, no debe dejarse los ejemplares por tiempo prolongados en las bolsas; si bien, se sabe que hay situaciones extremas en que quedan expuestos por mucho tiempo, se sugiere abrir las bolsas y renovar el aire (no soplar dentro de la bolsa, ya que se introduce nuestro deshecho de la respiración, el dióxido de carbono). Por último, colocar un poco de agua en forma de lluvia dentro de la bolsa, si el tiempo de traslado es corto. De lo contrario, se ha comprobado que incluir un poco del sustrato del lugar de la captura, ayuda a mejorar las condiciones del ejemplar. Este sedimento también ayuda a amortiguar los movimientos del traslado, evitando así el estrés del individuo. Retomando el tema, y en relación a lo antes detallado, algunas especies a causa de la deshidratación, suelen absorber agua rápidamente por los parches de la pelvis; provocando que al momento de colocar el gel anestésico, tiendan a eliminar agua por la cloaca. Cecala et al.<sup>(6)</sup>; proponen que en estas situaciones, los individuos podrían absorber más anestesia de la necesaria. Se ha observado que indivi-

duos de la familia Hylidae, puntualmente en *Phyllomedusa sauvagii*, siempre eliminaron agua por la cloaca. En *Pithecopus azureus*, algunas *Boana* y *Trachycephalus venulosus* existieron casos, muy pocos, en que no se produjo la eliminación de agua (Palomas S., obs. personal). Se considera, que esta respuesta está estrechamente relacionada no sólo con el estrés del ejemplar, sino que también son especies más propensas a la deshidratación.

### Aplicación del anestésico

La técnica es sumamente sencilla, se aplica el producto en los parches pélvicos y femorales; de modo que queden bien cubiertos por el gel. Es aquí donde los Hylidos mencionados suelen eliminar agua de sus cloacas. Se aconseja destinar un recipiente con tapa o bolsa plástica para colocar los individuos recién anestesiados, ya que el gel va quedando por las paredes de los contenedores. El tiempo de efecto del anestésico dependerá de muchos factores, pero por lo general, es entre 5 y 10 minutos. (**Figura 5.1.9**)

La falta de información publicada en los trabajos científicos o la omisión de la misma, sobre el método de eutanasia utilizado, -por ser un tema “tabú”- genera grandes vacíos de información. Publicar las metodologías y experiencias adquiridas sobre técnicas de eutanasia, favorecerá a enriquecer su práctica y uso. Además, junto a la información sobre la historia natural, la



**Figura 5.1.9.** Aplicación de anestésico en parches pélvicos de anuros. Ilustración: J. A. Ramírez.

diversidad histológica y las adaptaciones evolutivas de los herpetozoos, permitirán avanzar en el conocimiento sobre las variables y atributos fisiológicos únicos de estos animales. De esta forma, los aportes podrán ser considerados al momento de desarrollar e implementar pautas para la elección de anestesia y método de eutanasia en estudios científicos con anfibios<sup>(6)</sup>.

### **Anexo 5.1.1. LEY Nº 22.421**

#### **Ordenamiento legal que tiende a resolver los problemas derivados de la depredación que sufre la fauna silvestre.**

*Buenos Aires, 5 de marzo de 1981.*

*En uso de las atribuciones conferidas por el artículo 5º del Estatuto para el Proceso de Reorganización Nacional,*

**EL PRESIDENTE DE LA NACIÓN ARGENTINA SANCIONA Y PROMULGA CON FUERZA DE LEY:**

#### **CAPÍTULO I - DE LA CONSERVACIÓN DE LA FAUNA**

**ARTÍCULO 1º** – *Declárase de interés público la fauna silvestre que temporal o permanentemente habita el Territorio de la República, así como su protección, conservación, propagación, repoblación y aprovechamiento racional.*

*Todos los habitantes de la Nación tienen el deber de proteger la fauna silvestre, conforme a los reglamentos que para su conservación y manejo dicten las autoridades de aplicación.*

*Cuando el cumplimiento de este deber causare perjuicios, fehacientemente comprobados, los mismos deberán ser indemnizados por la vía administrativa, por el Estado Nacional o los provinciales en sus respectivas jurisdicciones, de conformidad con las disposiciones que dictarán al efecto las autoridades de aplicación.*

*En jurisdicción nacional, en caso de desestimarse total o parcialmente los reclamos formulados, los interesados podrán recurrir ante el Juez Federal competente, interponiendo y fundando recurso de apelación dentro de los quince (15) días hábiles de notificados de la resolución respectiva.*

**ARTÍCULO 2º** – *En la reglamentación y aplicación de esta ley las autoridades deberán respetar el equilibrio entre los diversos beneficios económicos, culturales, agropecuarios, recreativos y estéticos que la fauna silvestre aporta al hombre, pero dando en todos los casos la debida prelación a la conservación de la misma como criterio rector de los actos a otorgarse.*

## Anexo 5.1.2

### **GEPIN: NUEVA PLATAFORMA DIGITAL PARA LA GESTIÓN DE PERMISOS DE INVESTIGACIÓN EN ÁREAS PROTEGIDAS NACIONALES**

Autores: Sánchez M.E., Faure P. y L. Chust. 2021

Desde diciembre de 2020, se encuentra habilitada la nueva plataforma de Gestión de Permisos de Investigación (GEPIN), a través de la cual se pueden tramitar de forma virtual los permisos necesarios para desarrollar trabajos de investigación en áreas protegidas bajo tutela de la Administración de Parques Nacionales. A través del Sistema GEPIN, las y los investigadores podrán presentar solicitudes para la autorización de un nuevo proyecto de investigación, solicitar renovaciones de proyectos, acceder a permisos previos y documentos emitidos por APN. El procedimiento para cada tipo de gestión se encuentra detallado en la plataforma <https://sib.gob.ar/institucional/permisos-de-investigacion>, que en líneas generales se resume en los siguientes pasos:

1. Registro del/a investigador/a responsable en el sistema. Se accede al mismo mediante una dirección de correo electrónico y una clave privada, completando sus datos personales y filiación institucional. Deberá además confirmar en cuáles de los proyectos que se encuentran cargados en la base de datos del sistema, que contienen su nombre y/o DNI, participó. Esto permitirá que el sistema compute estos proyectos en su historial de usuario GEPIN, haciendo más accesible esa información a la hora de querer renovar un permiso de investigación. Antes de iniciar cualquier trámite en el sistema, deberá aceptar los términos y condiciones establecidos por la APN (Reglamento de Investigación).

2. Solicitud de autorización de investigación. Deberá llenar el Formulario de Solicitud de Autorización (o permiso) de Investigación en línea (recordando guardar siempre los cambios). Una vez completo, el sistema lo conducirá a una previsualización del formulario, el que deberá imprimir, firmar y subir a la plataforma como documento obligatorio. Así mismo deberá adjuntar: proyecto de investigación, declaración jurada de contratación de seguro o constancia del mismo, y aval institucional; una vez adjuntos, se selecciona la opción “solicitar permiso”.

3. Evaluación de la solicitud. De acuerdo a las áreas protegidas involucradas, el sistema derivará la solicitud, de manera automática, a la Dirección Técnica correspondiente, donde se evaluará y verificará la presentación de toda la documentación. En caso de existir observaciones, necesidad de ampliación de información, o requerimiento de alguna documentación adicional, la Dirección enviará un pedido de correcciones a través de la plataforma, a las cuales el investigador podrá responder vía sistema o correo electrónico dependiendo de qué se trate. Cuando toda la información se encuentre debidamente completada, el/la investigador/a recibirá un correo electrónico, indicando que su Solicitud ha sido Pre Aprobada, es decir que se encuentra en condiciones de enviar por correo postal el Formulario de Solicitud firmado y Aval Institucional original a la oficina técnica interviniente en la evaluación.

Actualmente se está gestionando ante el organismo competente, que todo el trámite pueda realizarse de manera virtual mediante la plataforma de Trámites a Distancia (TAD), cuya incorporación será debidamente informada en el Sistema.

4. Emisión de la autorización de investigación. La Dirección Técnica encargada de emitirla, cargará en el Sistema dicho documento (archivo con firma digital), llegando al investigador/a un aviso por correo electrónico de que el permiso fue emitido, quedando disponible en el GePIIn para su descarga. Recordamos que las autorizaciones de investigación se otorgan por un plazo máximo de un año, con posibilidad de renovación.

5. Desarrollo tareas de campo. Luego de obtenida la autorización de investigación, y previo a la realización de actividades en terreno, el/la investigador/a deberá presentar con antelación a su viaje, la constancia de seguro correspondiente (en caso de no haberlo hecho antes), y comunicarse con el Área Protegida a prospectar, a fin de coordinar su ingreso, estadía, completado de fichas de registro de recolección, guías de tránsito, etc.



## Anexo 5.1.3

**Logo Institucional y/o Académico**

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

Al Director/a - Secretario/a - SubSecretario/a - Ministro/a  
de la Dirección/Secretaría/SubSecretaría/ministerio

Sr./Lic./Gque./Ingeniero/Dr. **<nombre y apellido completo>**

S \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ D

En mi carácter de Investigador/a - Docente **<indicar dependencia a la que pertenece>** (Universidad, Facultad, Instituto, otro), tengo el agrado de dirigirme a Ud, con el fin de solicitar la autorización de permiso de colecta para estudios científicos **sobre.....** en la **Provincia de/ Área protegida**. Dicha actividad se realizarán en el marco del siguiente proyecto titulado: **<“colocar nombre de proyecto o plan de tesis”>**.

breve detalle sobre antecedentes en el tema (no más de 5 renglones), algunos objetivos del plan de trabajo o proyecto (no más de 5 renglones).

Se adjunta a la misma la nota de solicitud, **nota de aval de la institución, CV, proyecto de investigación y Formulario Anexo...**

Sin otro particular, lo/a saludo a Ud. con distinguida consideración.

**Firma**

**DNI y aclaración del solicitante**

## Anexo 5.1.4

**Logo Institucional y/o Académico**

Lugar y fecha \_\_\_\_\_

Al Director/a - Secretario/a - SubSecretario/a - Ministro/a

de la Dirección/Secretaría/SubSecretaría/ministerio

Sr./Lic./Gque./Ingeniero/Dr. **<nombre y apellido completo>**

S \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ D

Como Decano/a (de la Facultad de...) - Director/a (del Instituto de...); extendiendo mi aval al Dr/a - Lic. - Mgter. - Prof.- **<nombre y apellido del/la solicitante con DNI: ---.---.--->**, y su grupo de trabajo que se desempeñan como docentes investigadores en esta casa de estudios, a desarrollar las actividades de investigación enmarcadas en el proyecto **<“nombre del proyecto o plan de tesis”>**. Dicho proyecto, se realizará en.. **<“las instalaciones del Parque Nacional El Impenetrable, ubicado en la localidad de Miraflores Dto. General Güemes de la Provincia de Chaco”>**.

Las actividades a desarrollar por el Dr/a - Lic. - Mgter. - Prof. **<nombre del solicitante>** será de relevancia para nuestra institución, como así también para contribuir al conocimiento **<“de la diversidad de la herpetofauna en la región chaqueña”>**.

**Firma de la máxima autoridad****Decano/a (de la Facultad de...) - Director/a (del instituto de...)****sello**

## Bibliografía

1. Vaira, M.; Akmentins, M.; Attademo, M.; Baldo, D.; Barrasso, D.; Barrionuevo, S.; Basso, N.; Blotto, B.; Cairo, S.; Cajade, R.; Céspedes, J.; Corbalán, V.; Chilote, P.; Duré, M.; Falcione, C.; Ferraro, D.; Gutierrez, F.R.; Ingaramo, M.R.; Junges, C.; Lajmanovich, R.; Lescano, J.N.; Marangoni, F.; Martinazzo, L.; Marti, R.; Moreno, L.; Natale, G.S.; Pérez Iglesias, J.M.; Peltzer, P.; Quiroga, L.; Rosset, S.; Sanabria, E.; Sanchez, L.; Schaefer, E.; Úbeda, C. & Zaracho, V. 2012. Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26 (supl. 1): 131-160.
2. Scrocchi, G. & Kretzschmar, S. 1996. Guía de Métodos de Captura y Preparación de Anfibios y Reptiles para Estudios Científicos y Manejo de Colecciones Herpetológicas (Vol. 102). Fundación Miguel Lillo, Tucumán.
3. Bolant, B.; Calvo, M.A.; Cejalvo, D.; Gimeno, L.O.; Gimeno, L. & Lloris, J.M. 1990. La Eutanasia en los Animales de Laboratorio. Centro de investigación. Hospital General Universitario de Valencia. *Research in Surgery* 5.
4. Shine, R.; Amiel, J.; Munn, A.J.; Stewart, M.; Vyssotski, A.L. & Lesku, J.A. 2015. Is “cooling then freezing” a humane way to kill amphibians and reptiles? *Biology Open* 4: 760-763.
5. Cecala, K.K.; Price, S.J. & Dorcas, M.E. 2007. A comparison of the effectiveness of recommended doses of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and Orajel® (benzocaine) for amphibian anesthesia. *Herpetological Review* 38: 63.
6. Lillywhite, H.B.; Shine, R.; Jacobson, E.; DeNardo, D.F.; Gordon, M.S.; Navas, C.A.; ... & Burghardt, G.M. 2017. Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: should hypothermia and freezing be prohibited? *BioScience* 67: 53-61.

# Casos de Estudio

---

## 6.1 MONITOREO DE ANFIBIOS EN LOS PARQUES NACIONALES PATAGÓNICOS: PROTOCOLOS AD HOC PARA ESPECIES DE VERTEBRADOS DE VALOR ESPECIAL

Hernán Pastore<sup>1</sup> & Carmen Úbeda<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dirección Regional Patagonia Norte, Administración de Parques Nacionales, Bariloche, Argentina.

<sup>2</sup> Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina.

Desde la perspectiva de la Biología de la Conservación resulta claramente importante decidir sobre qué especies deberían dirigirse los esfuerzos de conservación más urgentemente, dado que el tiempo y los recursos con que se cuenta son generalmente limitados<sup>(1,2)</sup>. Los principales criterios utilizados para seleccionar a estas especies, explícita o implícitamente, son: su vulnerabilidad a la extinción (especies amenazadas, como *Rhinoderma darwini*), ser indicadoras del estado de conservación del ecosistema o de procesos ecológicos importantes (especies indicadoras, como *Atelognathus patagonicus*), ser responsables de cambios físicos o procesos significativos en el ecosistema (especies clave, como *Alsodes gargola* en lagunas altoandinas), ser representantes carismáticos de un ecosistema en particular (especies bandera o embleáticas, como *R. darwini*), o bien estar particularmente valoradas por sus servicios o significados para las comunidades locales (especies de valor cultural), entre otras características posibles y no mutuamente excluyentes<sup>(1,2)</sup>. Pese a los inconvenientes para la correcta identificación de estas especies de interés particular o **especies focales**, fijar la atención en un número limitado de especies tiene enormes ventajas prácticas para la aplicación de este concepto a casos concretos de gestión.

En este marco de **especies focales**, los esfuerzos de conservación se dirigen hacia estas especies, pero bajo un objetivo mayor: lograr la conservación del ecosistema. Por ejemplo, al invertir esfuerzo en proteger a una especie “paraguas” (especies con grandes requerimientos de hábitat y/o recursos), se garantiza la protección de todo un ecosistema. En otros casos, la especie focal actúa como “ingeniero de ecosistemas”, facilitando con su accionar la existencia de otras especies (e. g. la vizcacha crea madrigueras que utilizan numerosas especies de anfibios, reptiles, aves, etc.).

Desde 1994, la Administración de Parques Nacionales (APN) cuenta -para cada Parque, Reserva o Monumento Natural- con listados de especies animales autóctonas **de valor especial**, seleccionadas por su importancia de conservación. Esta selección se realiza en base a una serie de criterios explícitos, entre ellos: que estén amenazadas, poco representadas en el sistema de áreas protegidas, que sean clave para estructurar el ecosistema, o que estén valoradas por la sociedad.


De este conjunto de Especies de Vertebrados de Valor Especial, las Direcciones Regionales de la APN (unidades regionales que entienden en aspectos técnicos) seleccionan algunas sobre las cuales se realizan planes de monitoreo sistematizado que sirven como insumo para llevar a cabo estrategias de conservación.

Históricamente el esfuerzo de monitoreo se focalizó sobre algunos mamíferos y aves de manera poco sistemática (con excepción del huillín). A mediados de la primer década de este siglo, la Dirección Regional Patagonia Norte identificó la necesidad de diseñar **protocolos de monitoreo** estandarizados.

La rana del Challhuaco, *Atelognathus nitoi*, fue el primer anfibio seleccionado para ser monitoreado, por su condición de especie microendémica, la accesibilidad a su área de distribución y el conocimiento previo<sup>(3-5)</sup>. Es así que se elaboró un protocolo que pretende tomar conocimiento del estado del ambiente y actuar como alerta temprana ante la presencia de amenazas, además de registrar la ocurrencia de las diferentes etapas del ciclo de vida. Este protocolo incluye una parte introductoria dirigida al personal que realizará el monitoreo (en su mayoría guardaparques) sobre las características de la especie -y su diferenciación de otros anuros simpátricos-, su biología, sus requerimientos ecológicos y su hábitat, ilustrado con fotografías<sup>(6)</sup>. A continuación brinda un instructivo para la realización del monitoreo, que describe la frecuencia estacional de los relevamientos (para documentar los principales eventos dentro del ciclo anual), las coordenadas de las lagunas a monitorear y las instrucciones para completar la planilla de registro de datos (**Figuras 6.1.1 y 6.1.2**). Cabe aclarar que para llevar a cabo el monitoreo no es necesario que el observador busque activamente ejemplares o masas de huevos (sólo se registran los que se observan eventualmente), ya que el monitoreo tiene como objetivo principal evaluar el estado del ambiente y detectar las amenazas presentes.

Un análisis reciente de 13 años de monitoreo de *A. nitoi* permitió corroborar la persistencia de la especie, su reproducción en todas las lagunas monitoreadas y detectar cambios en las amenazas a la población, cuyo análisis permitió elaborar recomendaciones y diseñar medidas correctivas<sup>(7)</sup>.

Siguiendo este mismo esquema, luego se elaboró el protocolo para *Atelognathus patagonicus*, endémica del PN Laguna Blanca y alrededores<sup>(8)</sup>, al que siguieron los de *Rhinoderma darwini* y *Rhinella rubropunctata*<sup>(9)</sup> que aún se encuentran en proceso de prueba de campo y finalización.



**PLANILLA DE MONITOREO DE LA  
POBLACIÓN DE RANA DEL CHALLHUACO**

N°:

OBSERVADOR: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

HORA: \_\_\_\_\_ ESTADO DEL TIEMPO: \_\_\_\_\_

De ser posible registrar temperatura en el sitio y fotografiar todo hecho relevante

**CARACTERÍSTICAS DEL SITIO**

**NOMBRE DEL SITIO** <sup>1</sup>: \_\_\_\_\_

**NIVEL DEL AGUA:**     ALTO     MEDIO     BAJO     SECO

**ESTADO DEL AGUA** (Completar porcentaje): Líquido \_\_\_\_ Congelado: \_\_\_\_

**CANTIDAD DE TRONCOS O RAMAS CAÍDOS EN EL LECHO O COSTA:**

ABUNDANTE     INTERMEDIO     ESCASO     AUSENTE

**PRESENCIA DE ALTERACIONES, IMPACTOS O DEPREDADORES**

**EVIDENCIA DE CABALLOS** (avistajes, bosteos, huellas, etc..)

ABUNDANTE     INTERMEDIO     ESCASO     AUSENTE

**EVIDENCIA DE VACUNOS** (avistajes, bosteos, huellas, etc..)

ABUNDANTE     INTERMEDIO     ESCASO     AUSENTE

**EVIDENCIA DE CIERVO ROJO** (avistajes, bosteos, huellas, etc..)

ABUNDANTE     INTERMEDIO     ESCASO     AUSENTE

**PRESENCIA DE SALMÓNIDOS:**     PRESENCIA     AUSENCIA

TAMAÑO APROXIMADO DE LOS EJEMPLARES: \_\_\_\_\_

**EVIDENCIA DE OTROS DEPREDADORES POTENCIALES** (zorro, zorrino, visón, carancho, etc.)

Especificar especie e intensidad: \_\_\_\_\_

Figura 6.1.1 Anverso de la Planilla de Monitoreo de *Atelognathus nitoi*.

**PRESENCIA HUMANA** (Describir y especificar el grado y la antigüedad)

PISOTEO: \_\_\_\_\_

BASURA: \_\_\_\_\_

CONTAMINACIÓN DEL AGUA: \_\_\_\_\_

FOGATAS: \_\_\_\_\_

VEHÍCULOS (bicicletas, motos, etc.): \_\_\_\_\_

FURTIVISMO de madera: \_\_\_\_\_

DRENAJES (zanjas, desagües, etc.): \_\_\_\_\_

CAZA FURTIVA \_\_\_\_\_

**OTROS DATOS COMPLEMENTARIOS:** \_\_\_\_\_

---



---

**OBSERVACIONES SOBRE LA PRESENCIA DE *Atelognathus nitoi***

**EJEMPLARES** (Indicar cantidad y largo)

ADULTOS     JUVENILES     RENACUAJOS     MASAS DE HUEVOS

**CANTO**  \_\_\_\_\_

**OTROS DATOS COMPLEMENTARIOS:** \_\_\_\_\_

---



---



---

Figura 6.1.2. Reverso de la Planilla de Monitoreo de *Atelognathus nitoi*.



## Bibliografía

1. Sutherland, W.J. 2000. *The Conservation Handbook: Research, Management and Policy*. Blackwell Science Ltd. Oxford.
2. Ojeda, V. & Pastore, H. 2016. Vertebrados de valor especial del Parque Nacional Nahuel Huapi. *Macroscopia* 5: 7-13.
3. Úbeda, C. 1999. La rana del Challhuaco (*Atelognathus nitoi*): Aspectos de su Biología, Conservación y Medidas de Protección. Informe elaborado para la Delegación Técnica Regional Patagonia de la APN. Bariloche.
4. Úbeda, C. 2006. La rana del Challhuaco: Biología y conservación. *Desde la Patagonia, difundiendo saberes* 3: 16-20.
5. Úbeda, C.; Zagarese, H.; Díaz, M. & Pedrozo, F. 1999. First steps towards the conservation of the microendemic Patagonian frog *Atelognathus nitoi*. *Oryx* 33: 59-66.
6. Pastore, H. & Úbeda, C. 2006. Protocolo de Monitoreo de la Población de Rana del Challhuaco. Delegación Regional Patagonia, Administración de Parques Nacionales. Bariloche, Argentina.
7. Pastore, H.; Úbeda, C.A. & Gutiérrez, M.A. 2020. Monitoreo de la Población de Rana del Challhuaco. Informe de resultados 2006-2019. IF-2020-12817266-APN-DRPN#APNAC. Dirección Regional Patagonia Norte, Administración de Parques Nacionales. Bariloche.
8. Pastore, H. & Cuello, M.E. 2009. Protocolo de Monitoreo de la Rana de la Laguna Blanca. Delegación Regional Patagonia, Administración de Parques Nacionales.
9. Úbeda, C. 2015. Apéndice II: *Rhinella rubropunctata* y Apéndice III: *Rhinoderma darwini*. En: Ojeda, V. (coord.); Cerón, G.; Ippi, S. & Úbeda, C. (eds.). Estudio de fauna de los Parques Nacionales del corredor de los lagos: Nahuel Huapi, Lanín, Lago Puelo y Los Alerces. Informe IV: Priorización de Especies de Vertebrados de Valor Especial (Tetrápodos) de los Parques Nacionales Lanín, Nahuel Huapi, Lago Puelo y Los Alerces, y propuestas para su conservación. Universidad Nacional del Comahue. Bariloche.

## 6.2 ESPECIES POCO FRECUENTES, ELUSIVAS O DESAPARECIDAS: CASO DE ESTUDIO DE LAS RANAS MARSUPIALES DEL GÉNERO *GASTROTHERCA* DE ARGENTINA

Mauricio S. Akmentins<sup>1</sup> & Martín Boullhesen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones de Biodiversidad Argentina (PIDBA), Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, San Miguel de Tucumán, Argentina.

En toda comunidad biológica siempre hay organismos que son más difíciles de detectar que otros. En el caso de los anfibios anuros existen especies que son naturalmente escasas o poco frecuentes de hallar, esto puede ser por su estilo de vida críptico, porque tienen un tipo de reproducción del tipo explosiva o porque su periodo de actividad no coincide con el de la mayoría de las especies. Ejemplos de esto son las especies arbóreas o especialistas de hábitat como la Rana Musgo (*Itapotihyla langsdorffii*), las ranas de las familias Microhylidae y Ceratophryidae que son de hábitos cavadores/fosoriales y de reproducción explosiva, o bien especies de hojarasca como el Sapo Yungueño (*Rhinella rumbolli*) que se reproduce en invierno, al contrario de la mayoría de las especies de esta ecorregión que se reproducen en primavera y verano. Otra causa para una baja detectabilidad de una especie puede deberse a una baja densidad de individuos a causa de una declinación poblacional. Esta dificultad para detectar estas especies puede representar un desafío a la hora de estudiarlas o realizar inventarios de diversidad de anfibios.

Un caso particular son las tres especies de ranas marsupiales del género *Gastrotheca* de Argentina. Estas ranas marsupiales son endemismos estrictos de la ecorregión de las Selvas de las Yungas en el noroeste de Argentina<sup>(1)</sup>, son anuros de hábitos de vida secretivos ya que viven ocultos en grietas de las rocas, troncos huecos (o huecos en los árboles) y dentro de bromelias epífitas<sup>(2)</sup>. El periodo de actividad de canto de los machos se da entre los meses de mayo y noviembre (principalmente durante el otoño y el invierno) y los renacuajos de las especies *G. chrysosticta* y *G. gracilis* sólo se los encuentra en microhábitats particulares como las vertientes temporarias en el interior de las selvas de las Yungas<sup>(2)</sup> (obs. pers.). Las tres especies de ranas marsu-

piales de Argentina se encuentran seriamente amenazadas de extinción<sup>(3,4)</sup>, lo cual se debe principalmente a una fuerte declinación las poblaciones de estas especies que llevó a su súbita desaparición en la década de 1990<sup>(5)</sup>. Dos de estas especies fueron redescubiertas luego de periodos de 20 y 25 años sin registros en la naturaleza<sup>(5,6)</sup>, pero la Rana Marsupial de Calilegua (*G. christiani*) aún continúa desaparecida desde el año 1996 a pesar de los denodados esfuerzos de búsqueda en años recientes<sup>(4)</sup>.

Trabajar con especies desaparecidas, al igual que con las especies poco frecuentes o elusivas, presenta una serie de desafíos particulares y requiere de un esfuerzo metodológico, logístico y presupuestario mayor que el requerido para trabajar con la mayoría de las especies de anfibios. Pero el desafío en común que representan es el definir el dónde, cómo y cuándo buscarlas.

Cuando se trabaja en un área geográfica donde sospechamos la presencia de una de estas especies raras, ya sea por registros de históricos de presencia o la localidad en cuestión se encuentra dentro del área geográfica de distribución conocida o estimada, lo primero que debemos hacer es recopilar la mayor cantidad de datos sobre la historia natural de la o las especies de interés. Si bien esto no es siempre posible para la anurofauna de Argentina<sup>(7)</sup>, el conocimiento de los hábitos de vida y fenología reproductiva ayudan a focalizar los esfuerzos de búsqueda y les dan un mejor marco temporal a las actividades de campo.

En el caso de los esfuerzos de búsqueda y monitoreo de las especies de ranas marsupiales de Argentina, se han empleado a lo largo de los años un conjunto de métodos de búsqueda activa y pasiva con disímiles resultados.

Sin lugar a dudas el método más efectivo para detectar estas ranas marsupiales ha sido la técnica estandarizada de búsqueda activa por encuentro visual o auditivo (ver **Sección 3.1 Relevamiento de anuros**). El problema de la búsqueda activa para este tipo de especies raras es que insume mucho tiempo y costos logísticos. Por lo general la búsqueda activa ha sido empleada en transectas lineales delimitadas por distancia o por tiempo. Por lo general las transectas de búsqueda activa fueron combinadas con puntos fijos de playback<sup>(8)</sup>. Esta técnica consiste en la reproducción continua del canto de anuncio de la especie objetivo con un sistema de reproducción de sonido (grabador de mano, parlantes bluetooth o dispositivo móvil) por un lapso de tiempo determinado (ej. durante 30 segundos) y luego escuchar si responde algún individuo. Las estaciones de playback se pueden fijar a tiempos o distancias determinadas dentro de una transecta de búsqueda activa o en caso de especies con requerimientos particulares de hábitat, se puede realizar una estación de playback cada vez que se encuentren estos hábitats a lo largo

de la transecta. En caso de disponer de los registros bioacústicos de la o las especies de interés, el playback del canto es una manera bastante efectiva de incrementar las posibilidades de localizar ejemplares machos de la mayoría de los anuros<sup>(9,10)</sup>, ya que esto dispara el comportamiento territorial emitiendo su canto de anuncio o vocalizaciones agresivas. El playback generalmente funciona mejor en especies de reproducción prolongada y con comportamiento territorial marcado, como los integrantes de las familias Hylidae, Leptodactylidae, Phyllomedusidae, Craugastoridae entre otras (obs. pers.). Otro factor a tener en cuenta a la hora de emplear esta técnica es la ventana temporal, ya que sólo es efectiva en la época reproductiva de la mayoría de las especies.

Otra de las metodologías ampliamente utilizadas para la búsqueda y monitoreo de ranas marsupiales ha sido el Monitoreo Acústico Pasivo (MAP) (ver **Sección 3.1.d**). En el caso de los ensambles de anuros de las selvas de Yungas, este método demostró ser igualmente efectivo para los relevamientos de riqueza de especies que la búsqueda activa por encuentro visual<sup>(11)</sup>. Como se trata de especies que se encuentran en localidades de difícil acceso y se requiere de un gran esfuerzo logístico y económico para realizar las campañas de relevamiento, la elección de los Grabadores Digitales Automatizados (GDAs) se basó en los siguientes parámetros: la duración de las baterías, una gran capacidad de almacenamiento y robustez del diseño (confiabilidad). Esto es debido a que los GDAs deben operar por largos períodos de tiempo en condiciones climáticas de alta humedad, intensas precipitaciones y extremos térmicos. Para el despliegue de los GDAs siempre se ponderó a localidades de ocurrencia histórica de las especies objetivo o de presencia probable en base del conocimiento de su biología y hábitos de vida. Los GDAs por lo general siempre han operado durante el año calendario en los puntos de MAP, pero en otras ocasiones su período de actividad se ha restringido sólo a los meses de otoño, invierno y principios de primavera (mayo a noviembre) coincidente con la fenología de canto conocida para estas especies<sup>(2)</sup>. Los GDAs son programados para grabar un minuto cada 19 minutos para obtener un total de 3 registros bioacústicos por hora durante las 24 horas del día; esta configuración maximiza la posibilidad de detectar especies con actividad de vocalización errática o extendida durante el día. Las grabaciones se realizan preferentemente en mono (utilizando sólo uno de los micrófonos del GDA) y restringiendo la banda de frecuencia del registro bioacústico a 16 KHz. Esto se debe a que los archivos de sonidos ocupan menos memoria y también al restringir la banda de frecuencia a la que se graba se facilita la revisión de los espectrogramas en caso de identificación manual o su reconocimiento a través de softwares de identificación automática de cantos. Es imprescindible contar con la descripción del canto de las especies objetivo

a relevar mediante MAP para poder lograr la identificación positiva de las mismas en los registros bioacústicos, en el caso de las ranas marsupiales de Argentina existen descripciones formales o reportes informales de sus cantos de anuncio<sup>(12,13,14)</sup>.

Esta es una compilación de las lecciones aprendidas en más de una década de trabajo con ranas marsupiales pueden ser aplicables a otras especies y ecosistemas, siempre y cuando sean adaptadas según el conocimiento previo que se tenga a la hora de encarar un trabajo con anfibios que representan un desafío para registrarlos o monitorearlos. Se destaca el potencial del MAP para el monitoreo de especies poco frecuentes o de hábitos de vida crípticos que habitan en lugares remotos, de difícil acceso o en condiciones climáticas desafiantes para su investigación a campo.

## Bibliografía

1. Lavilla, E.O. & Heatwole, H. 2010. Status of Amphibian Conservation and Decline in Argentina: 30-78. *En*: Heatwole, H.; Barrio-Aromós, C.L; Wilkinson, J.W. (eds.). Amphibian Biology. Volume 9. Status of Decline of Amphibians of Western Hemisphere. Issue Number 1: Paraguay, Chile and Argentina. Surrey Beatty & Sons, Australia.
2. Laurent, R.F.; Lavilla, E.O. & Terán, E.M. 1986. Contribución al conocimiento del género *Gastrotheca* Fitzinger (Amphibia: Anura: Hylidae) en Argentina. *Acta Zoológica Lilloana* 38: 17-210.
3. Vaira, M.; Akmentins, M.; Attademo, A.; Baldo, D.; Barrasso, D.; Barrionuevo, S.; Basso, N.; Blotto, B.; Cairo, S.; Cajade, R.; Céspedes, J.; Corbalán, V.; Chilote, P.; Duré, M.; Falcione, C.; Ferraro, D.; Gutiérrez, F.; Ingaramo, M.R.; Junges, C.; Lajmanovich, R.; Lescano, J.N.; Marangoni, F.; Martinazzo, L.; Marti, R.; Moreno, L.; Natale, G.S.; Pérez Iglesias, J.; Peltzer, P.; Quiroga, L.; Rosset, S.; Sanabria, E.; Sánchez, L.; Schaefer, E.; Úbeda, C. & Zaracho, V. 2012. Categorización del estado de conservación de los Anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26: 131-159.
4. IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. Disponible en <https://www.iucnredlist.org>. Consultada el 24 de junio de 2021.
5. Akmentins, M.S.; Pereyra, L.C. & Vaira, M. 2012. Using sighting records to infer extinction in three endemic Argentinean marsupial frogs. *Animal Conservation* 15: 142-151.
6. Akmentins, M.S.; Boullhesen, M.; Bardavid, S.; Espinoza, C.J. & Falke, F. 2018. Rediscovery of *Gastrotheca chrysostricta* Laurent, 1976 (Anura: Hemiphraactidae) in Baritú National Park, Salta, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 32: 137-139.
7. Vaira, M.; Akmentins, M.S. & Lavilla, E.O. 2018. Plan de Acción para la Conservación de los Anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 32 (supl. 1): 1-56.
8. Sung, H.; Kim, S.; Park, S. & Park, D. 2005. Effectiveness of mating call playbacks in anuran call monitoring: A case study of three-striped pond frogs (*Rana nigromaculata*). *Integrative Biosciences* 9: 199-203.
9. Lehtinen, R.M. & Witter J.R. 2014. Detecting frogs and detecting declines: an examination of occupancy and turnover patterns at the range edge of Blanchard's cricket frog (*Acris blanchardi*). *Herpetological Conservation and Biology* 9: 502-515.
10. Allain, S.J.R. & Goodman, M.J. 2017. Using call playbacks to investigate a population of non-native midwife toads *Alytes obstetricans* (Laurenti, 1768) in Cambridge, UK. *The Herpetological Bulletin* 140: 28-30.
11. Boullhesen, M.; Vaira, M.; Barquez, R.M. & Akmentins, M.S. 2021. Evaluating the efficacy of visual encounter and automated acoustic survey methods in anuran assemblages of the Yungas Andean forests of Argentina. *Ecological Indicators* 127: 107750.

12. Vaira, M.; Ferrari, L. & Akmentins, M.S. 2011. Vocal repertoire of an endangered marsupial frog of Argentina, *Gastrotheca christiani* (Anura: Hemiphractidae). *Herpetology Notes* 4: 279-284.
13. Akmentins, M.S.; Bonduri, Y.V; Contreras, P; Francisconi, L.E.; Massabie, P.J. & Santillán, J. 2014. Redescrición del canto de anuncio de *Gastrotheca gracilis* Laurent, 1969 (Anura: Hemiphractidae) y primer registro para el Parque Nacional Campo de Los Alisos, Tucumán, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 28: 147-152
14. Akmentins, M.S. & Boullhesen, M. 2020. The advertisement call of *Gastrotheca chrysosticta* Laurent, 1976 (Anura: Hemiphractidae). *Zootaxa* 4895: 297-300.

## 6.3 GIGANTE DE LAS PAMPAS. UN PROGRAMA DE CIENCIA CIUDADANA APLICADO A LA CONSERVACIÓN DEL ESCUERZO (*CERATOPHRYS ORNATA*)

Camila Deutsch<sup>1,2</sup> & Gabriela Agostini<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires. Grupo de Estudios sobre Biodiversidad en Agroecosistemas. Ciudad Universitaria, Pabellón II. Güiraldes 2160, C1428EGA, CABA, Argentina.

<sup>2</sup> COANA, Conservación de Anfibios en Agroecosistemas, La Plata, Argentina.

El Escuerzo (*Ceratophrys ornata*) es un anfibio que habita los pastizales templados del Cono Sur. La distribución histórica incluye la Región Pampeana argentina, los departamentos de San José y Rocha en Uruguay y el estado de Rio Grande do Sul en Brasil<sup>(1)</sup>, aunque en estos dos últimos países la especie no ha sido registrada desde 1982<sup>(2)</sup>. La UICN propone el estatus de conservación Casi Amenazada<sup>(3)</sup>, mientras que es considerada Vulnerable en Argentina<sup>(4)</sup> y Uruguay<sup>(2)</sup> y Críticamente Amenazada en Rio Grande Do Sul<sup>(5)</sup>.

En el 2015, se creó el proyecto de conservación “Gigante de las Pampas” (<https://gigantedospampas.wixsite.com/argentina>) en respuesta a las disminuciones poblacionales y extinciones locales del Escuerzo. Para el momento, se desconocía la distribución actual de la especie dado que los datos de ocurrencia recientes eran escasos o se basaban en descripciones anecdóticas y registros no corroborados. De esta manera, el primer objetivo fue definir la ocurrencia actual de la especie en Argentina para delinear futuras acciones de investigación y conservación<sup>(6)</sup>.

La dificultad de detección del Escuerzo había limitado, hasta el momento, la realización de estudios de historia natural y poblacionales y en consecuencia un apropiado análisis, basado en evidencia, de las causas que podrían estar generando las declinaciones. A tal efecto y como complemento a monitoreos de campo, se desarrolló un programa de CC en comunidades rurales de Argentina que reunió cerca de 150 registros, incrementando en un orden de magnitud la cantidad de registros publicados en el lapso de 10 años de investigaciones<sup>(6)</sup>. Además, como parte de este estudio, se logró reconocer dos áreas ubicadas en la provincia de Buenos Aires donde la aparición de la especie es relativamente frecuente, exhibiendo una oportunidad para pro-

fundar en el conocimiento de los aspectos fundamentales de la biología del Escuerzo y poner a prueba acciones de conservación in situ. En el año 2018 el programa de CC se expandió a Brasil y Uruguay con el objetivo de reunir registros recientes del Escuerzo en ambos países abarcando el completo rango de distribución histórica de la especie<sup>(7)</sup>. Actualmente, “Gigante de las Pampas” continúa vigente en Argentina, Brasil y Uruguay y lleva reunidos cerca de 900 registros confirmados del Escuerzo con fechas que van desde 1940 a 2021.

Como ya se mencionó (**ver Sección 4.13 Ciencia Ciudadana**), lograr la participación de la ciudadanía en iniciativas de CC que involucran la toma de datos de un grupo taxonómico poco carismático representa un importante desafío<sup>(8)</sup>. Por eso, resultó de vital importancia conocer en detalle la metodología que mejor aplica al contexto y a los objetivos del proyecto. En el caso del programa de CC “Gigante de las Pampas” se trabaja con dos formatos de encuesta<sup>(6)</sup>: online y presencial. Ambos formatos reúnen la misma información relativa al registro: fecha, lugar, coordenadas geográficas, tipo de ambiente, condiciones climáticas, número de individuos, sexo y comportamiento. La encuesta online se diseñó en la plataforma de Google Forms® y para su promoción se mantiene una intensa campaña por redes sociales (Facebook®, Instagram® y Twitter®). Dado que el Escuerzo es una especie de baja detectabilidad, se elaboró una estrategia para maximizar la obtención de registros. De esta manera, en días con fuertes precipitaciones durante la temporada reproductiva de la especie (primavera y verano), se comparten flyers por las redes sociales con la encuesta del registro, dado que esos momentos coinciden con la más alta probabilidad de encuentro. Las encuestas online permiten llegar a un gran número de personas y abarcar grandes áreas de extensión<sup>(9)</sup>, pero en zonas rurales donde la accesibilidad a internet es baja o cuando el público de interés es de edad avanzada, resulta necesario incorporar otras estrategias<sup>(10)</sup>. Por esta razón, se elaboraron encuestas presenciales que permiten alcanzar un público diferente. Para promover la participación de la gente en lugares remotos se realiza un profundo trabajo de vinculación con entidades educativas y municipales. Así, se desarrollan charlas y talleres en escuelas, se concurre a programas de radio y televisión local, y se presenta un stand del programa de CC en distintas fiestas regionales. Es importante, en este punto, resaltar el rol preponderante que juegan las actividades educativas y de comunicación en la sensibilización del público sobre temáticas de conservación de la biodiversidad. En definitiva, es este interés el que llevará a las personas a involucrarse en un programa de CC<sup>(11)</sup>.

A la hora de diseñar un proyecto de CC es de vital importancia abordar seriamente cuál es el método más conveniente de validación o verificación de



los datos<sup>(12)</sup>. En el caso del programa “Gigante de las Pampas” el método de validación de registros de las encuestas online requiere como condición, la presentación de una fotografía. En caso de no contar con una fotografía, se contacta directamente a la persona que cargó el registro y se le solicita información adicional sobre el tamaño, coloración y comportamiento del animal que avistó<sup>(6)</sup>. El Escuerzo presenta características que son únicas entre las especies de la región. Por ejemplo, es la única especie de anfibio que depreda sobre pichones (muchas veces pollos domesticados), y presenta un comportamiento defensivo muy peculiar que consiste en inflarse, abrir la boca y gritar. Si la información adicional presentada por los colaboradorxs incluye alguna de estas características únicas, el registro es considerado válido. Frente a un escenario dudoso, se opta por descartar el registro. Para el caso de las encuestas presenciales, el método de validación incluye la presentación de una lámina impresa que contiene seis fotografías de anfibios de distintas especies, entre ellas, el Escuerzo. Luego de realizar la encuesta, se invita a la persona encuestada a señalar en la lámina al “Escuerzo” que vió. También se usa como método de verificación, la aparición de las características distintivas ya mencionadas a lo largo del relato que acompaña al registro. Los resultados hasta el momento son contundentes y evidencian que aquellas personas que vieron efectivamente un Escuerzo lo reconocen de inmediato, incluso cuando el registro ocurrió muchos años atrás.

Las aplicaciones para dispositivos móviles y las plataformas web son cada vez más utilizadas en proyectos de CC<sup>(13)</sup>. Sin embargo, no siempre la implementación de estas herramientas conduce a resultados exitosos. En el caso del programa de CC “Gigante de las Pampas” cuyo objetivo era reunir registros de una única especie de anfibio, el desarrollo de una APP para el celular no brindó los resultados esperados. La APP “Escuerzo: Gigante de las Pampas” ([https://play.google.com/store/apps/details?id=io.ionic.conicet&hl=es\\_AR](https://play.google.com/store/apps/details?id=io.ionic.conicet&hl=es_AR)) disponible en Google Play Store® fue desarrollada por alumnos de la EESTN°1 de Santa Teresita en el 2018. Si un usuario encuentra un Escuerzo, desde la aplicación móvil puede tomar una foto, video o audio seleccionando la opción “Encontré un Escuerzo” y enviar el registro luego de completar sus datos personales (que son automáticamente guardados para una futura carga de datos). Este registro puede ser visualizado por las investigadoras en tiempo real. Lo más interesante de la información que obtiene la APP, es que además de llegar la foto, video o audio del ejemplar registrado, se obtienen automáticamente las coordenadas geográficas, fecha y hora del registro y condiciones meteorológicas (la APP obtiene esta información vinculándose con la estación meteorológica más cercana según las coordenadas geográficas detectadas). La posibilidad de obtener toda la información antes mencionada con la simple acción de enviar el registro desde el celular,

representa un avance y una ventaja a la hora sumar voluntarixs al programa de CC. Aun así, los registros obtenidos a través de la aplicación móvil fueron muy escasos en comparación con los obtenidos con las encuestas online y presenciales.

En las dos áreas prioritarias para la conservación del Escuerzo<sup>(6)</sup>, además de la estrategia de CC implementada para la recopilación de registros, este abordaje permitió visualizar nuevos objetivos como el entrenamiento y reclutamiento de voluntarixs para tareas de monitoreo, y el establecimiento de una red vecinal involucrada en la identificación de Escuerzos en situaciones de riesgo. En este sentido, las actividades de educación y extensión resultaron efectivas en la identificación y reconocimiento de actores locales que, dado su interés y participación activa, podían asumir roles activos en las actividades que el proyecto involucra. Una vez identificadas estas personas, se les brinda capacitaciones y el entrenamiento necesario para realizar actividades específicas de monitoreo. Además, las capacitaciones entrenan a lxs voluntarixs como replicadorxs del programa de CC, lo que aumenta la difusión y articulación del proyecto con la comunidad local. De esta manera, se incorporó al equipo 12 personas de distintas localidades de las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Córdoba. En la actualidad, estas personas están involucradas en monitoreos continuos de la especie y facilitan enormemente las tareas de investigación de este proyecto y que se focaliza en una especie con amplio rango de distribución.

En algunas localidades donde la aparición del Escuerzo es relativamente frecuente<sup>(6)</sup> y donde el programa de CC ha logrado un fuerte impacto en la comunidad, se estableció una red activa de vecinxs que, además de recopilar registros de la especie, dan aviso al encontrar un ejemplar en situación de vulnerabilidad (e.g. cruzando caminos, siendo atacado por un animal doméstico, encerrado en el patio de una casa, etc.). Estos registros se dan de manera cada vez más frecuentes en áreas de reciente urbanización, donde las poblaciones no han sido aun completamente desplazadas. De esta manera, se está trabajando en conjunto con los organismos estatales en una estrategia y protocolo de rescate y reubicación de individuos en áreas predeterminadas por las investigadoras del proyecto y por las autoridades de aplicación (OPDS y Dirección de Flora y Fauna provincial).

## Bibliografía

1. Maneyro, R. & Carreira, S. 2006. Herpetofauna de la costa uruguaya: 233-246. *En*: Mena-fra, R.; Rodríguez-Gallego, L.; Scarabino, F. & Conde, D. (eds.). Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre Uruguay, Montevideo, Uruguay.
2. Carreira, S. & Maneyro, R. 2015. Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Una

evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. DINAMA. Montevideo.

3. IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. Retrieved June 10, 2021, from <http://www.iucnredlist.org>.
4. Natale, G.S. & Salgado-Costa, C. 2012. *Ceratophrys ornata*: 177-178. En: Vaira, M.; Akmentins, M.; Attademo, M.; Baldo, D.; Barrasso, D.; Barrionuevo, S... Zaracho, V. (eds.). Categorización del estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 26 (supl. 1):
5. Secretaria do Meio Ambiente. 2014. Decreto N°51797. Declara espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Gabinete de Consultoria Legislativa.
6. Deutsch, C.; Bilenca, B. & Agostini, G. 2017. In search of the horned frog (*Ceratophrys ornata*) in Argentina: complementing field surveys with citizen science. *Herpetological Conservation and Biology* 12: 664-672.
7. Deutsch, C.; Marin da Fonte, L.F.; Maneyro, R.; Kindel, A.; Dallagnol-Vargas, N.; Duarte-Freire, M. & Agostini, G. 2018. In Search of the Giant of the Pampas: Gathering conservation efforts in Argentina, Brazil and Uruguay. *FrogLog* 26: 22-24.
8. Chase, S.K. & Levine, A. 2016. A framework for evaluating and designing citizen science programs for natural resources monitoring. *Conservation Biology* 30: 456-466.
9. Curtis, V. 2015. Online citizen science projects: an exploration of motivation, contribution and participation. PhD thesis The Open University.
10. Requier, F.; Andersson, G.K.; Oddi, F.J. & Garibaldi, L.A. 2020. Citizen science in developing countries: how to improve volunteer participation. *Frontiers in Ecology and the Environment* 18: 101-108.
11. Kobori, H.; Dickinson, J.L.; Washitani, I.; Sakurai, R.; Amano, T.; Komatsu, N. ... & Miller-Rushing, A.J. 2016. Citizen science: a new approach to advance ecology, education, and conservation. *Ecological Research* 31: 1-19.
12. Turnhout, E.; Lawrence, A. & Turnhout, S. 2016. Citizen science networks in natural history and the collective validation of biodiversity data. *Conservation Biology* 30: 532-539.
13. Sturm, U.; Schade, S.; Ceccaroni, L.; Gold, M., Kyba, C.; Claramunt, B.; Haklay, M.; Kasperowski, D.; Albert, A.; Piera, J.; Brier, J.; Kullenberg, C. & Luna, S. 2018. Defining principles for mobile apps and platforms development in citizen science. *Research Ideas and Outcomes* 4: e23394.

El objetivo principal de este Manual es el desarrollo de un compendio de técnicas y protocolos estándares para el inventario y monitoreo de poblaciones de anfibios, actualizado con los procedimientos, herramientas y técnicas de análisis más recientes y adaptado a las condiciones y realidades nacionales. Su contenido está destinado a ayudar a superar algunas de las dificultades que se pueden enfrentar al configurar un programa de inventario y monitoreo para anfibios. Pretendemos brindar una orientación práctica sobre cómo diseñar y llevar a cabo estudios que puedan servir para múltiples aplicaciones más allá de las necesidades de un proyecto particular. En este manual compilamos las experiencias y consejos de numerosos especialistas sobre diferentes temáticas que pudieran permitir a los lectores y usuarios de este manual obtener la mayor cantidad y calidad de datos durante la realización de futuros proyectos de investigación relacionados con estas temáticas.

Con esta propuesta intentamos volcar la experiencia recolectada durante años de trabajo, incorporando el suficiente detalle para garantizar el desarrollo de estudios reproducibles y comparables y proporcionando una referencia para futuros proyectos, relevamientos y/o monitoreos enfocados a la conservación de las especies de anfibios de nuestro país. Nuestra intención es que este manual sea ampliamente utilizado y estimule la recopilación de datos estandarizados y la colaboración entre proyectos dentro y entre disciplinas vinculadas al estudio de los anfibios en Argentina.

Buena parte de la información contenida en este Manual se refiere centralmente a anfibios de Argentina, pero consideramos que mucha de la información puede tener aplicaciones en muchos países de la región con los que compartimos muchas especies y ambientes. La estructura y el esquema para el Manual fue desarrollado por 53 autores en base a la experiencia; su conocimiento experto y los protocolos existentes en la literatura.

