



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

**Estudio de la biología reproductiva de guanacos
silvestres (*Lama guanicoe*) y su relación con factores
poblacionales aplicados a la conservación y el manejo
sustentable de la especie en zonas áridas**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología

Autora: Biol. Antonela A. Marozzi

Director: Dr. Pablo D. Carmanchahi

2021

Resumen

Mediante el estudio de la relación entre los procesos fisiológicos y la ecología poblacional es posible evaluar la influencia de las variaciones ambientales o de los efectos humanos sobre la fauna silvestre. En este sentido la endocrinología nos brinda información sobre factores fisiológicos como son la utilización de la energía o el estado de preñez que pueden ser utilizados para modelar parámetros poblacionales. Además, si la información endocrinológica se obtiene mediante metodologías no invasivas, no es necesaria la restricción física de los individuos evitando causar un estrés innecesario. Entonces, el estudio de los metabolitos fecales de progesterona y estrógenos tiene la potencialidad de brindar información sobre la proporción de hembras preñadas en una población y la tasa de natalidad. Además, si se relaciona con otros parámetros ecológicos como la supervivencia en las etapas críticas de la vida de los individuos (como el primer año de vida en los grandes ungulados), es posible conocer cuántos individuos se incorporan efectivamente a la población, es decir el reclutamiento poblacional.

El guanaco (*Lama guanicoe*) es el principal herbívoro nativo de la estepa patagónica. Comprender los mecanismos involucrados en su reproducción es fundamental para desarrollar estrategias de coexistencia con las actividades humanas. En esta tesis se estudiaron por primera vez aspectos de la endocrinología de las hembras de guanacos silvestres durante el proceso gestacional utilizando metodologías no invasivas y su aplicación a la ecología de poblaciones. Para ellos se plantearon los siguientes objetivos: 1) validar analíticamente una metodología no invasiva de diagnóstico de preñez, y desarrollar una herramienta que facilite el diagnóstico en poblaciones silvestres utilizando modelos predictivos; 2) realizar el seguimiento del proceso gestacional de un grupo de hembras de guanacos en cautiverio para validar biológicamente la medición de metabolitos fecales de hormonas sexuales como método de diagnóstico de preñez y evaluar el éxito gestacional en la población silvestre de La Payunia mediante el diagnóstico de la preñez temprana y avanzada; 3) proponer una metodología innovadora para el cálculo de la producción de crías utilizando el estado de preñez de las hembras y utilizarla para estimar el reclutamiento poblacional, 4) estudiar la serie de tiempo más larga de relevamientos poblacionales realizados en La Payunia en primavera, explorar las variaciones interanuales en las densidades de individuos en relación a la productividad primaria y su discutir estos resultados relacionándolos a la importancia de la nutrición para el desarrollo fetal y la lactancia.

Los resultados obtenidos indican que la utilización de metabolitos fecales para realizar el diagnóstico de preñez es adecuada principalmente al final de la gestación (i.e: primavera-comienzos del verano). La utilización de modelos predictivos para el diagnóstico de preñez facilitó su diagnóstico, se observó que cuando éste asigna una probabilidad de preñez mayor a 0,4 es aconsejable considerar a la hembra como preñada. El seguimiento del proceso gestacional en los guanacos en cautiverio indicó un aumento en las concentraciones de metabolitos fecales de progesterona y de estrógenos durante los últimos meses de gestación. Por otra parte, la metodología propuesta para estimar densidades de crías permitió realizar cálculos de reclutamiento con una precisión semejante o en algunos casos mejor a la de las metodologías tradicionales de recuento de animales y cálculo de densidades. La misma debería ser probada con un mayor número de muestreos y en otras poblaciones de guanacos para que pueda ser aplicada al manejo de la especie. También podría ser probada y utilizada en otros modelos biológicos. Esta herramienta complementa los métodos utilizados tradicionalmente para muestreos de grandes ungulados y los relaciona con la información proporcionada por los metabolitos fecales de hormonas sexuales.

Finalmente, las estimaciones de densidades de guanacos en La Payunia indicaron una marcada variabilidad interanual que se correlaciona con la productividad primaria. Esta información abre nuevas preguntas en torno a los factores fisiológicos que regulan la localización de los individuos en la zona y la utilización del espacio. Los resultados obtenidos en esta tesis amplían el conocimiento sobre la biología del guanaco y, además, proponen herramientas que podrían ser utilizadas para disminuir el impacto del manejo sobre las hembras y asegurar la viabilidad de las poblaciones.

Summary

By studying the relationship between physiological processes and population ecology, it is possible to evaluate the influence of environmental variations or human effects on wildlife. In this sense, endocrinology provides information on physiological factors such as energy utilization or pregnancy status that are useful to model population parameters. In addition, if endocrinological information is obtained through non-invasive methodologies, without causing physical restriction of individuals unnecessary stress is avoided. Furthermore, the study of fecal metabolites of progesterone and estrogens has the potential to provide information on the proportion of pregnant females and the birth rate in a population. Additionally, if it is related to other ecological parameters such as mortality in critical life stages of individuals (such as the first year of life in large ungulates), it is possible to know how many individuals are effectively incorporated into the population, i.e: population recruitment.

The guanaco (*Lama guanicoe*) is the most important native herbivore of the Patagonian steppe. Understanding the mechanisms involved in its reproduction is fundamental to developing strategies for coexistence with human activities. In this thesis, we studied for the first-time aspects of the endocrinology of wild guanaco females during the gestational process using non-invasive methodologies and their application to population ecology. The objectives of this research were: 1) analytically validate a non-invasive methodology for pregnancy diagnosis and develop a tool to facilitate its diagnosis in wild populations using predictive models; 2) follow up the gestational process of a group of captive guanaco females to biologically validate the measurement of fecal metabolites of sex hormones as a method for pregnancy diagnosis and evaluate gestational success in the wild population of La Payunia by diagnosing early and advanced pregnancy; 3) propose an innovative methodology for the estimate of calves production using females pregnancy status and, then apply it to estimate population recruitment; 4) study the longest time series of population surveys carried out in La Payunia in spring and explore interannual variations in guanaco's densities concerning primary productivity and discuss these results in connection to the importance of nutrition for fetal development and lactation.

The results obtained indicate that the use of fecal metabolites for pregnancy diagnosis is adequate, mainly at the end of gestation (i.e.: spring-early summer). The use of predictive models for pregnancy estimates facilitated its diagnosis. The results indicated that when the model assigns a probability of pregnancy greater than 0.4, it is advisable to consider

the female pregnant. The monitoring of the gestational process in captive guanacos indicated an increase in the concentrations of fecal metabolites of progesterone and estrogens during the last months of gestation. On the other hand, the proposed methodology for estimating offspring densities allowed to estimate recruitment with similar or, in some cases, better precision than traditional methodologies for counting animals and calculating densities. The method should be tested with more samples and in other guanaco populations to then be applied to the management of the species. It could also be tested and used in different biological models. This tool complements the imperfect detection methods and relates them to the information provided by fecal sex hormone metabolites.

Finally, estimates of guanaco densities in La Payunia indicated a marked interannual variability that correlates with primary productivity. This information opens new questions about the physiological factors that regulate the location of individuals in the area and the use of space. The results obtained in this thesis expand the knowledge on guanaco biology, and in addition, they propose tools that could be applied to reduce the impact of management on females and ensure the viability of the populations.

Tabla de Contenidos

Resumen	2
Summary	4
Agradecimientos	9
Capítulo 1: Introducción general	13
1.1. El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y el proceso gestacional en el guanaco	15
1.2. Distribución y ecología del guanaco	17
1.3. Sobre los objetivos e hipótesis de esta tesis	22
1.4. Áreas de estudio	23
1.5. Sobre los análisis estadísticos realizados	27
Capítulo 2: Un modelo predictivo para diagnosticar la preñez del guanaco utilizando metodologías no invasivas	30
2.1 Introducción	30
2.2: Objetivos, hipótesis y predicciones del capítulo	33
2.3. Materiales y métodos	34
2.3.1. Medición de hormonas en plasma.....	35
2.3.2 Análisis de muestras fecales.....	37
2.3.3. Comparación de las hormonas plasmáticas y los metabolitos fecales en hembras preñadas y no preñadas	41
2.3.4 Modelo de predictivo de diagnóstico de preñez.....	42
2.4 Resultados	44
2.4.1 Mediciones de E2 y P4 en el plasma.....	44
2.4.2 Validación analítica de la técnica no invasiva de detección de EC y PdG en muestras fecales.....	45
2.4.3 Determinaciones de metabolitos de EC y PdG en las heces	46
2.4.4 Concentraciones de hormonas plasmáticas y su relación con metabolitos fecales	47
2.4.5 Modelo predictivo de diagnóstico de preñez.....	48
2.5 Discusión	50
Capítulo 3: Validación biológica de la medición de metabolitos fecales de progesterona y estrógenos en guanacos. Utilización de la metodología en la población de La Payunia	54
3.1. Introducción	54
3.2. Objetivos, hipótesis y predicciones del capítulo	57
3.3. Materiales y Métodos	58
3.3.1. Estudio en condiciones de cautiverio	58
3.3.1.1. Declaración ética:.....	58

3.3.1.2. <i>Diseño experimental, condiciones de manejo de los animales y toma de muestras</i>	58
3.3.1.3. <i>Análisis de datos</i>	61
3.3.2. Estudio en condiciones silvestres	63
3.3.2.1. <i>Toma de muestras en el campo</i>	63
3.3.3. Análisis de laboratorio	64
3.4. Resultados	64
3.4.1. Diseño en condiciones controladas	64
3.4.2. Extrapolación de los resultados experimentales a la población silvestre	67
3.5. Discusión	69
Apéndice A1	74
Capítulo 4: Estimación del reclutamiento poblacional mediante el desarrollo de una metodología innovadora	78
4.1. Introducción	78
4.2. Objetivos, hipótesis y predicciones del capítulo:	84
4.3. Materiales y métodos	85
4.3.1 Relevamiento de datos bibliográficos sobre parámetros poblacionales de diferentes poblaciones de guanaco	86
4.3.2 Estimaciones de densidades de crías y cálculo de reclutamiento poblacional mediante la metodología tradicional	88
4.3.3 Estimaciones de densidades crías y cálculo de reclutamiento utilizando la proporción de hembras preñadas	92
4.3.4 Simulación de densidades de crías, cálculo de reclutamiento y ajuste de función de Ricker	96
4.4 Resultados	98
4.4.1 Relevamiento bibliográfico	98
4.4.2 Estimaciones de densidad	102
4.4.3 Estimaciones de reclutamiento mediante densidades alternativas y comparación con el reclutamiento utilizando densidades tradicionales	107
4.4.4 Modelo de simulación de densidades de crías y cálculo de reclutamiento	109
4.5. Discusión	110
Capítulo 5: Relación entre un indicador de la productividad primaria y la densidad de guanacos en La Payunia	119
5.1. Introducción	119
5.2. Objetivos, hipótesis y predicciones del capítulo	122
5.3. Materiales y métodos	123
5.3.1: Estimación de densidades poblacionales	123
5.3.2: Estimación de la un indicador de la productividad primaria	124

5.3.3. Análisis estadístico	124
5.4. Resultados	124
5.5: Discusión	128
Capítulo 6: Aportes originales realizados en esta tesis y perspectivas futuras	132
6.1. Relevancia del diagnóstico de preñez en el manejo de guanacos silvestres	134
6.2. Perspectivas futuras de investigación	137
6.2.1. Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre el éxito gestacional	137
6.2.2. Ecofisiología de las migraciones de guanacos	138
7. Referencias bibliográficas	140

Agradecimientos

Hay muchas personas e instituciones a las que me gustaría agradecer porque de una u otra manera contribuyeron a llevar adelante esta tesis. Por empezar, quisiera agradecer a mis padres Alejandra y Rubén, por su apoyo incondicional en todos los proyectos que emprendo, incluyendo esta tesis doctoral. También quiero dar las gracias Gusti, mi compañero de la vida, por estar a mi lado en esta aventura y animarse a compartir conmigo esta experiencia.

Me gustaría agradecerle a Pablo Carmanchahi que me aceptó en su grupo de trabajo, casi sin conocerme. Gracias a su filosofía “y si no probás negrita” y el hermoso grupo humano del Grupo de Ecofisiología de Fauna Silvestre (GIEFAS), pude llevar adelante este proyecto, proponer nuevas ideas, discutir experimentos, probar métodos, poner a punto técnicas. También quiero agradecer a la Dirección de Recursos Naturales Renovables de Mendoza por permitirme realizar mis investigaciones en La Payunia y a los guardaparques que generosamente nos hospedaron en su casa. Me gustaría mencionar especialmente a Edgardo, Marcos y Nahir, con ellos compartí la mayoría de las campañas, pero sin olvidar a Martín, Aníbal, Andrés y Carlitos. A toda la gente de la cooperativa Payún Matrú que me permitió quedarme en su campamento, participar de las esquilas, tomar muestras y, lo más importante, me enseñaron a bailar El Corridito. Me gustaría agradecer a mis compañeras y compañeros de campañas de La Payunia Antonella Panebianco, Facundo Gómez, Constanza Mozzoni, Gusti. Sin la colaboración de todas estas personas no hubiera podido llevar adelante este proyecto, he aprendido muchas cosas trabajando junto a ellos. Con Anto compartí mi primer campaña en La Payunia, con todo lo que eso implica y tuvo la dura tarea de hacer la transferencia horizontal del conocimiento de las dos principales habilidades que hay que desarrollar para ser miembro efectivo del GIEFAS: 1) identificar un guanaco haciendo caca y encontrar la muestra fresca en el campo (tarea que se dificulta aún más cuando se buscan sólo muestras de hembras) 2) contar guanacos, establecer sexo y clase etaria (esta última parece más fácil, hasta que los animales se empiezan a mover porque están en pleno proceso migratorio). A Facu, además de aguantarme en una campaña exprés en la que lo hice laburar a full (diez días para hacer relevamientos poblacionales, juntar muestras fecales, de vegetación y hacer registros de comportamiento), quería agradecerle por ayudarme a propagar los errores y hacer los cálculos diferenciales del capítulo 4 (nunca en mi vida pensé que iba a volver a calcular una derivada). Connie, primero nos dio una mano como pasante y

después compartimos una campaña para su tesina de Licenciatura. Gusti, además de ayudarme a contar guanacos y juntar heces, se puso al hombro, la conducción de la camioneta durante toda una campaña. Todos los que alguna vez tuvimos la oportunidad de conocer y manejar un vehículo en ese bello lugar que es La Payunia sabemos lo duro que puede ser recorrer los caminos de los petroleros, ¡se manejó todo! También quisiera agradecer a Ramiro Ovejero que generosamente compartió muestras de sus campañas conmigo y al resto de los miembros de GIEFAS que compartieron los datos de sus muestreos poblacionales para los capítulos 4 y 5: Natalia Schroeder, Pablo Gregorio, Pablo Moreno, Antonella Panebianco.

Además, me gustaría darle las gracias a la Dirección de Áreas Naturales Protegidas y Recursos Faunísticos de Neuquén por autorizar las actividades que realizamos en la Estancia Los Peucos. A la Estancia por permitirme participar de la esquila de guanacos y realizar la validación biológica de las mediciones de metabolitos fecales con animales de su plantel. Especialmente quisiera mencionar a Bertil Hoepke y Michelle Eyherabide, que generosamente me dejaron quedarme en las gamelas junto a su casa durante la validación biológica. Durante este experimento, además de los miembros sanmartinenses y junineses del GIEFAS, recibimos la colaboración de muchísimas personas. Acá hago una lista de los miembros del GIEFAS y no GIEFAS que participaron, sin su colaboración este trabajo no hubiera sido posible: Pablo Gregorio, Antonella Panebianco, Leonardo Leggieri, Virginia Rago, Mariana Carro, Gustavo Fernández, Facundo Gomez, Gabriel Stecher, Nicolás Carmanchahi, Luciano Rodríguez, Mateo Troncelitti, Ezequiel Fontalba, Silvina Orazi, Ezequiel Infantino, Ricardo Leggieri. Muy especialmente quisiera agradecer a Juliana Carmanchahi que me dio una mano gigante tomando notas durante los volteos de animales. También me gustaría mencionar a Joaquín Ladrón de Guevara que generosamente hizo las ecografías de las hembras sin cobrarnos un mango y agradecer a Fiamma Peña, nueva compañera del GIEFAS con quien compartimos principalmente la etapa de partos de las guanacas.

También me gustaría agradecer a Marina Ponzio y Verónica Cantarelli y al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA) de la Universidad Nacional de Córdoba y el CONICET. Allí pude realizar los dosajes de metabolitos fecales de progesterona y estrógenos. Además, tuve la suerte de que esas mediciones me llevaron una vez más a mi querida Docta y a trabajar en la universidad que me enseñó lo hermosa que es la Biología.

También me gustaría agradecer a la Universidad Nacional del Comahue, tanto al Centro Regional Universitario Bariloche como al Asentamiento Universitario San Martín de los Andes (AUSMA). En el laboratorio del AUSMA realicé los dosajes de hormonas plasmáticas, preparar las muestras para enviar al INICSA y realizar todo el trabajo de oficina de mi tesis con un hermoso grupo humano. Del cuerpo docente del AUSMA me gustaría mencionar especialmente a Romina González Musso que me enseñó cómo realizar los cálculos de productividad primaria mediante R. Otros docentes que ya he mencionado con los que compartimos diversas tareas y oficina son Gabriel Stecher y Facundo Gomez.

No puedo dejar de mencionar a los Gineceos, que, con pequeñas charlas, intercambios y alguna que otra videoconferencia siempre están presentes. Es hermoso que el amor por la Biología nos haya encontrado y que sigamos compartiendo historias, sueños, dudas y curiosidades. Es imposible pensar en ellas sin sonreír. Es hermoso ser parte de este equipo. También a mis amigas de la escuela, por estar ahí y compartir tantas historias. Me alegra haber encontrado tantas mujeres bellas con quienes compartir la vida. También quisiera mencionar a Ana Guzmán, con quien nos reencontramos en estos últimos años pandémicos y compartimos muchas charlas y alguna que otra caminata de catarsis.

Finalmente, pero no menos importante, pude llevar adelante esta tesis gracias a una beca del CONICET, a los financiamientos otorgados al GIEFAS por el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. También recibí el Latin American Student Field Research Award de la American Society of Mammalogists y equipamiento otorgado por Idea Wild. Sin todos estos fondos esta tesis no hubiera sido posible.

¡Gracias!

*A mis abuelas y abuelos que me dejaron
los más hermosos recuerdos...*

Capítulo 1: Introducción general

Del estudio de las relaciones del ambiente con el funcionamiento de los organismos surgieron disciplinas como la fisiología ecológica, la fisiología de la conservación y la endocrinología de la conservación (Wikelski y Cooke 2006, McCormick y Romero 2017). Mediante su estudio aprendimos la influencia de factores como la temperatura ambiente, la disponibilidad de nutrientes o incluso el cambio climático, sobre en las rutas metabólicas. Estos factores ambientales desencadenan diferentes tipos de respuestas fisiológicas, por ejemplo, las variaciones en las condiciones climáticas o en la productividad primaria, tienen un efecto sobre las concentraciones de glucocorticoides, que son mediadores fisiológicos que participan en la regulación de ajustes alostáticos del metabolismo (Romero et al. 2009). También, sabemos que diversos agentes químicos que se encuentran en el agua o el aire debido a la acción humana, pueden actuar como disruptores endócrinos alterando los mecanismos de señalización celular o la síntesis de hormonas, provocando consecuencias negativas a diversas escalas, como, por ejemplo, alterando la reproducción (Tubbs y McDonough 2018). Por lo tanto, estas disciplinas nos mostraron algunas consecuencias invisibles de la acción humana, permitiéndonos profundizar la comprensión del impacto de nuestro accionar sobre la naturaleza.

En este sentido, la endocrinología tiene un rol muy importante dado que, el sistema endócrino, junto con el sistema nervioso son los principales mecanismos de comunicación internos que tienen los vertebrados (McCormick y Romero 2017). Los mensajes enviados por los distintos órganos del sistema endócrino, surgen como respuesta a un estímulo que puede ser externo, como un cambio en la temperatura, o interno, como los mecanismos que regulan la producción de gametas. La endocrinología de la conservación ha destinado grandes esfuerzos a responder preguntas relacionadas a las posibles modificaciones en el metabolismo de los seres vivos frente a los cambios ambientales (McCormick y Romero 2017). Por ejemplo, el cortisol es una de las hormonas más utilizadas para evaluar respuesta metabólica ante variaciones en el ambiente porque participa en la regulación de los mecanismos alostáticos que aseguran el mantenimiento de la homeostasis (Romero et al. 2009, McCormick y Romero 2017). Esta disciplina también ha sido aplicada en diversos modelos biológicos como una herramienta de conservación ex – situ mediante el monitoreo de la actividad ovárica y mecanismos de reproducción in vitro (Kersey y Dehnhard 2014, McCormick y Romero 2017) y, además, se ha propuesto su aplicación

para el monitoreo de la preñez de fauna silvestre (Cain et al. 2012, Kersey y Dehnhard 2014). Asimismo, hasta el momento muchos estudios que tienen un abordaje desde estas disciplinas se quedan con las respuestas individuales y no llevan estos resultados a la escala poblacional (Wikelski y Cooke 2006, Bergman et al. 2019). Entonces, todavía queda pendiente desarrollar herramientas que efectivamente relacionen las diferentes escalas de análisis entre las variables ambientales, la fisiología y la ecología (Bergman et al. 2019).

Además de pensar en la influencia del ambiente sobre la fisiología de los organismos, podemos proponer que hay respuestas fisiológicas que influyen en el ambiente. Desde este punto de vista, se podría evaluar cómo determinados eventos fisiológicos afectan el fitness o la supervivencia y el éxito reproductivo de los individuos de una población (Madliger y Love 2015, Madliger et al. 2018). La reproducción es un buen ejemplo de cómo los mecanismos fisiológicos influyen en el ambiente porque durante el proceso gestacional ocurren una serie de eventos fisiológicos que tienen como consecuencia la producción de nuevos individuos que se suman a la población. Cuando hablamos de tasa de natalidad y producción de crías en Ecología de Poblaciones, estamos resumiendo la ocurrencia de una serie de mecanismos fisiológicos como la formación de gametas, la gestación, la lactancia que son necesarios para la incorporación de nuevos individuos en la población (Caswell 2001, Kersey y Dehnhard 2014). La interacción de éstos mecanismos con factores ambientales como los recursos disponibles, la depredación o el parasitismo son los que, luego, van a determinar el número de nacimientos y el reclutamiento poblacional (incorporación efectiva de individuos a la población, luego de la mortalidad mayor de crías durante los primeros meses de vida; Gaillard et al. 2008, Fowler y Bravo 2010, Decesare et al. 2012). Por ejemplo, si una madre se encuentra en mala condición corporal y la calidad de su leche no es buena o debe realizar un destete temprano, esto va a influir en la probabilidad de supervivencia de su cría (Russel et al. 1998). Esa cría no va tener las mismas posibilidades de sobrevivir a inviernos muy crudos, por ejemplo, que la cría de una madre con buena condición corporal (Bowyer et al. 2014). Desde este punto de vista, podríamos utilizar la información provista por la fisiología y más específicamente, por la endocrinología para predecir eventos que van a ocurrir a escala ecológica (Cain et al. 2012, Kersey y Dehnhard 2014, Madliger y Love 2015, Madliger et al. 2018, Bergman et al. 2019). Esta tesis se trata en parte de eso, de usar información endocrinológica para predecir datos ecológicos como la natalidad y el

reclutamiento en una población de guanacos silvestres (*Lama guanicoe*) del sur mendocino. Entonces, es necesario repasar algunos aspectos de la fisiología reproductiva y de la ecología poblacional del modelo de estudio.

1.1. El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y el proceso gestacional en el guanaco

Uno de los ejes ampliamente estudiado en los seres vivos es el eje hipotálamo hipófisis gonadal (Fig. 1.1) que regula gran parte de los mecanismos fisiológicos involucrados en la reproducción (Christensen et al. 2012, Plant 2015). En líneas generales, la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es secretada por el hipotálamo y activa la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) en la glándula pituitaria o hipófisis. La LH y FSH viajan por el torrente circulatorio hasta las gónadas donde activan la secreción de estrógenos y progesterona en las hembras y de testosterona en los machos (Fig. 1.1). En las hembras, la progesterona y los estrógenos regulan la producción de folículos en el ovario, el soporte de la fase lútea luego de la ovulación y el mantenimiento de la preñez. Para que ocurra la formación de un embrión luego de la cópula, el óvulo es liberado hacia el oviducto y este tiene que ser fecundado en un intervalo de tiempo relativamente corto, de lo contrario, ese óvulo muere (Christensen et al. 2012, Pinilla et al. 2012).

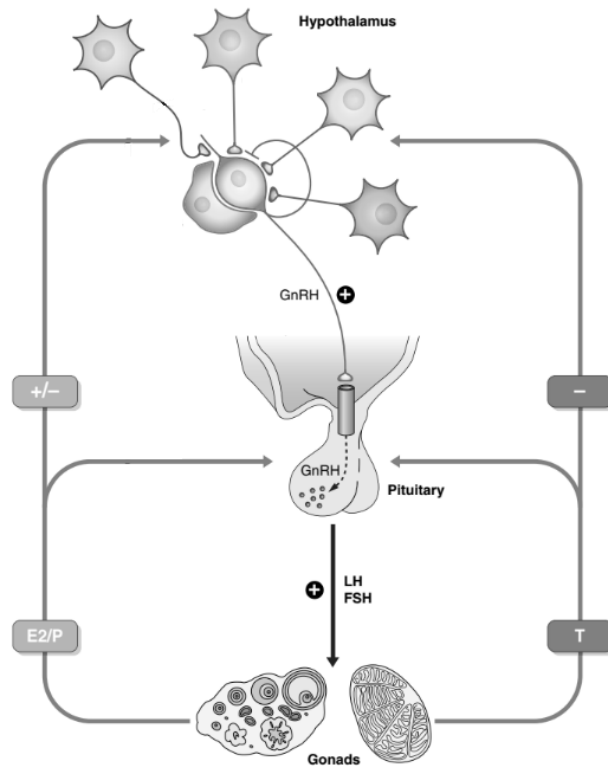


Fig. 1.1: Eje Hipotálamo – hipófisis – gonadal en mamíferos. El hipotálamo secreta GnRH (Hormona liberadora de gonadotropinas) que llegan a la hipófisis o glándula pituitaria que libera FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante). Estas hormonas se unen a tejidos específicos de las gónadas y estimulan la secreción de progesterona (P4) y estrógenos (E2) en hembras y testosterona (T) en machos. Estas hormonas desencadenan respuestas en ovarios y testículos como la producción de gametas y, además, realizan un feedback negativo o positivo según sea el caso, hacia el hipotálamo para aumentar o disminuir la secreción en esta glándula. Figura modificada de Pinilla et al. (2012).

Entre los mamíferos podemos diferenciar a los ovuladores espontáneos, como los humanos o roedores y a los ovuladores inducidos, como camélidos o los felinos (Bakker y Baum 2000). En las hembras de especies ovuladoras espontáneas, los esteroides secretados en el ovario por los folículos maduros inducen un patrón pulsátil de liberación de GnRH que estimula un aumento en las concentraciones de LH. Un pico en las concentraciones de LH es la principal señal de la hipófisis para que se dispare la ovulación. En los ovuladores inducidos, la liberación de GnRH preovulatoria y la posterior liberación de LH es inducida por el estímulo somatosensorial durante la cópula (Bakker y Baum 2000, Norris y Carr 2013). Este último es el caso de los camélidos sudamericanos, el pico de LH que dispara la ovulación está regulado por la cópula mediante la estimulación mecánica y por la presencia de un factor inductor de la ovulación en el semen (Vaughan 2011).

En general, los aspectos básicos de la endocrinología de los camélidos sudamericanos y puntualmente del guanaco son conocidos, aunque todos los estudios disponibles hasta el momento fueron realizados en condiciones de cautiverio (Tibary y Vaughan 2006, Riveros et al. 2009, 2010, 2015) mediante metodologías invasivas, y no se efectuaron estudios que impliquen el monitoreo de poblaciones silvestres, que brinden información sobre la preñez y el éxito del proceso gestacional en las mismas. Como se discutirá más adelante, esto ocurre porque muchas veces, la forma de evaluar este tipo de parámetros implica la restricción física de los animales y entonces, es desalentador conocer el estado de preñez en la fauna silvestres si eso causa un daño innecesario en el modelo bajo estudio. Entonces, se elige contar a las crías al pie y resumir todos los procesos fisiológicos que ocurrieron mediante ese recuento. Esto es así, no sólo en el guanaco sino en general en las especies de grandes mamíferos. En este sentido, la utilización de herramientas no invasivas, nos permite obtener parte de esta información para tener un monitoreo más completo de las poblaciones (Kersey y Dehnhard 2014).

1.2. Distribución y ecología del guanaco

Actualmente en Sudamérica hay cuatro especies de camélidos, dos de ellas son domésticas, la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*) y dos son silvestres, la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*). Los dos últimos son los herbívoros silvestres más importantes de las estepas y pastizales de Sudamérica y, por lo tanto, cumplen un rol fundamental para la supervivencia de esos ecosistemas (Vilá 2012). Entre las adaptaciones de los camélidos sudamericanos a los ambientes áridos podemos mencionar la presencia de almohadillas plantares que le brindan soporte en diferentes tipos de sustratos, la presencia de tres estómagos que facilitan la asimilación de nutrientes, labios hendidos que les facilitan el recorte de la vegetación y molares adaptados a la vegetación con elevada lignificación (Franklin 1982, Fowler y Bravo 2010). Estas adaptaciones son fundamentales para la supervivencia de estas especies. También contribuyen a la conservación de ecosistemas de elevada fragilidad como son la Puna y la Estepa Patagónica dado que los camélidos sudamericanos causan un menor impacto que el ganado introducido, porque las adaptaciones mencionadas anteriormente facilitan el rebrote de los pastizales (Vilá 2012).

El guanaco es el camélido sudamericano que ocupó originalmente la mayor diversidad de hábitats (Franklin 1983, Franklin et al. 1997). Actualmente las poblaciones de guanaco ocupan aproximadamente el 40% de la distribución original (Fig. 1.2), y si bien en la

Patagonia argentina y chilena se encuentran fuera de riesgo, en otros lugares de Argentina y del continente sudamericano, como en la puna y la región chaqueña argentina y paraguaya, sólo quedan poblaciones relictuales y, por lo tanto, la conservación de las mismas es fundamental (Fig. 1.3; Franklin et al. 1997, Baldi et al. 2016, Carmanchahi et al. 2019; Carmanchahi et al. en prensa-a). En general, la especie se localiza en ambientes con clima altamente estacional, con inviernos fríos o extremadamente secos, precipitaciones moderadas a altas a las que se les suma elevada evapotranspiración y baja productividad vegetal (Franklin 1982, 1983).

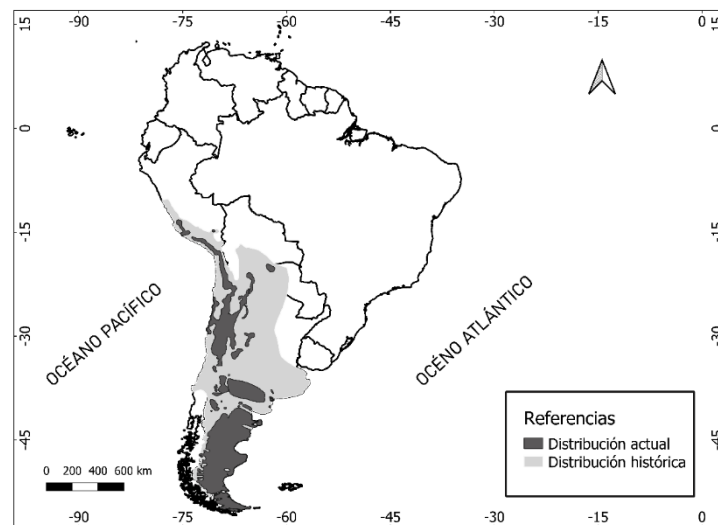


Fig. 1.2: Distribución actual e histórica del guanaco en Sudamérica (Carmanchahi et al. en prensa-a).

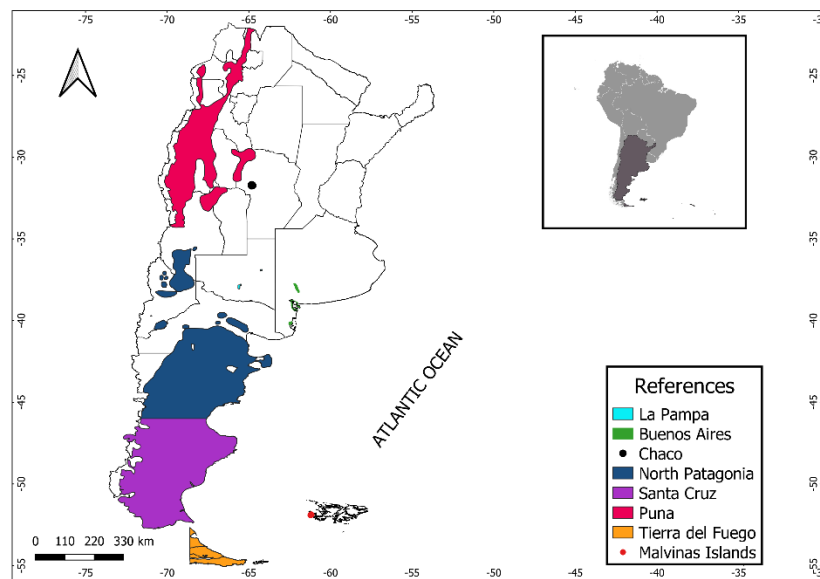


Fig. 1.3: Distribución actual de las poblaciones de guanacos en Argentina (Carmanchahi et al. en prensa-a).

Diversos estudios reportan la capacidad adaptativa de esta especie a diferentes ambientes y en relación a las actividades productivas. Se ha observado que el guanaco puede modificar su alimentación en aquellos hábitats en donde compite con el ganado menor, utilizando de forma diferencial el espacio y la vegetación (Raedeke 1979, Baldi et al. 2004). En este sentido, en ambientes donde no hay ovejas, la especie se alimenta principalmente de pasturas, en caso contrario, eligen otros arbustos (Raedeke 1979, Baldi et al. 2001). Además, se ha observado que en lugares en donde el agua es escasa, el ganado tiende a permanecer cerca de los puestos de los pobladores, mientras que el guanaco tiene un uso mayor del espacio dado que es un bebedor facultativo y, por lo tanto, no necesita acceso constante a este recurso (Schroeder et al. 2014). En general, el guanaco evita los espacios en los que se encuentran cabras y ovejas, posiblemente porque el ganado agota los recursos disponibles, aunque también podría deberse a la presión de cacería en los asentamientos humanos (Schroeder et al. 2013). El guanaco puede consumir forraje de menor calidad que las ovejas y, por lo tanto, tiene la capacidad de utilizar ambientes degradados en los que el ganado no puede sobrevivir, esto permitió el crecimiento de las poblaciones en algunos sitios de Santa Cruz y Chubut (Marino et al. 2020; Travaini et al. 2015). En estas provincias, las poblaciones de guanacos tienden a ser más abundantes en ambientes de baja productividad primaria, donde las ovejas están ausentes o en densidades muy bajas y en sitios alejados, tanto de las producciones petroleras como de las áreas urbanas (Pedrana et al. 2010, 2019).

Otra característica de la especie que le confiere una gran capacidad adaptativa es el comportamiento migratorio, observado en algunas poblaciones que presentan movimientos estacionales latitudinales y altitudinales (Franklin 1983). Los factores que regulan estos desplazamientos o, la ausencia de los mismos, no están totalmente comprendidos; posiblemente estén relacionado con la estacionalidad forrajera, dado que, durante un período del año, el pastizal está cubierto por la nieve (Fritz 1985, Ortega y Franklin 1995, Mueller et al. 2011, Bolgeri 2016).

El guanaco es una especie social y conforma diversos tipos de grupos. En una población de guanacos se pueden distinguir grupos familiares, grupos de machos solteros, grupos de hembras con crías, machos solitarios y grupos mixtos. Los grupos familiares están compuestos por un macho adulto y un grupo de hembras con sus crías que pueden permanecer junto a sus madres hasta los 15 meses de edad. El tamaño de este tipo de agrupación puede variar a lo largo del año porque las hembras de los grupos familiares

pueden alejarse o acercarse al grupo sin una mayor interferencia de los machos, en general los grupos familiares son más grandes en verano (Franklin 1983). Las agrupaciones de machos solteros están conformadas por machos jóvenes, no reproductivos y no territoriales, con un tamaño del grupo variable. Los machos solitarios son adultos sexualmente maduros que no forman grupos y pueden o no ser territoriales. Los grupos de hembras están formados por hembras maduras y añales que conservan a las crías de ambos sexos. En las poblaciones migratorias, además encontramos grupos mixtos conformados por machos adultos, hembras adultas y crías. Estos grupos se forman en el momento en que los animales realizan los movimientos migratorios (Franklin 1983, Ortega y Franklin 1995). En el guanaco, a diferencia de lo que ocurre con la vicuña, la cría del año anterior permanece junto a la madre hasta unos meses después del próximo parto (Franklin 1983). Esto implica que, durante un cierto tiempo, conviven la cría recién nacida (chulengo) con la cría de más de un año de edad (añal).

El guanaco, al igual que la vicuña y los camélidos sudamericanos domésticos, ha sido utilizado por los pueblos originarios sudamericanos como alimento y abrigo, y tienen una historia de convivencia con el hombre (Mengoni Goñalons 1995, Vilá 2012). En la región de la Puna, la primera utilización del guanaco fue mediante la caza oportunística, durante el Holoceno temprano (10000 AP), ya en el Holoceno medio (entre los 6500 y 3500 AP) hay evidencias de comienzos del proceso de domesticación del guanaco, que duró aproximadamente 2800 años y su resultado final fue la llama (Yacobaccio y Vilá 2013). En cambio, los pueblos originarios patagónicos, no realizaron un proceso de domesticación de la especie, sino que hacían un aprovechamiento completo de los guanacos cazados. La carne era una de sus principales fuentes de alimento, además de la médula de los huesos largos que se utilizaba como alimento y para hacer pinturas cuando la mezclaban con pigmentos minerales. El cuero también era empleado para hacer mantos y paños para toldos (Mengoni Goñalons 1995). Si bien, los humanos siempre aprovecharon esta especie, la información disponible indica que el aprovechamiento del guanaco por parte de los pueblos originarios antes de la conquista española, no tenía un fuerte impacto sobre las poblaciones. Raedeke (1979) reportó que posiblemente habría entre 30 y 50 millones de guanacos antes de la conquista europea en Patagonia. Luego, las poblaciones de guanacos comenzaron a disminuir y a fines del siglo XIX ya sólo había 7 millones de individuos. Los productores ovinos de la Patagonia, cazaban al guanaco (y aún lo siguen haciendo) porque competían con la cría de ovejas y, por lo tanto, fue

considerado una “especie plaga” (Franklin 1982). Para la década de 1950, las poblaciones ya estaban prácticamente desapareciendo en gran parte del norte y sur de Argentina (Franklin 1982), además de Perú, Chile y Bolivia. En 1978 el guanaco se incluyó en el apéndice II de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestre) que establece restricciones a la comercialización de los productos obtenidos de esta especie.

Entre las principales amenazas que enfrenta la especie actualmente se pueden identificar la degradación y fragmentación del hábitat, la caza furtiva y la extracción no planificada de individuos para disminuir las cargas de los campos, la competencia con el ganado ovino y otras especies exóticas como el ciervo colorado (*Cervus elaphus*; Baldi et al. 2001, 2006; Carmanchahi et al. 2019). Debido a esta disminución en las poblaciones, la cacería de guanaco se prohibió en Argentina, y en 1993, la CITES recomendó la suspensión de la importación de productos de guanacos hasta que se elabore un plan de manejo de la especie (Carmanchahi et al. en prensa-b). Como consecuencia, en 2006 se elaboró, en base a la evidencia científica disponible hasta el momento, un Plan Nacional de Manejo de Guanacos que establecía el uso que se le podía dar a la especie, entre los que la cacería, estaba prohibida en todas sus formas y sí estaba permitida la obtención de fibra de animales vivos (Baldi et al. 2006). La implementación de ese plan de manejo junto con otros factores como la caída del valor de mercado de la lana de oveja, la grave degradación del suelo que generó una disminución de la producción ovina y el consecuente abandono de los campos, favorecieron que las poblaciones de guanacos comenzaran a recuperarse (Carmanchahi et al. en prensa-b).

Esta recuperación de las poblaciones en las últimas dos décadas incrementó los espacios de coexistencia de la especie con el ganado doméstico, principalmente ovino. Como consecuencia del crecimiento de las poblaciones, la presencia de guanaco comenzó a ser percibida como un problema por parte de los productores locales que consideran que la utilización del espacio por parte del guanaco limita el número de cabezas de ganado que pueden localizarse en los campos, ignorando el efecto que el ganado tuvo en la estepa patagónica aún antes del incremento de las densidades de guanacos (Oliva et al. 2016). La percepción negativa es tan fuerte que, recientemente, se ha llegado a proponer que esta especie nativa es perjudicial para los pastizales patagónicos, sugiriendo que el guanaco es parte del problema de los procesos de degradación y desertificación, haciéndolos igual de culpable que las ovejas (Oliva et al. 2019). Esta propuesta contradice toda la

información disponible sobre la especie y principalmente desconoce el proceso de coevolución de la misma con el ambiente (Franklin 1982). Afortunadamente esta falsa acusación sobre la especie, fue rápidamente rechazada por toda la comunidad de especialistas, generando un repudio general y una respuesta académica a la misma (Marino et al. 2020). La presión de los productores de las provincias patagónicas para que se autorice la cacería de individuos fue tan fuerte que llevó a la elaboración de un nuevo Plan Nacional de Manejo de la especie en 2019. Este nuevo plan fue muy criticado por algunas provincias con poblaciones de guanacos en sus territorios, por distintas organizaciones de conservación y principalmente por el sector científico-técnico, ya que no tuvieron la oportunidad de participar en la elaboración del mismo. Una de las principales modificaciones de este plan de manejo es que se autoriza de la cacería comercial de la especie (SAyDS 2019 - Resol. 243/2019).

1.3. Sobre los objetivos e hipótesis de esta tesis

Para esta tesis doctoral nos planteamos como objetivo general estudiar por primera vez aspectos endocrinológicos de las hembras de guanacos silvestres durante el proceso gestacional utilizando métodos no invasivos y aplicarlos a la ecología de poblaciones. La metodología utilizada es novedosa dado que se emplearon recursos estadísticos innovadores para la fisiología como son los modelos predictivos y el teorema de Bayes. Además, se incorporaron herramientas nuevas para la estimación de parámetros poblacionales. Uno de los mayores aportes presentados en esta tesis, es proponer recursos innovadores para vincular dos disciplinas que trabajan a diferentes escalas de análisis como la fisiología y la ecología de poblaciones. En este sentido, además de los aportes al conocimiento de la biología del modelo de estudio, aquí se sugieren y desarrollan herramientas que tienen la potencialidad de ser utilizadas en otros modelos biológicos.

En esta tesis doctoral, por primera vez se desarrolla y valida analíticamente una metodología de diagnóstico de preñez en guanacos utilizando modelos predictivos y técnicas no invasivas (Capítulo 2). Luego, se realizó un seguimiento del proceso gestacional de un grupo de hembras para conocer cómo varían las concentraciones de metabolitos fecales durante el mismo y, de esta forma, validar biológicamente el método empleado para que pueda ser utilizado para evaluar el éxito gestacional en diversas poblaciones de guanacos (Capítulo 3). Además, se propone una metodología innovadora para realizar estimaciones de la producción de crías mediante la tasa de preñez (Capítulo 4) y se evalúa la incorporación de este parámetro en un modelo de reclutamiento

poblacional. Finalmente, se estudió la serie temporal más larga disponible hasta el momento para guanacos en La Payunia, analizando por primera vez las variaciones interanuales en las densidades de esta población y se discute la posible relación de estas variaciones con la productividad primaria y sus consecuencias sobre la producción de crías y movimientos animales (Capítulo 5).

1.4. Áreas de estudio

Como se mencionó anteriormente, gran parte del trabajo de esta tesis doctoral se realizó en la Reserva Provincial La Payunia (36° 00 W, 68° 34´S) localizada en el departamento Malargüe de la provincia de Mendoza (Argentina). La reserva tiene una superficie de 6.641 km² y presenta un ambiente de transición entre la estepa patagónica y el monte (Martinez Carretero 2004). En el momento de conformación de la reserva, la población de guanacos era de unos 10.000 individuos (Candia et al. 1993) y estimaciones más recientes proponen que actualmente alcanza unos 26.000 individuos en primavera (Schroeder et al. 2014). Como podemos ver, la creación de la reserva, el fuerte trabajo de los guardaparques de la Dirección de Recursos Naturales Renovables de Mendoza en el control de cacería y el trabajo para lograr un cambio de percepción de la especie mediante las actividades de manejo para la esquila contribuyeron a la recuperación de la población de guanacos de La Payunia que es la más grande de la región cuyana y una de las pocas en Sudamérica que conserva sus hábitos de migración parcial (Bolgeri 2016).

El relieve en la reserva está principalmente regido por la actividad volcánica y es muy irregular, formado por rocas jóvenes; aunque hay regiones en donde es más suave y continuo. En algunos lugares, las coladas volcánicas se encuentran cubiertas por arena, formando “escorias mesetiformes” que favorecen la localización de vegetación (Candia et al. 1993). Podemos identificar zonas de pastizales, que son más semejantes a la estepa patagónica y zonas de arbustales que tienen elementos comunes con el monte. Las regiones de matorrales pueden ser más o menos abiertas. Los matorrales cerrados se localizan principalmente en las zonas de piedemontes y de escoriales con presencia de arena (Fig. 1.3).

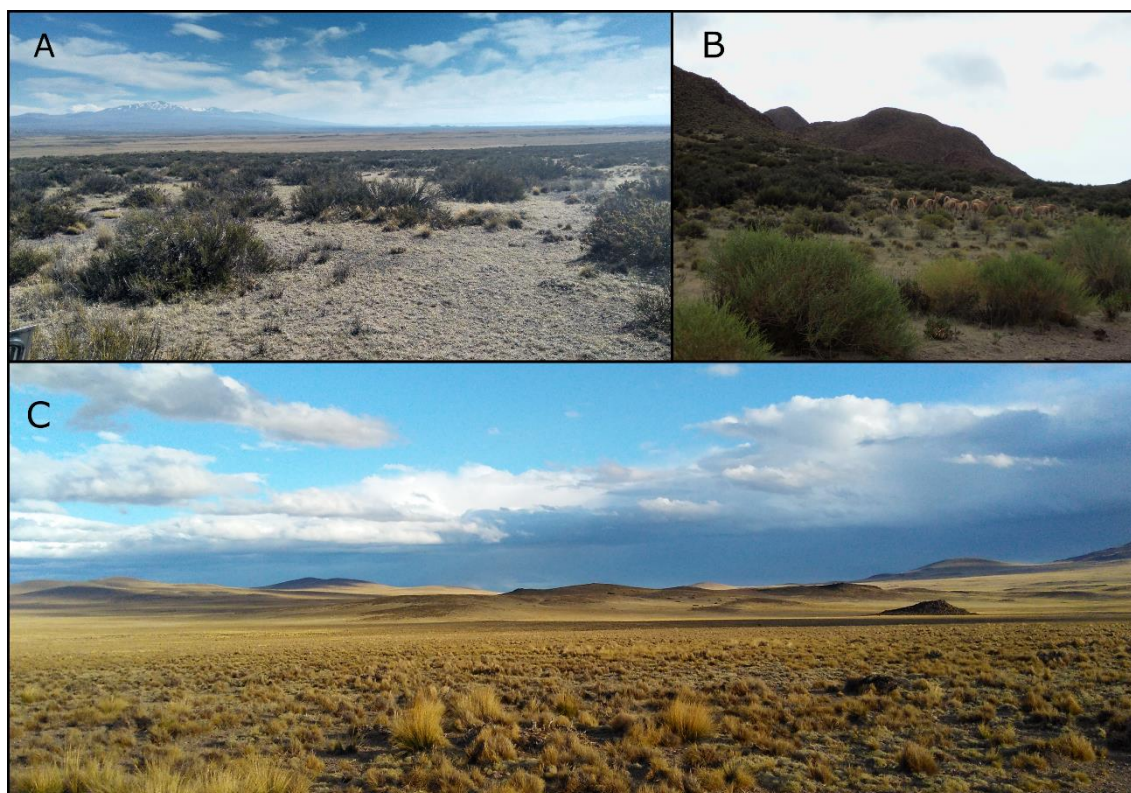


Fig. 1.4: Distintos tipos de vegetación y relieve en La Payunia. A: relieve llano con matorrales abiertos. B: Relieve ondulado de escorias mesetiformes con matorrales cerrados. C: Relieve llano con pastizales.

El clima de La Payunia corresponde al semiárido, en contacto con el clima superárido superior, con precipitaciones entre 150 y 300 mm anuales, ubicado entre los 1400 y 1950 msnm y la mayoría de las precipitaciones ocurren en invierno (Martínez Carretero 2004). La región se caracteriza por la elevada amplitud térmica y la marcada aridez, alcanzando una temperatura media anual de 12,9° C en invierno y de 21,3°C en verano (Candia et al. 1993). En La Payunia, convergen tres provincias fitogeográficas, Monte, Patagónica y Altoandina (Martínez Carretero 2004). Entre las especies representativas del Monte se pueden identificar *Larrea divaricata*, *Condalia microphylla*, *Senna aphylla*, *Cercidium praecox ssp. glaucum*, *Prosopis flexuosa var. depressa*, *Lycium tenuispinosum*. Entre las especies representativas de la provincia Patagónica, se mencionan *M. spinosum* y *C. integerrima*, *Nassauvia glomerulosa*, *Corynabutilon bicolor*, *Berberis microphylla*, *Junellia tridens*, *Brachychlados campestris*, *Stipa psilantha*, *Adesmia ameghinoi*, entre otras. De la provincia Altoandina, algunas especies características son *Pozoa coriacea*, *P. hydrocotylefolia*, *Grindelia mendocina*, *Gutierrezia pulviniformis*, etc. Además, una serie de endemismos presentes tanto en la reserva como en regiones aledañas permitieron definir una provincia fitogeográfica a la que se denominó La Payunia, algunos de ellos

son: *Prosopis castellanosii*, *Berberis comberi*, *Condalia megacarpa*, *Sporobolus mendocinus*, *Stipa barrancaensis*, *S. malalhuensis*, *S. vatroensis* *Juncus*, entre otras (Martinez Carretero 2004).

La economía de los productores de la región estuvo principalmente orientada hacia la ganadería extensiva, principalmente caprina, en los sitios en dónde hay acceso al agua. La escasez de este recurso limita la producción ganadera y, por lo tanto, contribuye a que haya zonas muy extensas aprovechadas únicamente por el guanaco (Candia et al. 1993). Para esta tesis se trabajó principalmente en dos áreas de la reserva, una localizada al NO, en la que se realiza el manejo de la población de guanaco y una al NE, que forma parte del área intangible de la reserva y es la región preferida por los guanacos para reproducirse (Fig. 1.5). Estas dos regiones, además se diferencian en el paisaje y las especies vegetales dominantes. En la región NO predominan los arbustales sobre escoriales parcialmente cubiertos de arena, con predominancia de *Neosparton aphyllum*, acompañada de *Stillingia patagónica*, *Maihueniopsis glomerata*, *Fabiana patagónica*, *Grindelia chiloensis*, *Ephedra ochreatea*, *Hyalis argéntea*. En las laderas y pie de colinas, predomina *Neosparton aphyllum* acompañada por *Larrea divaricata*, *Chuquiraga erinacea* var. *hystrix* y *Anarthrophyllum rigidu*. La región NE es un pastizal de suelos arenosos dominado por *Panicum urvilleanum*, acompañado por *Stipa speciosa*, *Sporobolus rigens* y *Poa* sp. (Candia et al. 1993, Martinez Carretero 2004).

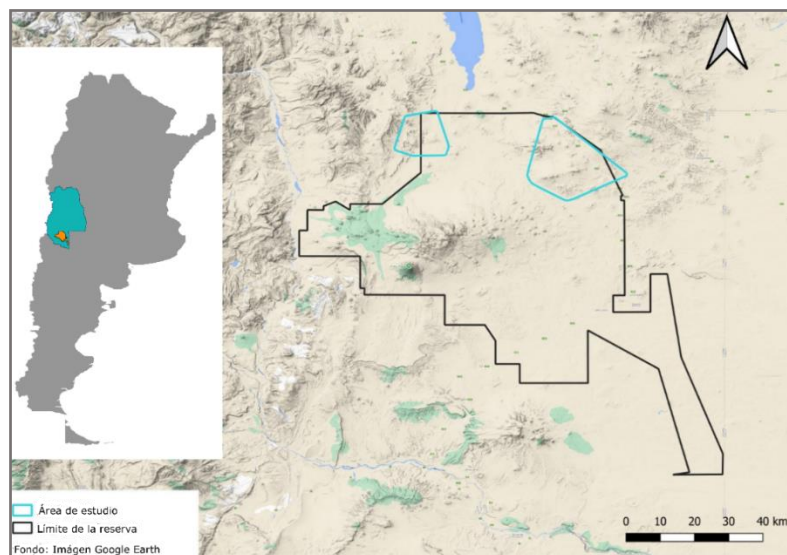


Fig. 1.5: Imagen satelital con los límites de la reserva (línea negra) y las áreas de estudio (líneas azules).

El otro sitio de estudio en el que se trabajó en esta tesis doctoral es la Estancia los Peucos (39°26'S, 71°02' W; Fig. 1.6) localizada en el departamento Huiliches de la provincia del Neuquén (Fig. 1.6). La temperatura media anual no supera los 10° y las precipitaciones son de aproximadamente 800 mm anuales (Gonzalez-Polo et al. 2015). La estancia desarrolla actividades silvopastoriles con forestación de pinos y ganadería bovina. La vegetación natural es una estepa gramínea cuyas especies predominantes son *Jarava speciosa* y *Festuca pallescens* (Fig.: 1.7; Gonzalez-Polo et al. 2015).

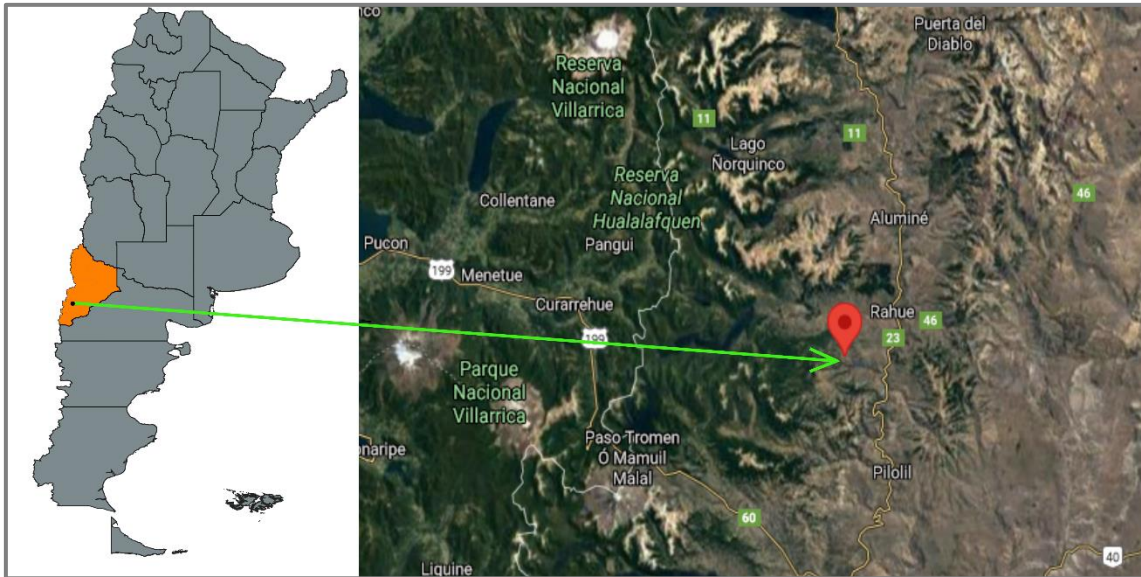


Fig. 1.6: Localización de la Estancia Los Peucos en la provincia de Neuquén



Fig. 1.7: Corral de la estancia Los Peucos donde se realizó el seguimiento del proceso gestacional de hembras de guanacos descrito en el capítulo 3.

La estancia Los Peucos cuenta con un plantel de 400 guanacos que son mantenidos en cautiverio extensivo, cada animal está individualizado con un número de caravana que se le asigna al nacimiento. Se realizan dos eventos de encierre al año, uno de ellos en el

otoño para vacunación y luego al final de la primavera, en noviembre, para la esquila. En general, en la estancia no se realiza un manejo reproductivo, sino un control de la reproducción de los animales castrando machos. Además, tanto los machos castrados como no castrados (machos enteros) se mantienen en un cuadro separado al de las hembras. Los cuadros en que permanecen los animales durante todo el año tienen aproximadamente 50 km². Las pocas hembras que quedan preñadas lo hacen porque ocasionalmente se cruzan machos silvestres.

La estancia cuenta con un galpón de esquilas con una salida a un corral pequeño de una superficie de 0,2 km² que cuenta con agua, pastura natural y refugio para los animales y donde se los deja antes de ser esquilados (Ver Fig. 3.2 del capítulo 3). En este corral se realizó el seguimiento hormonal de la preñez que se explica en el capítulo 3.

1.5. Sobre los análisis estadísticos realizados

Los análisis estadísticos que se aplicaron responden al paradigma Bayesiano. En general cuando utilizamos el paradigma frecuentista, partimos del supuesto que no hay diferencias entre tratamientos. Por ejemplo, cuando hacemos un análisis de la varianza (ANOVA), ponemos a prueba un juego de hipótesis para ver si hay o no diferencias entre los tratamientos. Una de las hipótesis, (hipótesis nula) propone que no hay diferencias entre los tratamientos y la otra (hipótesis alternativa) propone que sí hay diferencias. Lo que buscamos es rechazar la hipótesis nula y de esa forma mostrar que hay diferencias entre los tratamientos. Este es el origen de la expresión “hay diferencias significativas” que solemos utilizar en nuestros experimentos. La estadística Bayesiana ignora el supuesto de que los dos tratamientos son iguales y asume que hay diferencias entre ellos y que cuantas más observaciones tenemos sobre los tratamientos más información agregamos, así cada nueva observación contribuye a clarificar las diferencias entre tratamientos. Entonces cada nueva evidencia que añadimos actualiza y modifica la información que teníamos previamente y considerábamos verdadera. Por consiguiente, además de ver los intervalos de confianza y la diferencia entre las medias, podemos ver las probabilidades de esas diferencias mediante una función de distribución de probabilidad (Stanton 2017). La estadística bayesiana se basa en información previa, es decir que vamos a asignar una función de distribución de probabilidad a cada parámetro que queremos estimar antes de correr nuestros modelos (distribución previa). Después de correr los modelos estadísticos vamos a obtener una nueva distribución del parámetro (distribución posterior), que comparamos con la distribución previa que habíamos

asignado al parámetro. Entonces, lo que buscamos con la estadística bayesiana es que “la previa se separe de la posterior” (Fig. 1.8). Es decir que buscamos tener una nueva distribución que se diferencie de la que establecimos previamente, en caso de que esto ocurra, estamos agregando nueva información sobre nuestro sistema de estudio. Si la distribución posterior se parece a la distribución previa, entonces no se agrega información al sistema.



Fig. 1.8: Ejemplo de resultados de análisis bayesiano. A la izquierda se observa un ejemplo en el que la previa no se separa de la posterior, por lo tanto, los resultados no agregan nueva información. En el ejemplo de la derecha, la previa se separa de la posterior y, por lo tanto, los resultados agregan nueva información al sistema.

La pregunta es entonces, ¿cómo hacemos para tener información previa cuando trabajamos en biología donde los datos pueden estar influidos por infinitas variables? Edwards (1996) propuso trabajar con previas no informativas o levemente informativas, que asumen que tenemos muy poca información sobre nuestro sistema de estudio. También se las llama “previas chatas” dado que estamos asignando probabilidades de ocurrencia muy semejantes del parámetro a valores muy distintos (Bolker 2008). Si lo pensamos con una distribución normal (Fig. 1.9), cuanto más grande sea la varianza, menos concentrados van a ser nuestros datos y entonces la curva va a ser más chata ya que asignamos una probabilidad de ocurrencia semejante a infinitos números reales. Si asignamos una distribución previa chata a un determinado parámetro, la distribución posterior que obtengamos va a estar dada principalmente por nuestros datos (Bolker 2008).

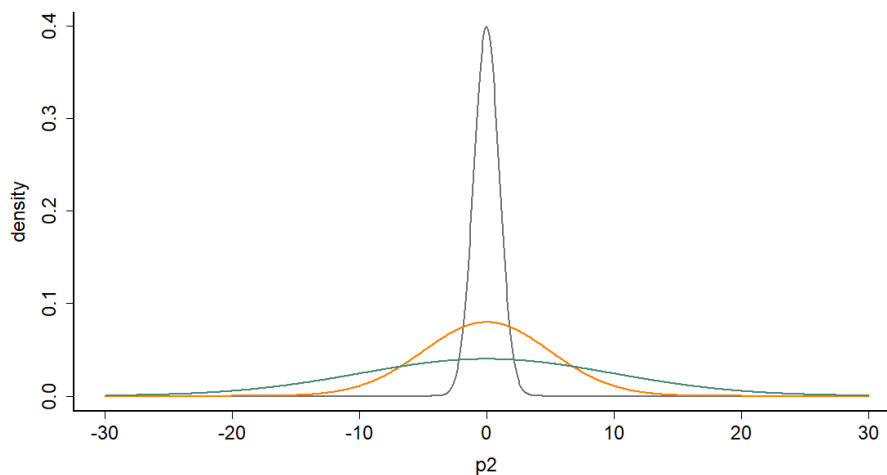


Fig. 1.9: Ejemplo de distribuciones normales con mayor o menor varianza con datos simulados. Si tenemos un mismo set de datos y una misma media, a mayor varianza, la probabilidad de ocurrencia de los valores extremos se parece más a la probabilidad de ocurrencia de la media y, por lo tanto, tenemos una curva más “chata”.

La principal razón por la que elegí la estadística bayesiana para trabajar en esta tesis es justamente porque nos da la posibilidad de obtener una distribución de probabilidad de los parámetros. Es decir, que no obtenemos un parámetro sino muchos parámetros, cada punto del área bajo la curva de la distribución representa uno. Cada uno de esos puntos tiene diferente probabilidad de ocurrir, algunos más y otros menos. Esa forma de explicar los procesos biológicos, a mi entender, se parece un poco más a la biología real, en donde las cosas no son blancas o negras, sino que tenemos una diversidad de opciones aún en los sistemas más estables.

Capítulo 2: Un modelo predictivo para diagnosticar la preñez del guanaco utilizando metodologías no invasivas

Este capítulo de la tesis ya fue publicado en *Canadian Journal of Zoology* y es el artículo de respaldo de la misma: Marozzi, Antonela, et al. A predictive model to diagnose pregnancy in guanacos (*Lama guanicoe*) using non-invasive methods. *Canadian Journal of Zoology*, 2020, 98:13-20.

2.1 Introducción

El monitoreo del estado reproductivo de las poblaciones de ungulados silvestres es importante para los estudios demográficos y para tomar decisiones de manejo (Kersey y Dehnhard 2014). La evaluación de la preñez en la fauna silvestre ha sido propuesta por diversos autores como una herramienta útil para realizar estimaciones de parámetros poblacionales como tasas de natalidad, supervivencia de los neonatos y tasas de reclutamiento poblacional (Altmann et al. 2004, Bonenfant et al. 2005, Burgess et al. 2012). Diversos estudios ecológicos han incorporado el parámetro de preñez mediante el recuento de fetos (Náhlik y Sándor 2003, Bonenfant et al. 2005, Pierce et al. 2012) o mediante la utilización de técnicas invasivas (Wittmer et al. 2005, 2010). El primer caso es aplicable en especies bajo manejo de cacería porque se cuentan los fetos de las hembras cazadas, en el segundo, se requiere de la captura y toma de muestras de los individuos, lo que implica desarrollar protocolos específicos para la manipulación de la especie bajo estudio y el entrenamiento de un grupo de personas con este fin (Wittmer et al. 2005, Hebblewhite y Merrill 2011), haciendo dificultosa y costosa la obtención de este tipo de información en poblaciones silvestres. Algunas de las metodologías más utilizadas para evaluar la preñez mediante técnicas invasivas incluyen la ecografía, la ecocardiografía fetal, la laparoscopia y el tacto abdominal (Purohit 2010), también son muy utilizadas las evaluaciones séricas de las concentraciones de glicoproteína asociada a la preñez (PAG; Majewska et al. 2009, Shahin et al. 2013) y los dosajes de progesterona y estrógenos (Miragaya et al. 2004, Riveros et al. 2009, 2010). Por otro lado, durante las últimas décadas, se han desarrollado métodos de monitoreo no invasivos utilizando metabolitos fecales de hormonas esteroideas sexuales (Bamberg et al. 1991, Schwarzenberger et al. 1991). Estas hormonas son resistentes a la degradación, por lo tanto, sus metabolitos son estables y pueden ser fácilmente cuantificados en ensayos de laboratorio incluso después de períodos de almacenamiento prolongados (Lasley y Kirkpatrick 1991, Kersey y

Dehnhard 2014), esto ha contribuido a que la información fisiológica sea incorporada por otras disciplinas como la ecología y el comportamiento.

En este sentido, el dosaje de las hormonas reproductivas como el estradiol (E2) y la progesterona (P4) puede ser utilizado para evaluar el número de individuos reproductivos en una población, la edad de maduración reproductiva, el momento de apareamiento y el éxito reproductivo (cantidad de hembras que completan el proceso gestacional), además de ser indicadoras del estado de preñez. (Kumar et al. 2013, Kersey y Dehnhard 2014, McCormick y Romero 2017). En general, los niveles de P4 y E2 aumentan durante la gestación y disminuyen después del parto (Schwarzenberger et al. 1991, 1995, 1996, Graham et al. 2001). El patrón secretorio que se observa en sangre y sus concentraciones son distintivos en cada especie y tienen su correlato en los metabolitos fecales de estas hormonas (Kersey y Dehnhard 2014), siendo estos últimos un indicador relativamente fácil de obtener y cuantificar.

Los metabolitos fecales de estrógeno consisten principalmente en estrona, estradiol-17 alfa, y estradiol-17 beta. La progesterona, en cambio, es ampliamente metabolizada antes de la excreción y sus metabolitos fecales consisten en varios 5- α y 5- β pregnanos (Bamberg et al. 1991, Schwarzenberger et al. 1991, 1995, 1996). Los mecanismos de excreción de las hormonas esteroideas pueden variar entre especies y entre sexos de individuos de una misma especie (Palme, 2005). Incluso, algunos estudios en los que se inyectaron hormonas esteroideas marcadas con ^{14}C para evaluar sus mecanismos de excreción en diferentes modelos biológicos (estudios de radiometabolismo) detectaron que diferentes hormonas esteroideas pueden tener diferentes vías excretorias en una misma especie (Hodges et al. 2010). Por ejemplo, en el mono tití cabeza blanca (*Saguinus oedipus*) los estrógenos son eliminados casi exclusivamente por vía urinaria a diferencia de lo que ocurre con la progesterona que es principalmente eliminada por las heces (Ziegler et al. 1989). Por el contrario, en el mono ardilla (*Saimiri sciureus*) tanto los metabolitos de progesterona como los de estrógenos son excretados principalmente en las heces (Moorman et al. 2002). Entonces, corroborar que se eligió el método adecuado de medición es una etapa fundamental para que los resultados obtenidos sean correctos.

La mayoría de los estudios sobre el diagnóstico de preñez mediante el uso de métodos no invasivos en los mamíferos silvestres comparan las concentraciones medias de glucurónidos de pregnanediol (PdG) y estrógenos conjugados (EC) en hembras preñadas y no preñadas y realizan un seguimiento de las concentraciones hormonales durante todo

el proceso gestacional, observando el patrón de liberación de éstos metabolitos (Schwarzenberger et al. 1995, Pereira et al. 2006, Burgess et al. 2012, Krepschi et al. 2013, Kumar et al. 2013, Valenzuela-Molina et al. 2018). Este tipo de mediciones son fundamentales dado que, de esta forma, se demuestra que los dosajes realizados en el laboratorio son indicadores de la actividad ovárica durante el proceso gestacional, validando biológicamente la metodología (Palme et al. 2005, Schwarzenberger 2007). En esta tesis esos resultados se presentan en el capítulo 3.

Cuando se trabaja con bases de datos grandes, de varios muestreos o incluso de sitios de muestreo diferentes, realizar el diagnóstico de preñez mirando uno a uno los datos de los dosajes hormonales, es complejo, puede verse influenciado por el observador, y es necesario buscar herramientas para facilitar el procesamiento de datos. Una alternativa para evaluar la preñez en poblaciones silvestres, que facilita el diagnóstico cuando se dispone de una gran cantidad de información, es elaborar un modelo predictivo en condiciones controladas (Cain et al. 2012). De esta manera, es más fácil incluir la tasa de preñez en estudios sobre la ecología de poblaciones de especies bajo manejo o en peligro. En estas últimas, asegurar la natalidad y supervivencia de las crías son factores críticos para garantizar la viabilidad de las poblaciones (Morden et al. 2011, Mithileshwari et al. 2016).

Hasta el momento, este tipo de análisis no se han aplicado a las poblaciones de guanacos y tienen el potencial de brindar información sobre el número de crías que se van a sumar a una población, bajo el supuesto de que, si asignamos una hembra como preñada en las últimas etapas de la gestación, la hembra va a parir una cría viva, entonces indirectamente estamos evaluando la natalidad. Además, en el caso de los guanacos que son manejados para obtener su fibra en vivo y marcados, se puede evaluar si el manejo tuvo algún efecto sobre el feto midiendo las concentraciones hormonales en los mismos individuos pre y post esquilas. Varios estudios sobre la fisiología reproductiva del guanaco se realizaron con métodos invasivos trabajando con animales en cautiverio (Riveros et al. 2009, 2010, Tibary 2018). Sin embargo, en esta tesis utilizamos información reproductiva para realizar estudios ecológicos de poblaciones silvestres de guanacos, aplicando métodos no invasivos, lo que ha facilitado la toma de muestra sin generar estrés en los individuos.

2.2: Objetivos, hipótesis y predicciones del capítulo

Con la finalidad de establecer el estado reproductivo de guanacos silvestres y elaborar un modelo predictivo de diagnóstico de preñez, para este capítulo se plantearon los siguientes **objetivos**:

- 1) Evaluar el estado de preñez durante las experiencias de manejo mediante tacto abdominal y corroborar este diagnóstico midiendo las concentraciones plasmáticas de P4 y E2.
- 2) Establecer una metodología no invasiva de diagnóstico de preñez en heces de guanacos silvestres y relacionar las concentraciones plasmáticas con la concentración de los metabolitos fecales de estas hormonas.
- 3) Desarrollar un modelo predictivo de diagnóstico de preñez utilizando la metodología no invasiva para ser aplicada en poblaciones silvestres.

Hipótesis 1: Existen diferencias en las concentraciones plasmáticas de P4 y E2 de hembras preñadas y no preñadas que permiten diagnosticar la preñez.

Predicción H1: La concentración media de P4 y E2 será mayor en hembras con un estado de preñez avanzado que en hembras no preñadas diagnosticadas mediante tacto abdominal y, por lo tanto, estas hormonas permitirán realizar un correcto diagnóstico de preñez efectuando una sola toma de muestra.

Hipótesis 2: Las concentraciones plasmáticas de P4 y E2 y su variación entre hembras preñadas y no preñadas se ve reflejada en las concentraciones de metabolitos de estas hormonas en materia fecal y esta relación es explicada a través de una función matemática.

Predicción H2: La concentración plasmática de P4 y E2 se relacionará de forma lineal con sus concentraciones de sus metabolitos en heces.

Hipótesis 3: Es posible predecir mediante un modelo estadístico la probabilidad de que una hembra se encuentre preñada y establecer una regla de decisión que facilite el diagnóstico de animales silvestres utilizando sólo una muestra fecal.

Predicción H3: La probabilidad de que una hembra se encuentre preñada se podrá evaluar mediante una regresión logística.

2.3. Materiales y métodos

El trabajo de campo de esta parte de la tesis se llevó adelante durante los tres eventos de manejo para esquila realizados en los años 2016 en la región NO de la Reserva Provincial La Payunia (Mendoza) utilizando animales silvestres, y un evento de esquila en 2017 en la estancia Los Peucos (Neuquén) con guanacos mantenidos en un cautiverio extensivo. Una vez capturados y en la camilla de esquila, se evaluó el estado de preñez de las hembras mediante tacto abdominal, esta metodología consiste en aplicar una leve presión sobre el abdomen para detectar el feto (Pratt y Hopkins 1975, Purohit 2010). Para que esto pueda realizarse, es necesario que el feto ya tenga varios meses de desarrollo. Como las actividades de esquila se realizan en la primavera (Carmanchahi y Marull 2017), el feto ya tiene entre 9 y 10 meses de gestación (Fowler 2011), por lo tanto, es fácil detectar la presencia del mismo mediante el tacto abdominal.

Del total de hembras esquiladas entre la región NO de La Payunia y la estancia Los Peucos en Neuquén, a 69 se le tomaron muestras fecales y de ellas, a 31 además, se le tomaron muestras de sangre por punción de la vena femoral, utilizando una jeringa de 10 ml y una aguja 18g (Fig. 2.1). Las muestras de sangre se centrifugaron en el campo para separar el plasma de los elementos formes. Las muestras fecales se tomaron mediante extracción rectal, que es una metodología que ya se fue aplicada para este mismo modelo biológico en otras investigaciones (Moreno et al. 2015) y se almacenaron en bolsas plásticas rotuladas. Tanto las muestras de plasma como las muestras fecales se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) hasta que se llevaron al laboratorio del Asentamiento Universitario San Martín de los Andes (AUSMA; UNCo – INIBIOMA - CONICET). Las mediciones hormonales plasmáticas se realizaron en el AUSMA y los dosajes de metabolitos fecales se realizaron en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA) perteneciente al CONICET y a la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC).



Fig. 2.1: Toma de muestras de sangre durante la esquila de 2016 en La Payunia.

2.3.1. Medición de hormonas en plasma

Para realizar las mediciones de hormonas plasmáticas, se realizó una extracción doble de esteroides totales, colocando 1 ml de plasma diluido en 5 ml de éter dietílico. Las fases orgánicas de cada extracción se agruparon, evaporaron y se resuspendieron en 1 ml de solución buffer de fosfatos (PBS) a pH 7,4 (Ovejero et al. 2013). Los niveles plasmáticos de E2 y P4 se determinaron utilizando kits de enzimoimmunoensayo (EIA; EIA-1561, DRG Progesterona ELISA, DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemania; EIA-2693; DRG Estradiol ELISA, DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemania). La sensibilidad analítica del kit de P4 es de 0,045 ng/mL y del kit de E2 es de 10,6 pg/mL. El coeficiente de variación intra-ensayo (CV) fue <7% para ambas hormonas. Como sólo se utilizó un kit para el análisis hormonal de plasma, no se calculó ningún CV entre ensayos. En las tablas 2.1 a y b se presenta la reactividad cruzada de cada uno de los kits. Todas las muestras y los estándares se midieron por duplicado.

Tabla 2.1a: Reactividad cruzada del kit EIA-1561, DRG Progesterona ELISA

Esteroides	Reactividad cruzada (%)
Progesterona	100,00
17 α OH Progesterona	0,30
Estriol	< 0,10
Estradiol 17 β	< 0,10
Testosterona	< 0,10
11-Desoxicorticosterona	< 0,02
Cortisol	< 0,02
Corticosterona	0,20
Pregnenolona	0,35
Cortisona	< 0,10
11-Desoxicortisol	0,10

Tabla 2.1b: Reactividad cruzada del kit EIA-2693, DRG Estradiol ELISA, DRG

Esteroides	Reactividad Cruzada (%)
Estadiol-17 β	100
Androstenediona	0
Androsterona	0
Corticoesterona	0
Cortisona	0
Epiandrosterona	0
16-Epiestriol	0
Estradiol-3-sulfato	0
Estradiol-3-glucuronido	0
Estradiol-17 α	0
Estriol	0,05
Estrona	0,20
Estrona-3-sulfato	0
Dehydroepoandrosterona	0
11-Desoxicortisol	0
21-Deoxycortisol	0

Dihydrotestosterona	0
20-Dihyprogesterona	0
11-Hydroxyprogesterona	0
17 α -Hydroxyprogesterona	0
17 α -Pregnenolona	0
17 α -Progesterona	0
Pregnanediol	0
Pregnanetriol	0
Pregnenolona	0
Progesterona	0
Testosterona	0

2.3.2 Análisis de muestras fecales

2.3.2.1 Extracción de metabolitos fecales y validación analítica de la técnica

Para realizar los análisis de metabolitos fecales, se realizó previamente una extracción de esteroides según el protocolo de Palme (2005) con ligeras modificaciones. Se colocaron 0,5g (peso seco) de muestra en tubos Falcon™ y se añadieron 5 ml de metanol al 80% V/V a cada tubo. Las suspensiones fecales se incubaron en un agitador orbital a temperatura ambiente (21 °C) durante 120 minutos. Después, las muestras se agitaron con un vortex durante 10 segundos y luego se centrifugaron a aproximadamente a 500g durante 20 minutos para separar los restos fecales del extracto alcohólico. El sobrenadante que contiene los metabolitos de los esteroides se recuperó y almacenó a -20 °C hasta el dosaje hormonal (Fig. 2.2).

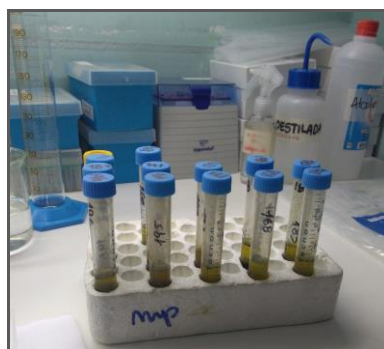


Fig. 2.2: Extractos fecales. El sobrenadante que se observa en los tubos Falcon se separó y se almacenó para realizar las mediciones de metabolitos fecales.

Se realizó una validación analítica de las técnicas de EIA aplicadas en heces de guanacos, para ello se demostró:

1) el paralelismo entre las diluciones utilizando un pool de extractos fecales y la respectiva curva estándar para detectar similitudes inmunológicas entre el estándar y la hormona de la muestra. Con este fin, se realizó un análisis de regresión lineal con variables auxiliares (dummy) utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al. 2011).

2) la eficacia del protocolo de extracción aplicado, mediante la recuperación de una cantidad conocida de EC y PdG añadidas a un pool de muestras fecales antes del procedimiento de extracción. Con este fin se realizó el siguiente cálculo: cantidad de hormona observada/cantidad de hormona esperada \times 100%.

3) la recuperación de la hormona exógena en el rango de la curva estándar añadida a los extractos fecales para examinar la posible interferencia de los componentes en las heces o en el disolvente con unión de anticuerpos y de esa forma evaluar la interferencia de la matriz en el dosaje hormonal.

2.3.2.2 Determinación de las concentraciones de EC y PdG.

Para determinar las concentraciones de EC y PdG presentes en los extractos fecales se realizó un EIA “*in house*” utilizando anticuerpos policlonales y sus correspondientes conjugados de peroxidasa de rábano picante (R522-2 – anti-EC – R13904 – anti-PdG – C.J. Munro, Departamento de Salud Poblacional y Reproducción, Universidad de California, Davis, EE.UU.). Los extractos fecales se diluyeron en buffer de EIA (0,1 mmol/L de buffer de fosfato de sodio, pH 7,0, que contiene 9 g/L de NaCl y 1 g/L de BSA) de acuerdo a los resultados obtenidos en las curvas de paralelismo. Las diluciones finales para los EC fueron 1:20 para las hembras no preñadas y 1:200 para las preñadas y las diluciones finales para PdG fueron 1:20 para las hembras no preñadas y preñadas. Tanto las curvas de calibración como las muestras se ensayaron por duplicado (Fig. 2.3).



Fig. 2.3: Preparación de placa de EIA para la medición de metabolitos fecales de hormonas esteroideas (EC y PdG).

El EIA fue realizado según Munro y Lasley (1988). Se recubrió el fondo de las microplacas (Nunc MaxiSorp™; VWR International LLC, Mississauga, Ontario, Canadá) con 50 μ L de Anticuerpo diluido en una solución buffer de recubrimiento (50 mmol/L de buffer de bicarbonato, pH 9.6; la dilución final para el EC es 1:13000 y la dilución final para PdG es 1:10000). Luego las placas se cubrieron con selladores de acetato para evitar la evaporación y se dejaron incubando durante la noche a 4 °C. Después de entre 16 y 24 Hs. de incubación, las placas se lavaron para eliminar las moléculas de anticuerpos no ligados utilizando una solución de lavado que contiene detergente no iónico disuelto en agua y NaCl (0,05% Tween 20 en agua, 0,15 mol/L NaCl) usando una lavadora de microplacas (Bio-Tek EL 40 VR; Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, EE.UU.). Inmediatamente después del lavado, 50 μ L de extractos fecales, estándares y controles se añadieron por duplicado (Fig.2.4), seguido por 50 μ L del correspondiente conjugado de peroxidasa de rábano picante diluido en buffer EIA (la dilución final para el EC es 1:37500 y la final la dilución para PdG es 1:21500).

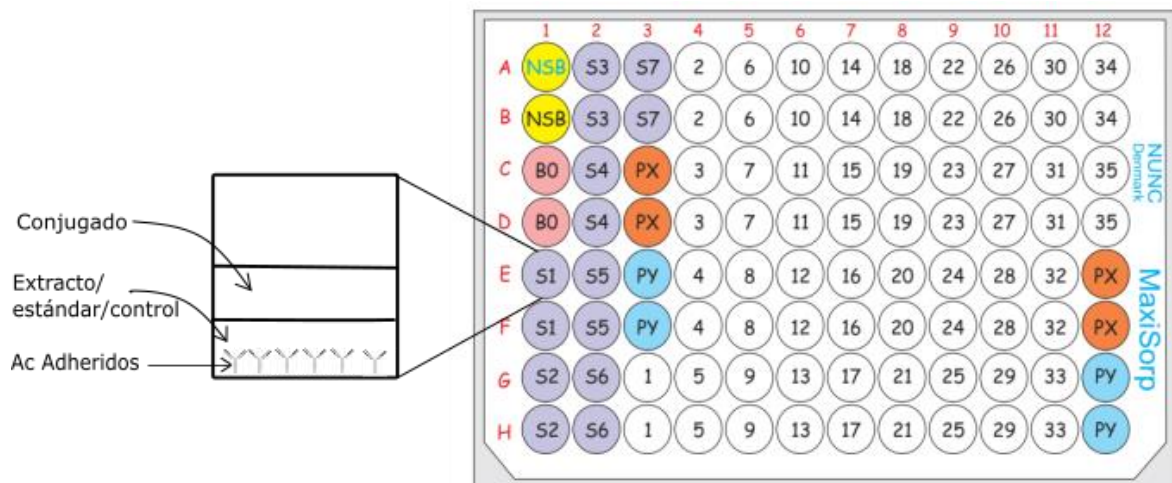


Fig. 2.4: Esquema representativo de la distribución de los reactivos en cada *well* de una placa de EIA. Se adhieren los anticuerpos y luego en cada pocillo (*well*) se coloca el extracto o el estándar o el control según corresponda y finalmente el conjugado de peroxidasa de rábano picante. Finalmente, la placa se lava y se adiciona solución de sustrato para realizar la lectura. NSB: Unión no específica (estos *wells* se utilizan para descontar el efecto de la unión de sustancias diferentes a los metabolitos fecales, a los anticuerpos adheridos al *well*), B0: cero (se coloca sólo el Buffer de EIA e indica la absorbancia cuando ninguna sustancia se une a los anticuerpos), S1 a S7 estándares (diluciones seriadas de concentración conocida del analito), se usan para hacer la curva de calibrado. Para calcular la concentración de analito en una muestra desconocida se comparan la absorbancia de la curva con la absorbancia de las muestras; 1-35 muestras; PX y PY muestras que se repiten en todas las placas utilizadas durante los dosajes hormonales para evaluar la variabilidad interensayo. Dibujo de la placa tomado de Palme (2014).

Las placas fueron cubiertas e incubadas a temperatura ambiente (21 °C) durante 2 hs. de agitación en un agitador orbital. Inmediatamente después de la incubación, se lavaron y secaron, seguido de la adición a cada pocillo (*well*) de 100 µL solución de sustrato (50 mmol/L de citrato, 1,6 mmol/L de peróxido de hidrógeno, y 0,4 mmol/L de 2,20-azino-di-(ácido 3-etilbenzotiazolino sulfónico) sal de diamonio, pH 4,0; Munro et al. 1991). Finalmente, la absorbancia se midió a 405 nm usando un lector de microplacas (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). La reactividad cruzada reportada para cada analito con otros esteroides se presenta en las tablas 2.2a y b. La sensibilidad del ensayo para EC fue de 0,0178 ng/mL y para la PdG fue de 1,954 ng/mL. El coeficiente de variación intraensayo fue <12% para ambas hormonas y el interensayo fue 14,8% para EC y 11,4% para PdG.

Tabla 2.2a: Reactividad cruzada de Estrógenos Conjugados (EC).

Esteroides	Reactividad (%)
Estrona-3-glucurónido	100
Estrona-3-sulfato	66,60
Estrona	23,80
Estradiol-17	7,8
Estradiol-3-glucurónido	3,8
Estradiol-3-sulfato	3,3
Estradiol-17- sulfato	0,1
Estradiol-3-disulfato	0,1%
Demás esteroides probados	<0,1

Tabla 2.2b: Reactividad cruzada de Glucurónidos de pregnanediol (PdG).

Esteroides	Reactividad
Pregnanediol-3-Glucurónido	100
20-Hidroxiprogesterona	44.80
20-Hidroxiprogesterona	3.10
Progesterona	0,70
Estradiol-17	0,04
Testosterona	0,20
Cortisol	0,06

2.3.3. Comparación de las hormonas plasmáticas y los metabolitos fecales en hembras preñadas y no preñadas

Luego de realizar las mediciones de concentraciones hormonales en sangre y heces, se efectuaron los análisis estadísticos utilizando el programa R, versión 3.5.1 (Venables and Smith 2017; disponible en <https://www.r-project.org/>). Los resultados obtenidos en plasma se compararon con los resultados obtenidos en otras investigaciones realizadas en guanacos en cautiverio (Riveros et al. 2009). Además, para evaluar si las concentraciones hormonales en plasma y en heces eran lo suficientemente diferentes entre hembras preñadas y no preñadas como para que puedan ser utilizadas como una herramienta de diagnóstico, se realizó una prueba de comparación de medias utilizando un enfoque bayesiano (Stanton 2017). Para esto, se utilizó el paquete BayesFactor (Richard Morey

2018; disponible en <https://github.com/richarddmorey/BayesFactor>), que evalúa si las medias son estadísticamente diferentes mediante el Factor de Bayes (BF) que es la razón de probabilidades (odds ratio) obtenida de la comparación de dos hipótesis estadísticas: 1) la hipótesis nula que propone que no hay diferencias en las concentraciones hormonales entre hembras preñadas y no preñadas; y 2) una hipótesis alternativa, es decir, existen diferencias en las concentraciones hormonales entre hembras preñadas y no preñadas. También, para evaluar el ajuste del modelo propuesto se calcularon los límites inferiores y superiores de los intervalos de credibilidad del 95% (CI) que describen con una probabilidad del 95% entre qué valores se encuentra el parámetro estimado (Stanton 2017). Si el intervalo de credibilidad estimado para un determinado parámetro no contiene al cero, entonces se considera que ese parámetro brinda información sobre los datos y, por lo tanto, tiene valor estadístico. Entonces, podríamos decir que las medias son suficientemente diferentes como para ser utilizadas como una herramienta de diagnóstico. En caso contrario ese parámetro no brinda información sobre los datos y no hay evidencia que indique diferencias entre las medias en las concentraciones hormonales de hembras preñadas y no preñadas. Los resultados de las concentraciones hormonales y de sus metabolitos fecales se presentan como $\text{media} \pm \text{DE}$ (desvío estándar).

La relación entre las concentraciones de hormonas plasmáticas y los metabolitos fecales se estimaron utilizando un modelo de regresión bayesiano con el paquete jagsUI (Kellner 2015; disponible en <https://cran.r-project.org/web/packages/jagsUI/index.html>). Para evaluar el ajuste del modelo, se consideró el rango de los CI, la convergencia de las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) y el estadístico de convergencia de Gelman-Rubin (Rhat) que tiene que ser un valor próximo a 1 y menor a 1,1. Asimismo, se calculó el tamaño efectivo de la muestra (n_{eff}) para estimar el número de cadenas markovianas en las que efectivamente se basa la distribución posterior del parámetro.

En ambos análisis estadísticos, se usaron previas no informativas para estimar los parámetros para que las distribuciones posteriores se determinaran principalmente por los datos. Se realizó una transformación \log_{10} en las concentraciones de fecales y las concentraciones plasmáticas. .

2.3.4 Modelo de predictivo de diagnóstico de preñez

Finalmente, se elaboró un modelo predictivo que permita diagnosticar la preñez utilizando sólo las concentraciones de metabolitos fecales lo que facilita su aplicación a

campo, evitando manipular los animales. Para ello, se efectuó una regresión logística Bayesiana (Gelman y Hill 2006) utilizando el paquete jagsUI (Kellner 2015). Mediante esta prueba estadística es posible predecir la probabilidad de que un determinado fenómeno ocurra, como por ejemplo la probabilidad de que una hembra se encuentre preñada de acuerdo con las concentraciones de metabolitos fecales de progesterona y estrógenos.

A la variable de respuesta $y = \text{"estado de preñez"}$ se le asignó una distribución de Bernoulli:

$$y \sim \text{Bernoulli}(p_i) \quad (2.1)$$

Donde p_i es la probabilidad de que una hembra esté preñada y se modeló como una función lineal de las concentraciones de PdG y EC (Gelman y Hill 2006):

$$\text{logit}(p_i) = \beta_0 + \beta_1 \text{PdG} + \beta_2 \text{EC} \quad (2.2)$$

Tal que:

$$p_i = \text{Ln} \left(\frac{p_i}{1-p_i} \right) \quad (2.3)$$

Para desarrollar este modelo, la distribución previa de los parámetros fue:

$$\beta_0 \sim U(0,1) \quad (2.4)$$

$$\beta_1 \sim N(0,10000) \quad (2.5)$$

$$\beta_2 \sim N(0,10000) \quad (2.6)$$

Se eligió una distribución previa uniforme para el intercepto para que las predicciones estuvieran influenciadas principalmente por las pendientes del modelo (β_1 y β_2 ; es decir, las concentraciones de metabolitos fecales). Además, se seleccionaron distribuciones previas no informativas para β_1 y β_2 para que los resultados se explicaran principalmente por nuestros datos. Se obtuvo la distribución posterior de cada parámetro y se utilizó la media de la distribución de cada uno para estimar el logit de la probabilidad. Finalmente se calculó la probabilidad de preñez de acuerdo con las ecuaciones 2.2 y 2.3.

El cálculo de p_i da como resultado una probabilidad de preñez, es decir que el resultado es cualquier número entre cero y uno. Para transformar esta probabilidad en un

diagnóstico de preñez, fue necesario establecer una línea de corte, en otras palabras: si la probabilidad es menor a un cierto valor (ej.: 0,6; 0,5; 0,4), los resultados deben considerarse negativos y si la probabilidad es mayor a ese determinado valor, entonces esa hembra debe considerarse preñada. Para seleccionar esta línea de corte es necesario evaluar la capacidad predictiva del modelo frente a distintas líneas de corte posibles. Para ello, se calculó la probabilidad de preñez, utilizando los datos de diagnóstico de preñez mediante tacto abdominal en las esquilas que se compararon con las predicciones del modelo. Así se pudo ver en una misma hembra el resultado del diagnóstico mediante tacto abdominal y el resultado del modelo y compararlos, estos dos resultados podían ser iguales o diferentes. Entonces, bajo el supuesto de que el diagnóstico mediante tacto abdominal es correcto, si una hembra fue diagnosticada como preñada durante las esquilas y el modelo la predijo como preñada, la predicción del modelo es correcta. De lo contrario, si la hembra fue diagnosticada como preñada durante las esquilas y el modelo la predijo como no preñada entonces se consideró que el modelo falló en su capacidad predictiva y tenemos un resultado falso negativo. Este mismo proceso se aplicó en el caso de las hembras no preñadas.

Las muestras fueron colectadas en el NO de la reserva La Payunia y en la estancia Los Peucos, con variaciones en la productividad primaria. Varios estudios indicaron que la excreción de metabolitos fecales de hormonas sexuales no se ve afectada por los cambios en la productividad primaria (Rabiee et al. 2002, Schwarzenberger 2007, Morden et al. 2011). Por lo tanto, para la construcción del modelo predictivo, se asumió que la variabilidad entre el NO de La Payunia y Los Peucos no influye de manera significativa en el diagnóstico de preñez. Para evaluar el ajuste del modelo, se consideraron los mismos métodos diagnósticos mencionados anteriormente (CI, R_{hat} , n_{eff}).

2.4 Resultados

2.4.1 Mediciones de E2 y P4 en el plasma

Este estudio se realizó cuando las hembras se encontraban aproximadamente en los 300 días de gestación, teniendo en cuenta que el proceso gestacional dura entre 335 y 360 días, podemos considerar que la preñez estaba avanzada. Las concentraciones de hormonas plasmáticas fueron significativamente más altas en las hembras preñadas que en las no preñadas (Figs. 2.5a y 2.5b; hembras preñadas: P4 = $17,3 \pm 6,1$ nmol/L y E2 = $580,9 \pm 330,2$ pmol/L; hembras no preñadas: P4 = $8,1 \pm 6,8$ nmol/L y E2 = $193,0 \pm 265,5$ pmol/L). El factor de Bayes indicó una fuerte evidencia a favor de la hipótesis alternativa,

es decir que hay diferencias entre las concentraciones de las dos hormonas analizadas de acuerdo con el estado de preñez de las hembras (Concentraciones de P4 - BF = 168,6% y CI = 10,7, 15,6; concentraciones de E2- BF = 39.5% y CI= 2.1, 2.5).

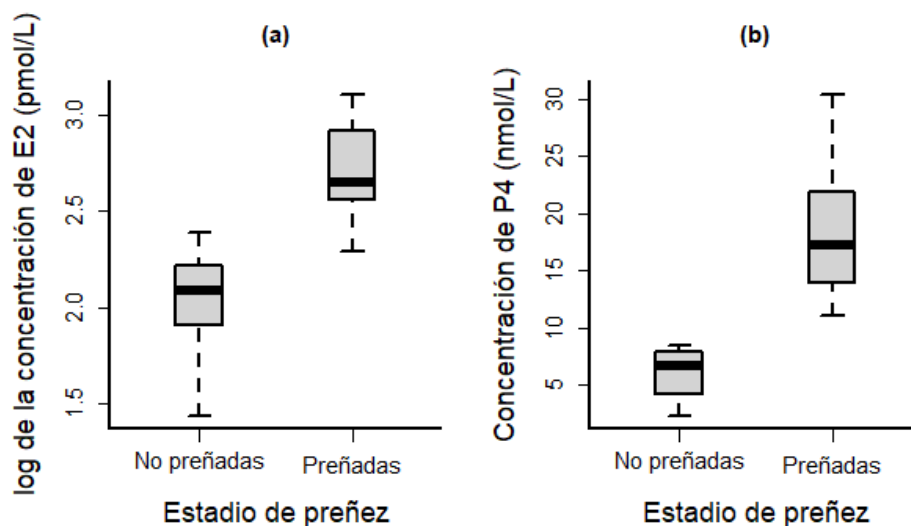


Fig. 2.5: Box plots indicando las diferencias en las concentraciones de hormonas plasmáticas a) Estradiol (E2) y b) progesterona (P4) entre las hembras preñadas y no preñadas de guanacos. Los gráficos muestran con una línea negra la mediana de las concentraciones hormonales, las cajas representan la distancia entre el cuartil 3 y el cuartil 1(Q3-Q1) y contienen el 50% de los datos. Los bigotes (líneas punteadas) representan el 25% de los datos del rango inferior y el 25% de los datos del rango superior.

2.4.2 Validación analítica de la técnica no invasiva de detección de EC y PdG en muestras fecales

Las curvas de paralelismo realizadas indicaron la validez analítica de la técnica de EIA en guanacos. El resultado del análisis de regresión lineal del con variables auxiliares del pool de extractos fecales realizado presentó un desplazamiento paralelo de EC ($R^2 = 0,96$, $p = 0,13$; Fig. 2.6a) y de PdG ($R^2 = 0,96$, $p = 0,47$; Fig. 2.6b) comparado con las diluciones de estándares, que indica las similitudes inmunológicas entre la solución de la muestra y la curva estándar.

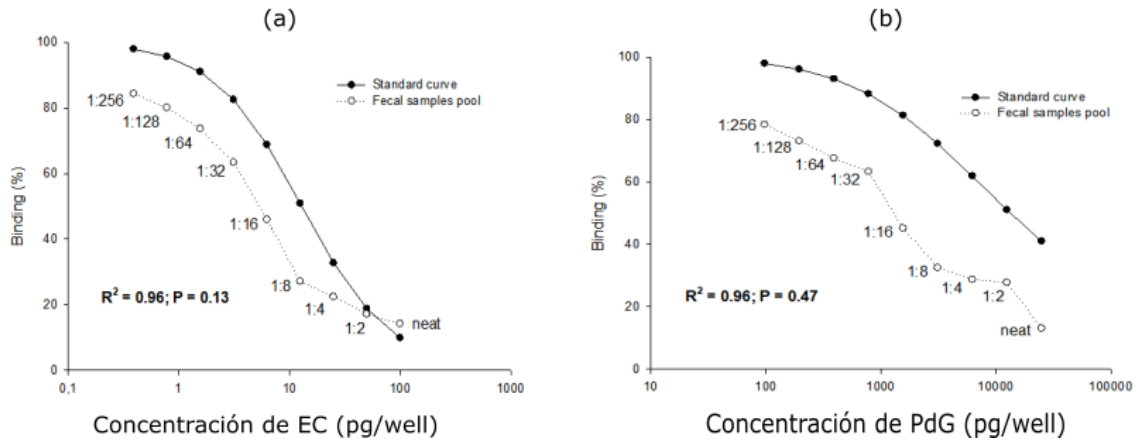


Fig. 2.6: Curvas de desplazamiento paralelo de (a) estrógenos conjugados (EC) y (b) glucurónidos de pregnanediol (PdG) en guanacos.

La recuperación de la hormona exógena en el rango de la curva estándar (EC = 0,01-2 ng/mL y PdG = 1,95-500 ng/mL) añadida a un pool de extractos fecales indicaba una baja interferencia de los componentes en las heces con unión de anticuerpos (EC= 91,43% ± 5,13%, $y = 1,00x + 0,01$, $R^2 = 0,99$, $P < 0,01$, Fig. 2.7a; PdG=81,9% ± 2,71%, $y = 0,82x + 12,76$, $R^2 = 0,99$, $P < 0,01$; Fig. 2.7b). La eficiencia de todo el procedimiento de extracción fecal con el disolvente fue de 85,74% ± 3,99% y 88,35% ± 4,88% para EC y PdG, respectivamente.

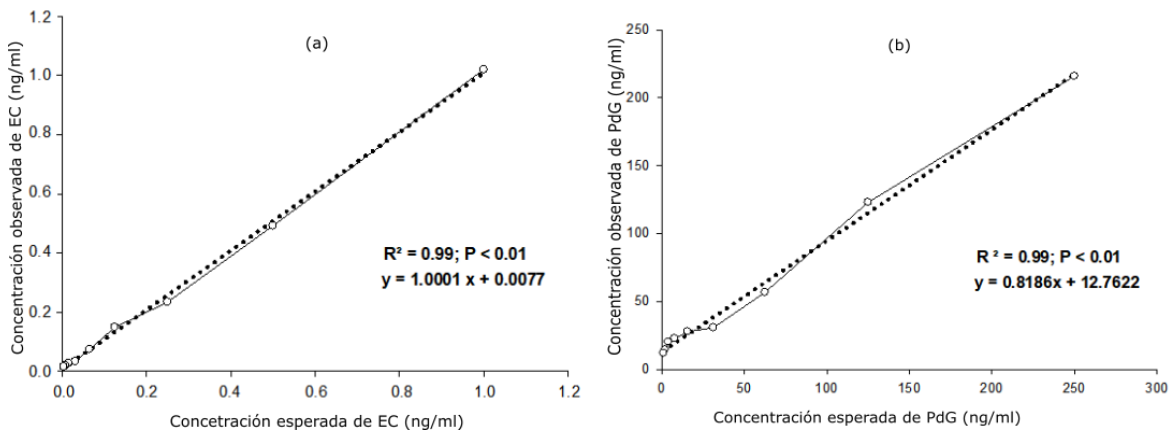


Fig. 2.7: Recuperación de hormona exógena (a) Estrógenos conjugados (EC) y (b) Glucurónidos de pregnanediol de pools de extractos fecales comparados con la cantidad adicionada de la correspondiente hormona.

2.4.3 Determinaciones de metabolitos de EC y PdG en las heces

Mediante tacto abdominal se estableció que de las hembras muestreadas para el análisis fecal (n = 69), 35 estaban preñadas y 34 no lo estaban. Las concentraciones de metabolitos fecales fueron mayores en las hembras preñadas que en las no preñadas. Se encontraron

diferencias en las concentraciones de EC y PdG (hembras preñadas: EC = $485,6 \pm 412,0$ ng/g y PdG = $81,9 \pm 58,5$ g/g; no hembras no preñadas: EC = $76,2 \pm 47,9$ ng/g y PdG = $45,4 \pm 24,4$ g/g). El factor de Bayes indicó una fuerte evidencia a favor de la hipótesis alternativa, es decir que las concentraciones de los metabolitos fecales son estadísticamente mayores en las hembras preñadas que en las no preñadas (EC: BF = $6,2 \times 10^{10}$ % y CI = 52,9, 74,5- Fig. 2.8a-; PdG-BF = 24,9 % y CI = 52,8; 74,6 Fig. 2.8b).

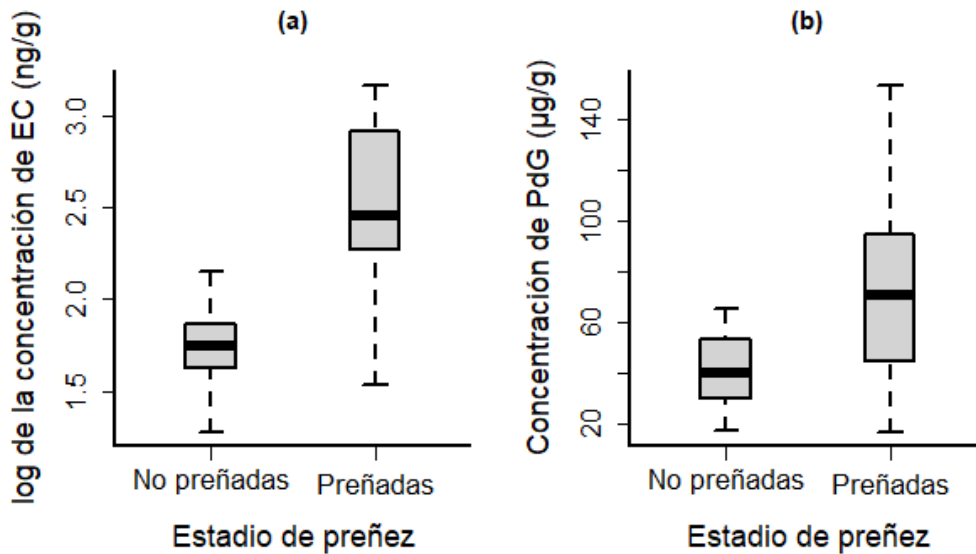


Fig. 2.8: Box-plots mostrando las diferencias en los metabolitos de (a) Estrógenos conjugados (EC) y de (b) Glucurónidos de pregnanediol (PdG) en heces de hembras preñadas y no preñadas de guanacos. Los gráficos muestran con una línea negra la mediana de las concentraciones hormonales, las cajas representan la distancia entre el cuartil 3 y el cuartil 1(Q3-Q1) y contienen el 50% de los datos. Los bigotes (líneas punteadas) representan el 25% de los datos del rango inferior y el 25% de los datos del rango superior.

2.4.4 Concentraciones de hormonas plasmáticas y su relación con metabolitos fecales

Las concentraciones plasmáticas de E2 y P4 mostraron una relación lineal con EC y PdG, respectivamente (Figs. 2.9.a y 2.9.b). El ajuste de los parámetros se presenta en la tabla 2.3. Los intervalos de credibilidad no mostraron superposición con el cero y el parámetro de convergencia de Gelmann – Rubin (R_{hat}) es cercano a 1 y menor a 1,1 en todos los casos.

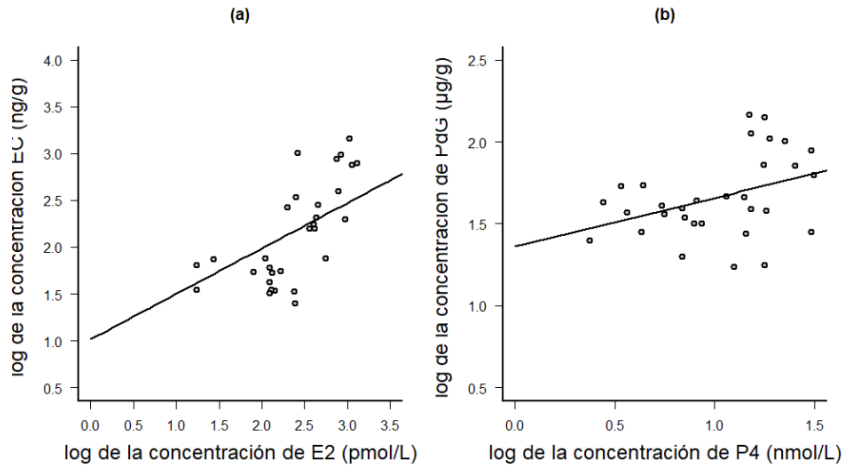


Fig. 2.9: Relación lineal entre las concentraciones de hormonas en plasma con sus metabolitos fecales. (a) Relación entre estradiol (E2) y estrógenos conjugados (EC); (b) relación entre la concentración de progesterona y glucurónidos de pregnanediol (PdG).

Tabla 2.3: Parámetros ajustados de las regresiones lineales entre las hormonas plasmáticas y sus metabolitos fecales. α_0 : intercepto de la relación lineal entre P4 y PdG; α_1 : pendiente de la concentración entre P4 y PdG; δ_0 : intercepto de la relación lineal entre E2 y EC; δ_1 : pendiente de la relación lineal entre E2 y EC.

Parámetros	Media	Desvío estándar	Intervalos de credibilidad			R_{hat}	n_{eff}
			2,5%	50%	97,5%		
α_0	1,51	0,08	1,45	1,51	1,67	1	24259
α_1	0,30	0,13	0,03	0,30	0,56	0,99	29563
δ_0	1,02	0,28	1,02	1,02	1,57	1	8508
δ_1	0,48	0,12	0,26	0,48	0,72	1	8083

2.4.5 Modelo predictivo de diagnóstico de preñez

La ecuación de regresión logística estimada para el modelo predictivo fue:

$$\text{logit}p_i = 0.495 - 1.697 \ln PdG_i + 3.827 \ln EC_i \quad (2.7)$$

$$p_i = \frac{\exp[0.495 - 1.697 \ln PdG_i + 3.827 \ln EC_i]}{1 - \exp[0.495 - 1.697 \ln PdG_i + 3.827 \ln EC_i]} \quad (2.8)$$

Las ecuaciones 2.7 y 2.8 contienen los valores promedios de la distribución posterior de los parámetros. Los intervalos de credibilidad, R_{hat} , y n_{eff} se reportan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Parámetros ajustados del modelo de regresión logística. β_0 es el intercepto de la regresión, β_1 es la pendiente de las estimaciones de PdG y β_2 es la pendiente de las estimaciones de EC.

	Media	Desvío estándar	Intervalos de credibilidad			R_{hat}	n_{eff}
			2,5%	50%	97,5%		
β_0	0,49	0,29	0,025	0,49	0,98	1	40084
β_1	-1,70	0,38	-2,52	-2,52	-1,05	1	6609
β_2	3,83	0,89	2,31	3,37	5,77	1	5385

Como se mencionó en la metodología, se probaron varias líneas de corte para evaluar cuál era la mejor para reducir las fallas del modelo en predecir el estado de preñez, es decir, cuál es la línea de corte con la que se obtenga el menor número de falsos negativos y falsos positivos. El valor de probabilidad que resultó en el mejor éxito de predicción para este modelo, fue de 0,4 (Fig.2.10).

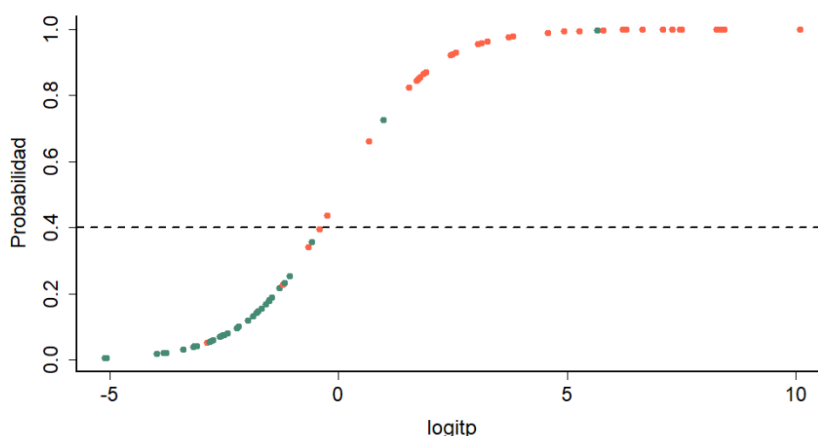


Fig. 2.10: Probabilidades asignadas al modelo de regresión logística. Logit de p calculado de acuerdo al modelo vs. la probabilidad de preñez predicha por el modelo. Mejor predicción con una probabilidad de 0.4, hembras diagnosticadas como preñadas, círculos naranjas; hembras no preñadas, círculos verdes.

En la tabla 2.5 se comparan del número de hembras diagnosticadas a campo como preñadas y no preñadas con las predicciones del modelo. El modelo predijo con precisión el 88,57% de las hembras preñadas y el 94% de las no preñadas (Tabla 2.5). Mediante tacto abdominal, 35 hembras fueron diagnosticadas como preñadas, de todas ellas, 31 fueron correctamente diagnosticadas por el modelo y 4 fueron incorrectamente diagnosticadas. De las 34 hembras asignadas a la categoría no preñadas por tacto abdominal, 32 fueron correctamente predichas por el modelo mientras que 2 fueron

incorrectamente asignadas a la categoría preñadas. La información de la tabla 2.5 se retoma en el capítulo 4 de la tesis en términos probabilísticos.

Tabla 2.5: Comparación entre el número de hembras preñadas y no preñadas muestreadas durante las esquilas, diagnosticadas mediante tacto abdominal y las predicciones de regresión logística.

Diagnóstico durante esquilas	Predicciones del modelo	
	Preñadas	No preñadas
Preñadas	31	4
No preñadas	2	32

2.5 *Discusión*

Este es el primer estudio en el que se desarrolla un modelo predictivo de diagnóstico de preñez utilizando métodos no invasivos en hembras de guanacos. Para desarrollarlo, se utilizaron metabolitos fecales de hormonas sexuales como indicadores del estado de preñez. Los resultados obtenidos indicaron que los niveles de EC y PdG son mayores en las hembras preñadas que en las hembras no preñadas durante el final de la gestación. Por consiguiente, los niveles de EC y PdG son buenos indicadores de preñez en el guanaco y podrían utilizarse a escala poblacional para evaluar la preñez en individuos no manejados. Dado que este es el primer estudio en el que se utilizaron metabolitos fecales de hormonas sexuales en el guanaco, fue necesario corroborar la relación directa entre las concentraciones de metabolitos fecales y las hormonas circulantes. Los niveles de hormonas plasmáticas y sus correspondientes concentraciones de metabolitos fecales mostraron una asociación fuerte (Tabla 2.4) que sustenta el uso de estos metabolitos como indicadores de los cambios hormonales (Figs. 2.9a y 2.9b).

Estudios anteriores realizados en guanacos que evalúan la variación de las concentraciones de hormonas sexuales durante el ciclo reproductivo indicaron que los niveles de E2 en las hembras preñadas fueron el doble que en hembras no preñadas (Riveros et al. 2009, 2010). En este estudio, los niveles de la concentración media de E2 fueron tres veces mayores en las hembras preñadas que en las no preñadas (Fig. 2.5a). Posiblemente parte de esta diferencia se deba a las técnicas de laboratorio utilizadas, dado que los trabajos de Riveros utilizaron radioinmunoensayo (RIA; Riveros et al. 2010) y quimioluminiscencia (CLIA; Riveros et al. 2009) para realizar los dosajes hormonales; por lo tanto, la comparación los resultados, debe realizarse con precaución. Sin embargo, estos son los resultados más completos del perfil secretorio de hormonas sexuales de las

hembras de guanacos disponibles hasta el momento y es por eso que los resultados se discuten en relación a los resultados de dichos autores y, por lo tanto, es importante comparar las tendencias generales más que los valores concretos.

Por otra parte, se debe considerar que el perfil de secreción E2 también varía de acuerdo con el reclutamiento folicular (Riveros et al. 2010); por lo tanto, la determinación de E2 por sí sola es un indicador débil de preñez. Por otro lado, los niveles de P4 permanecen bajos durante el reclutamiento folicular, aumentan luego del apareamiento y continúan aumentando hasta el parto (Riveros et al. 2009, 2010). Por esta razón, el uso de P4 o la combinación de E2 y P4 son buenos indicadores del estado de preñez en esta especie cuando la preñez está avanzada. Las diferencias en las concentraciones hormonales son suficientemente grandes para poder realizar un diagnóstico de preñez utilizando una única muestra, lo que nos lleva a aceptar la hipótesis 1. El mismo patrón se observó en varias otras especies de mamíferos (Schwarzenberger et al. 1991, 1995, 1996, Morden et al. 2011, Mastromonaco et al. 2015, Nagl et al. 2015, Ahuja-Aguirre et al. 2017). El análisis de regresión nos indicó que hay una relación lineal entre las concentraciones de hormonas plasmáticas y los metabolitos fecales de las mismas hormonas, por lo tanto, es posible aceptar la hipótesis 2. Los datos presentados en este capítulo demostraron claramente que los ensayos de antiseros policlonales y metabolitos de hormonas sexuales utilizados aquí pueden detectar variaciones en los metabolitos excretados a través de las heces en los guanacos y pueden ofrecernos la posibilidad de un monitoreo hormonal no invasivo del estado reproductivo de las hembras y de la variación de los metabolitos fecales a lo largo del año durante la gestación evitando la restricción física de los individuos.

La estimación de la tasa de preñez es un parámetro útil para el estudio y el manejo de las poblaciones de ungulados silvestres que rara vez es considerada en los modelos demográficos debido a que la captura y manipulación para el muestreo puede tener un fuerte impacto, tanto en el feto como en la madre (Cain et al. 2012). La utilización de metabolitos fecales requiere de su validación analítica y biológica y, por lo tanto, a priori es necesario algún tipo de metodología invasiva como la extracción de sangre o la toma de muestras de animales en espacios restringidos como corrales o zoológicos, pero luego, tienen la potencialidad de ser aplicados sobre diversas poblaciones sin la necesidad de volver a causar la restricción física de los animales. En este capítulo, se presentan los resultados de la validación analítica de los dosajes de PdG y EC y en el capítulo 3 se presentan los resultados de la validación biológica. En este sentido, es importante tener

en cuenta que esto es válido siempre que se utilicen los mismos anticuerpos y los mismos protocolos de extracción (Palme 2005). Por ejemplo, para realizar los dosajes hormonales presentados en este capítulo se realizó una extracción de esteroides utilizando metanol al 80% V/V y se aplicó una técnica de EIA competitivo. Pero algunos autores prefieren realizar la extracción con etanol (ver por ejemplo Mithileshwari et al. 2016) dado que este solvente es menos tóxico. La utilización de otros solventes para realizar la extracción, implica que los resultados ya no sean comparables y que se requiera de una nueva validación. Lo mismo ocurre si en lugar de utilizar un EIA se utiliza, por ejemplo, RIA (Palme 2005).

Aun así, estas técnicas cuentan con muchas ventajas que las hacen muy útiles cuando trabajamos con fauna silvestre. Algunas de ellas son: nos permiten tomar muestras durante todo el año, el dato que se obtiene es un valor medio de la concentración hormonal que evita el sesgo causado por las fluctuaciones que ocurren debido a el ritmo circadiano, metodológicamente las técnicas de EIA son fáciles de realizar y las muestras pueden almacenarse fácilmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un período de tiempo prolongado sin degradación (Schwarzenberger y Brown 2013, Kersey y Dehnhard 2014). Por lo tanto, el enfoque no invasivo tiene potenciales aplicaciones en diversos modelos biológicos para evaluar el estado de las poblaciones y tomar medidas de manejo de las especies, minimizando el disturbio de los animales, aumentando la seguridad tanto para los animales como para los investigadores, y evitando el posible sesgo de los datos debido a la manipulación de los animales (Pauli et al. 2010, Kersey y Dehnhard 2014, Valenzuela-Molina et al. 2018).

Además de las mediciones de concentraciones hormonales, en este capítulo se elaboró un modelo predictivo de preñez, basado en la medición de dos metabolitos fecales de hormonas sexuales que ha presentado un buen ajuste de los datos y un bajo nivel de falsos positivos y falsos negativos, lo que nos sugiere que la hipótesis 3 es correcta. Como se discutió en la introducción, pocos trabajos aplican metodologías no invasivas sobre poblaciones silvestres (Burgess et al. 2012, Cain et al. 2012). En este sentido, el trabajo propuesto aquí es innovador porque propone una metodología de diagnóstico de preñez que será aplicada en los próximos capítulos de esta tesis con el objetivo realizar diagnósticos de preñez en individuos no manejados de la población silvestre de guanacos de La Payunia. Además, el modelo tiene el potencial de facilitar el trabajo a los responsables del manejo de vida silvestre, proporcionando un método eficaz y útil para

estimar la preñez y la producción de crías en poblaciones silvestres de guanacos y otros ungulados silvestres. Debido a la facilidad de procesamiento computacional de los modelos de regresión logística, se puede evaluar un gran número de muestras en lugar de comparar el resultado del dosaje hormonal de cada muestra con valores de referencia. Además, este método facilita la extrapolación de los datos individuales a grandes poblaciones de ungulados. Aunque el modelo predictivo desarrollado aquí fue directamente aplicado al guanaco, este enfoque también podría considerarse para otras especies de mamíferos.

Capítulo 3: Validación biológica de la medición de metabolitos fecales de progesterona y estrógenos en guanacos. Utilización de la metodología en la población de La Payunia

3.1. Introducción

Las hormonas esteroideas juegan un papel fundamental en la fisiología reproductiva de las hembras. Estas hormonas participan en la producción de gametas, el reclutamiento folicular y el mantenimiento de la preñez. Entonces, el estado de preñez es un punto de partida para la evaluación de parámetros vitales dado que, para que una población crezca o al menos se mantenga estable, es fundamental que sus individuos se reproduzcan y haya una producción de crías que sustente la dinámica poblacional (Cain et al. 2012, Decesare et al. 2012, Kersey y Dehnhard 2014). En las especies de vida larga, si los factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes, inviernos muy fríos o sequías extremas, ponen en riesgo la vida de las hembras, éstas priorizarán su supervivencia sobre el éxito de la gestación (Russell et al. 1998). Entonces, la vida del feto podría considerarse uno de los primeros “sacrificios fisiológicos” que realizan las hembras cuando las condiciones ambientales son desfavorables. En este sentido, luego de la cópula y concepción del embrión pueden darse diversos escenarios en función de la disponibilidad de nutrientes, la presencia o no de una cría en pie del año anterior y la condición corporal de las madres: 1) que sea posible mantener la gestación y a la cría en pie; 2) que se favorezca el crecimiento de la cría en pie, en desmedro de la gestación o 3) que se favorezca la supervivencia de la hembra, se reabsorba el embrión y se realice el destete temprano de la cría (Kirkpatrick et al. 1993, Russell et al. 1998). Por lo tanto, el éxito de la gestación podría considerarse un indicador de la salud de una población (Lasley y Kirkpatrick 1991, Kirkpatrick et al. 1993). En este sentido, el conocimiento de la actividad ovárica mediante su monitoreo es uno de los primeros recursos con los que debemos contar para conocer la regulación de la reproducción y el éxito de la gestación (Hodges et al. 2010).

La generación de perfiles endocrinológicos mediante metodologías no invasivas es una de las formas más utilizadas para monitorear la actividad ovárica y la preñez en especies silvestres (Sontakke 2018). Como se discutió en el capítulo 2, éstas herramientas permiten tomar muestras fácilmente, sin causar estrés de captura en los individuos (Kirkpatrick et al. 1993, Schwarzenberger et al. 1995, 2000, Schwarzenberger 2007, Mastromonaco et al. 2015, Flacke et al. 2017, Brown 2018, Miller et al. 2021). La utilización de estas técnicas se fundamenta en que las hormonas que circulan en sangre son metabolizadas en el hígado y excretadas en las heces (Palme 2005, Schwarzenberger 2007). La

progesterona se metaboliza en varios progestágenos (5- α y 5- β pregnanos) y en caso de los metabolitos fecales de estrógeno consisten principalmente en estrona, estradiol-17 α , y estradiol-17 β (Bamberg et al. 1991, Schwarzenberger et al. 1991, 1996). Estos metabolitos se acumulan en la vejiga e intestino, entonces, lo que se observa en las heces es un resumen de lo que ocurrió en el organismo, más que un punto en el tiempo, que es lo que ocurre cuando se toma una muestra de sangre. Además, a causa de los mecanismos involucrados en la excreción, los metabolitos fecales reflejan un evento que sucedió un tiempo atrás (Palme 2005, Kersey y Dehnhard 2014). En general, la tasa de excreción es proporcional a la cantidad de hormona circulante, por lo tanto, los valores obtenidos son un reflejo de los cambios endocrinológicos ocurridos en el cuerpo (Kersey y Dehnhard 2014). Aun así, es importante validar biológicamente la metodología en el modelo de estudio, ya que los perfiles secretorios son diferentes en todas las especies (Palme 2005). En el caso de las hormonas reproductivas de las hembras, una forma muy utilizada es el seguimiento del proceso gestacional (Schwarzenberger 2007).

Durante la gestación ocurren diversos procesos en el ovario que involucran a los progestágenos y los estrógenos. Las variaciones cíclicas en sus concentraciones durante el ciclo estral se asocian a la receptividad o no receptividad en las hembras durante su vida reproductiva. Estas variaciones cíclicas han sido descritas en diversas especies de mamíferos ya sean ovuladores inducidos o espontáneos (Stornelli 2007, Crowe 2011). En los camélidos sudamericanos, el ciclo estral no ocurre y las hembras tienen la potencialidad de ser receptivas todo el año, aunque, en condiciones naturales, sólo se observan cópulas al final de la primavera y comienzo del verano, posiblemente debido a factores ambientales como la disponibilidad de vegetación (Sumar 1994, Urivola García y Riveros 2017). Endocrinológicamente, los estrógenos varían sus concentraciones durante todo el año según el reclutamiento folicular, al igual que en las especies con ciclo estral. Los progestágenos, en cambio, sólo se elevan si las hembras quedan preñadas, de lo contrario se mantienen bajos durante todo el año (Bravo et al. 1990, Miragaya et al. 2004, Riveros et al. 2009, 2010).

Como se mencionó en el capítulo 1, la ovulación en los camélidos sudamericanos es inducida por la cópula, para que ocurra, el folículo debe ser mayor a 7 mm de diámetro (Fowler y Bravo 2010). Por lo tanto, si en el momento de la cópula, ninguno de los folículos alcanzó ese tamaño, este proceso no ocurre y la hembra no queda preñada (Bravo 1994). Por el contrario, si la cópula ocurre durante la etapa de regresión folicular, el

folículo ingresa en una fase lútea corta (entre cinco o seis días), sin ovulación y con un aumento de las concentraciones de progesterona (Bravo 1994). Posiblemente esta fase lútea corta sea una de las razones de porque las hembras rechazan a los machos entre los días 6 y 7 luego de una cópula (Fowler y Bravo 2010). Finalmente, si el folículo tiene el tamaño adecuado, luego de la cópula, se dispara la ovulación y la fase lútea dura aproximadamente 12 días (Fig. 3.1; Fowler y Bravo 2010).

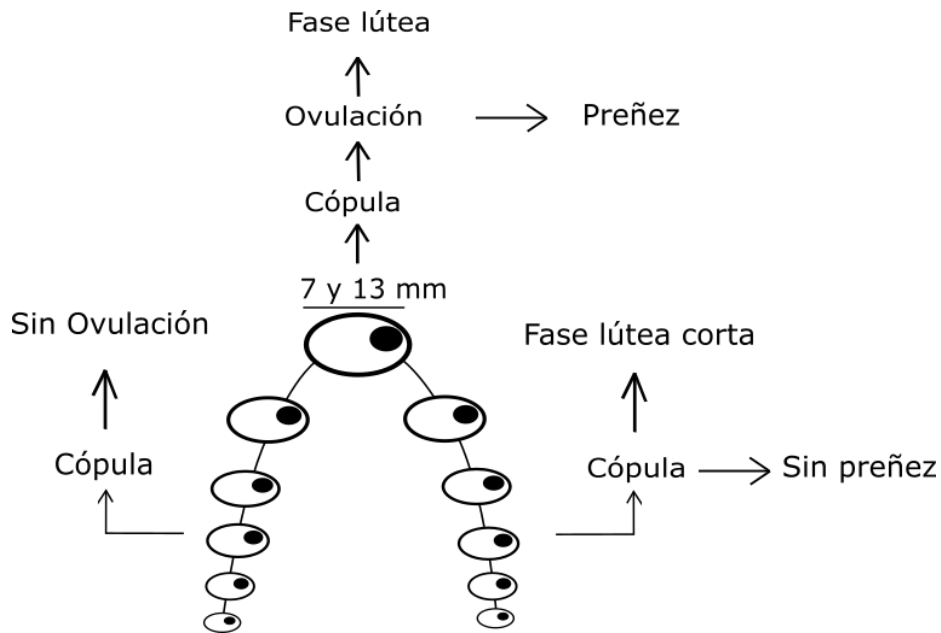


Fig. 3.4: Resumen de los procesos que ocurren en el ovario durante el reclutamiento folicular y la cópula. El crecimiento de los folículos va acompañado de un aumento en la concentración de estrógenos. Si la cópula ocurre cuando el folículo tiene un tamaño menor a 7 mm entonces no hay ovulación. Si la cópula ocurre cuando el folículo tiene entre 7 y 13 mm entonces ocurre la ovulación, se forma un cuerpo lúteo y posiblemente un embrión. Si la cópula ocurre cuando el folículo comenzó la etapa de regresión, entonces ocurre una fase lútea corta (cinco o seis días) que no sustenta la formación del embrión.

La cópula desencadena un reflejo periférico que es transmitido al hipotálamo causando la secreción de gonadotrofinas (GnRH). Estas hormonas actúan en la hipófisis anterior provocando la liberación de hormona luteinizante (LH) que actúa sobre el folículo induciendo la ovulación entre 24 y 48 horas después de la cópula (Ver Fig 1.1 del capítulo 1 de esta tesis; Fowler y Bravo 2010). El útero de los camélidos sudamericanos es bicorne y la implantación ocurre generalmente en el cuerno izquierdo; las implantaciones que ocurren en el cuerno derecho suelen resultar en abortos durante los primeros días de gestación. Los óvulos formados en el ovario derecho, migran al cuerno izquierdo para formar un embrión viable (Sumar 1994). Las razones de esto continúan en estudio y se

ha propuesto que podría deberse a diferencias en la regulación génica en la matriz extracelular uterina en la etapa de preimplantación embrionaria (Barraza et al. 2020).

La gestación de los camélidos dura entre 335 y 360 días (Bravo et al. 1990, Sumar 1994, Riveros et al. 2009). Durante ese tiempo en la hembra ocurren una serie de cambios hormonales que contribuyen a mantener la preñez. A nivel ovárico se observan aumentos en la concentración de la progesterona que alcanzan sus valores máximos entre los días 260 y 290 de la gestación y luego comienza a disminuir llegando a su nivel basal luego del parto. Por otra parte, el estradiol aumenta a partir del día 290 de la gestación y alcanza sus niveles máximos en el postparto (Tibary y Vaughan 2006, Riveros et al. 2009). Estudios realizados en camélidos sudamericanos domésticos indican que los abortos son poco frecuentes luego de los primeros 60 días de gestación y en general, se deben a infecciones, estrés o desbalances hormonales, y su incidencia es poco clara, aún en las especies domésticas (Vaughan y Tibary 2006, Rüfli et al. 2021). Si bien diversos aspectos de la fisiología de los camélidos sudamericanos son conocidos, la mayoría de la información disponible pertenece a las especies domésticas o a animales en condiciones de cautiverio (Bravo et al. 1990, Tibary y Vaughan 2006, Riveros et al. 2009, 2015, Vaughan 2011). En general, no hay información de las especies silvestres en condiciones naturales y para poder generar este tipo de datos es necesario desarrollar metodologías que nos permitan estudiar a los animales sin poner en riesgo la vida de las madres y ni la de los fetos.

3.2. Objetivos, hipótesis y predicciones del capítulo

La hipótesis 1 responde a la validación biológica de la metodología que consiste en demostrar que los anticuerpos utilizados para realizar el Enzimoimmunoensayo (EIA) *in house* utilizado en esta tesis son adecuados para evaluar la actividad ovárica durante la gestación en guanacos.

Hipótesis 1: Las variaciones en las concentraciones de los metabolitos fecales de progesterona (PdG) y estrógenos (EC) son detectadas por los anticuerpos utilizados y reflejan correctamente el estadio de preñez y las variaciones hormonales asociadas a la gestación.

Predicción H1: Los anticuerpos utilizados para realizar los EIA *in house* reflejarán el aumento constante en los metabolitos fecales de progesterona (PdG) y un aumento al final de la gestación en los metabolitos fecales de estrógenos (EC). Las variaciones de las

concentraciones de metabolitos fecales de estas hormonas presentarán un retraso si se los compara con los perfiles secretorios en sangre descritos en la bibliografía.

Objetivo 2: Estimar la preñez temprana y avanzada en la población silvestre de La Payunia.

Hipótesis 2: Las concentraciones de metabolitos fecales de progesterona y estrógenos difieren entre la preñez temprana y avanzada, por lo tanto, estas hormonas son indicadoras del éxito del proceso gestacional y su estadio.

Predicción H2: La concentración de metabolitos fecales de progesterona y estrógenos en la preñez temprana será menor que en la preñez tardía y permitirá realizar inferencias sobre el éxito del proceso gestacional.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Estudio en condiciones de cautiverio

3.3.1.1. Declaración ética:

La metodología experimental descrita en este capítulo fue evaluada y aprobada por el CICUAL (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio o Experimentación) del INIBIOMA bajo el protocolo N° 2020-021.

3.3.1.2. Diseño experimental, condiciones de manejo de los animales y toma de muestras

El trabajo de campo descrito en este apartado tuvo la colaboración de todos los miembros del grupo de trabajo, además de personas ajenas al grupo que generosamente nos ayudaron en las campañas que implicaron el manejo de los animales. Sin esta colaboración la realización de este experimento no habría sido posible. Todas estas personas se listaron en los agradecimientos de la tesis.

Para cumplir con el primer objetivo se colocaron siete hembras de guanacos con un macho en un corral de 25 Ha con pasturas naturales, agua y refugio a finales de la primavera. Esta época del año coincide con el inicio de la estación reproductiva en condiciones naturales (Franklin 1983, Young y Franklin 2004b). El corral cuenta con una manga que desemboca en corrales para el encierre de los animales. Estos corrales se abren hacia un brete que se conecta con un galpón para el manejo de los guanacos (Fig. 3.2).

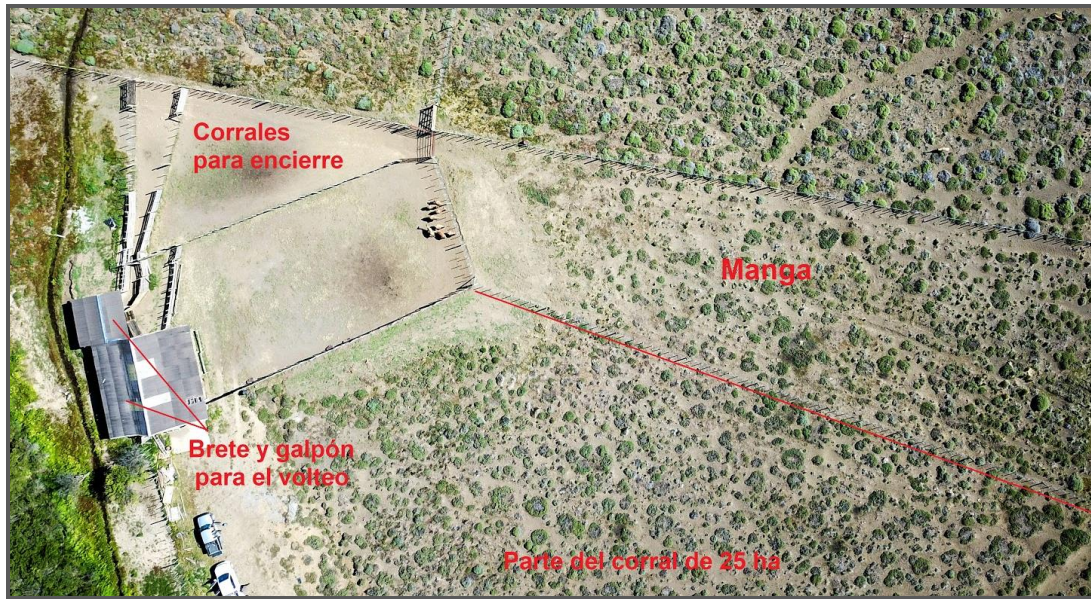


Fig. 3.5: Corral donde se colocaron las hembras con el macho y estructuras utilizadas para el manejo de los animales.

El número de individuos se seleccionó de manera que se asemeje a las condiciones naturales de un grupo familiar (Franklin 1983) y considerando la probabilidad de que alguna de las hembras no quede preñada o que tenga un aborto espontáneo durante los primeros meses de gestación (Smith 1985). Cada hembra se identificó con un collar de color diferente colocado durante la esquila realizada previamente (noviembre 2018) para facilitar su identificación a la distancia. Además, la Estancia mantiene los individuos marcados con un número de caravana, lo que facilitó conocer la edad de las hembras utilizadas. Se seleccionaron individuos de mediana edad, de entre siete y nueve años. Se dejó a las hembras en el corral de 25 Ha con el macho hasta fines de marzo de 2019 (Fig. 3.3, Tabla 3.1). Luego el macho fue retirado y se realizaron ecografías para confirmar la preñez. Desde diciembre de 2018, se colectaron muestras fecales una vez al mes y estas campañas se continuaron hasta el mes de febrero del 2020, luego del último parto.



Fig. 3.6: Hembras marcadas con collares de colores.

En general, la toma de muestra se realizó esperando que los individuos defecaran naturalmente. Antes de la confirmación de la preñez las hembras se seguían por el corral de 25 ha a unos 100 metros de distancia y se las monitoreaba con binoculares y telescopio. Cuando una de ellas defecaba, se colectaba la muestra. Luego del diagnóstico de preñez se realizaron eventos de captura una vez al mes (porque se sumaron algunos muestreos no relacionados a esta tesis) y se monitoreaba a las hembras en los corrales de encierre, cuando una de ellas defecaba, se colectaba la muestra y se limpiaba el resto del lugar. Las hembras sólo permanecían cuatro horas en los corrales porque la individualización de los animales de esta forma era más sencilla y, por lo tanto, la toma de muestras fue más ágil. Los arreos de los animales que permanecían en el corral de 25 Ha. se realizaron de a pie, guiando los animales hacia el brete, en donde se los inmovilizaban y muestreaban. Cuando se realizaron las ecografías de diagnóstico (marzo) y dos veces más durante la gestación (agosto y noviembre) los animales se voltearon siguiendo el protocolo de buenas prácticas de manejo de guanacos (Carmanchahi y Marull 2017). En estos tres eventos, la muestra fecal se tomó mediante extracción rectal, al igual que las muestras fecales tomadas en las esquilas (ver capítulo 2).

Tabla 3.1: Animales del plantel de la estancia Los Peucos con los que se trabajó en

Caravana	Fecha de Nacimiento	Edad en años	Edad en meses
I-432	26-01-2009	9	107
I-436	28-01-2009	9	107
K-504	22-12-2010	7	84
K-514	17-12-2010	7	84
K-550	12-01-2011	7	83
K-568	15-01-2011	7	83
K-592	26-01-2011	7	83

condiciones controladas.

En el comienzo de la época de partos se realizaron guardias todos los días entre las 8 y 18:00 Hs. para asegurar que la recolección de muestras fecales posparto comience rápidamente. En la bibliografía se ha descrito que las hembras de guanacos no tienen el comportamiento de defecar en bosteaderos, como los machos (Franklin 1983). Sin embargo, en este experimento las hembras comenzaron a formar bosteaderos que se marcaron con estacas numeradas para facilitar la toma de muestras postparto, evitando poner en riesgo a los chulengos con un encierro. Todas las muestras fecales se colocaron en bolsas plásticas individuales y se almacenaron en una conservadora con geles refrigerantes durante el día y luego en freezer a -20°C hasta su análisis.

3.3.1.3. Análisis de datos

Para calcular el día de concepción se tomó la fecha de parto y se consideró un tiempo de gestación promedio documentado en la especie de 347 días (Fowler y Bravo 2010) y se realizó una cuenta hacia atrás considerando como cero el día de parto y 347 días antes como la fecha de la concepción (Tabla 3.2; Russell et al. 1998, Fowler y Bravo 2010). Por ejemplo, si una hembra parió el día 9 de diciembre de 2019 y le restamos 347 días, entonces la concepción ocurrió aproximadamente el 27 de diciembre de 2018. Si bien la fecha de cópula es estimativa, es bastante certera en relación a las posibles fechas de concepción. Luego se dividieron los 347 días en intervalos de 20 días preparto y a las muestras colectadas se las ubicó en uno de esos intervalos, esto nos permitió alinear los dosajes hormonales y compararlos entre ellas. Posteriormente se calculó un promedio de todos esos valores (Tabla 3.3; Tabla A1 - Anexo).

Tabla 3.2: Fechas de parto y fecha aproximada de concepción del embrión.

Caravana	Fecha de Parto	Fecha de concepción estimada
I-432	09/12/2019	27/12/2018
I-436	18/12/2019	5/1/2018
K-504	13/12/2019	31/12/2018
K-514	No llegó a término	Indeterminada
K-550	No llegó a término	Indeterminada
K-568	1/2/2020	19/2/2019
K-592	1/1/2020	19/1/2019

Finalmente, se realizó un modelo mixto utilizando la variable tiempo como una variable fija y a las hembras como una variable aleatoria. Se utilizó el paquete MCMCglmm de R (Hadfield 2021). Se estableció una distribución previa normal para la variable aleatoria. Para realizar los análisis, en el caso de las muestras preparto fue necesario reagrupar las muestras en cuatro períodos, por lo tanto, se dividió el proceso en las siguientes etapas: comienzo de la gestación (los primeros 107 días de gestación), gestación temprana (próximos 60 días de gestación), gestación media (próximos 60 días) y gestación avanzada (últimos 60 días de gestación; Tabla 3.3). El primer intervalo de tiempo fue más largo porque en algunas hembras no se pudieron tomar muestras en los primeros meses del experimento (Ver tabla A.1 Anexo). Como se conocía el día de parto y la cuenta se realizó hacia atrás, los días preparto se representaron con números negativos y los días postparto con números positivos. Las muestras postparto se tomaron todos los días durante seis días.

Tabla 3.3: Resumen de los períodos analizados según el tiempo de gestación, se considera que el día de parto es el día cero y los días de gestación se cuentan en números negativos. El comienzo de la gestación se considera en el intervalo entre (-320, -240) y el final de la gestación corresponde con el intervalo (-60, 0).

Período	Etapas de la gestación	Días de gestación
Primero	Comienzo	(-347, -240)
Segundo	Temprana	(-220,-160)
Tercero	Media	(-140,-80)
Cuarto	Avanzada	(-60, 0)

Debido a las diferencias en los tiempos de muestreos (una vez al mes en las muestras preparto y una vez al día en las muestras posparto), los análisis estadísticos se realizaron por separado. En el caso de las muestras preparto, se tomó como nivel de referencia la gestación avanzada (entre 0 y 60 días), es decir, las otras etapas se compararon contra la preñez avanzada para evaluar diferencias. En el caso de las muestras posparto, se tomó el día cero (de parto) como nivel de referencia y resto de los días se compararon contra el día cero. Para evaluar si había diferencias entre las diferentes etapas de la gestación y el posparto se observó que los intervalos de credibilidad no contengan al cero y el número efectivo de cadenas markovianas (n_{eff}).

3.3.2. Estudio en condiciones silvestres

3.3.2.1. Toma de muestras en el campo

Para evaluar el éxito de la gestación en la población de guanacos de La Payunia, se colectaron muestras fecales de hembras de guanacos al comienzo de la preñez (febrero, marzo, abril) y en sus estadios finales (septiembre, octubre noviembre). Para ello, se recorrieron los caminos de la reserva a baja velocidad en una camioneta y al ver un grupo de guanacos se detuvo el vehículo. Los grupos se monitorearon utilizando binoculares y telescopio. Al ver un individuo defecar, se determinó su sexo, si era una hembra se colectaba la muestra, luego, se almacenaba en una bolsa plástica y se guardaba en una conservadora con geles refrigerantes durante el día. Al finalizar el día, todas las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) y una vez que llegaron al laboratorio, se depositaban en un freezer a -20 °C hasta su análisis. En octubre de 2016 se realizó un evento de manejo para esquila en La Payunia, las muestras obtenidas durante ese manejo, además de ser utilizadas para el capítulo 2, se consideran aquí como parte de la campaña de 2016. También se agregaron las muestras tomadas por el Dr. Ramiro Ovejero en los años 2007 y 2008 (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Resumen de las campañas realizadas en La Payunia para este capítulo, y las muestras sumadas de otras campañas.

Año de campaña	Fecha de recolección	Número de muestras	Colector
2007	Febrero - Marzo	9	Ramiro Ovejero
2007	Septiembre-octubre-noviembre	32	Ramiro Ovejero
2008	Abril	16	Ramiro Ovejero
2008	Octubre	18	Ramiro Ovejero
2016	Septiembre-Octubre	63	Antonela Marozzi
2017	Febrero	44	Antonela Marozzi
2017	Septiembre	31	Antonela Marozzi
2018	Febrero	31	Antonela Marozzi

3.3.3. Análisis de laboratorio

Los análisis de laboratorio de este capítulo se realizaron siguiendo el mismo protocolo que se describió detalladamente en el capítulo 2. Brevemente, las muestras fecales se secaron en estufa a 60 grados, se molieron y luego se realizó una extracción de los metabolitos fecales de las hormonas esteroideas utilizando metanol 80% V/V (Palme 2005). Finalmente, se realizaron mediciones de EIA *in house* en el Instituto de Investigaciones de Ciencias de la Salud (INICSA) del CONICET y la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Los anticuerpos policlonales y sus correspondientes conjugados de peroxidasa de rábano picante utilizados para las mediciones fueron sintetizados en la Universidad de Davis (UC Davis, USA; Munro y Lasley 1988). Se midieron Glucurónidos de pregnanediol (PdG, metabolitos fecales de progesterona) y estrógenos conjugados (EC, metabolitos fecales de estrógenos).

3.4. Resultados

3.4.1. Diseño en condiciones controladas

De las siete hembras empleadas en este experimento todas quedaron preñadas de acuerdo con el diagnóstico ecográfico, cinco de ellas parieron una cría viva. De las dos hembras que no parieron una cría viva, la hembra I432 se diagnosticó como no preñada en las ecografías realizadas en noviembre, aunque en marzo había sido diagnosticada como preñada. Esta hembra fue gravemente herida en una persecución por perros adentro del corral. Si bien se aplicaron inmediatamente antibióticos y se logró evitar cualquier infección, posiblemente el estrés causado por el ataque podría haber originado la

mortalidad del feto. En el otro caso, se encontró una cría muerta en el corral, por lo tanto, inferimos que pertenecía al individuo K550, dado que fue la otra hembra que no parió una cría viva. En este caso, no es posible saber si la cría nació muerta o si nació y murió a las pocas horas de vida.

La época de partos comenzó en diciembre (fecha del primer parto 9/12/2019) y finalizó en febrero (fecha del último parto 01/02/2020, ver tabla 3.2). Se observó un aumento de los metabolitos fecales de ambas hormonas durante la gestación. En el caso de los progestágenos se observó un ascenso gradual a diferencia de lo que se observó en los estrógenos que se mantuvieron bajos durante toda la gestación y se observó un aumento abrupto en los días previos al parto.

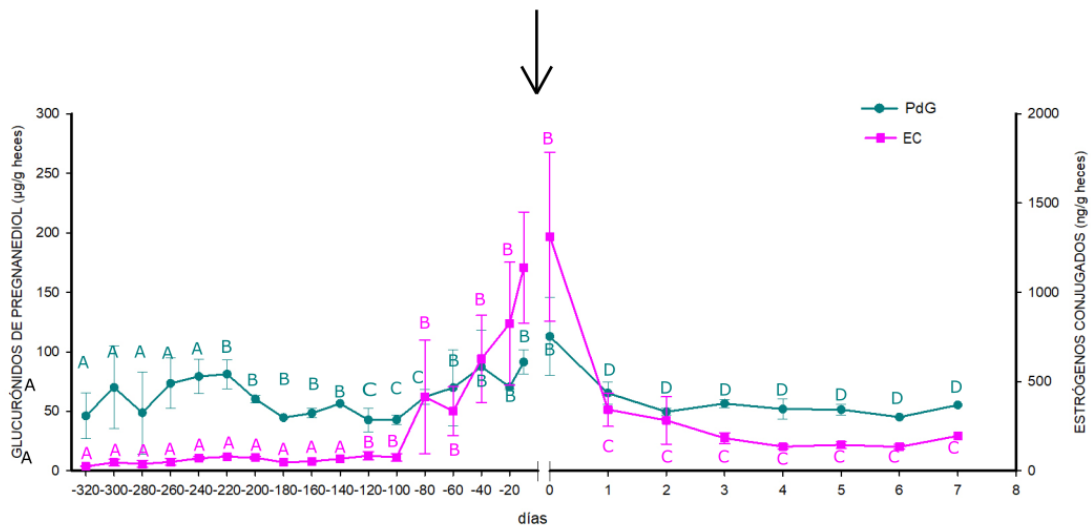


Fig. 3.7: Promedio de las concentraciones de Glucurónidos de Pregnanediol (PdG) y estrógenos conjugados (EC) en las hembras preñadas de la estancia Los Peucos. La flecha indica el momento del parto.

Los resultados obtenidos indican que hay diferencias en las concentraciones de progestágenos y estrógenos al final de la gestación en los últimos 60 días del preparto con respecto a los otros períodos (Fig. 3.4, Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Diferencias entre concentraciones estrógenos conjugados en muestras preparto en las diferentes etapas de la gestación. En negrita se indican los grupos que se diferencian del grupo de referencia (gestación avanzada período comprendido entre los 60 días preparto y el parto; n_{eff} =número efectivo de cadenas markovianas). Comienzo de la gestación (entre días -347 y -240), gestación temprana (días -220 y -160), gestación media (-140,-80), gestación avanzada (-60, 0).

Etapas de gestación	Media	Intervalos de credibilidad		n_{eff}
		25%	95%	
Intercepto	983.7	769.6	1187.7	4000
Comienzo de la gestación	-935.7	-1253.6	-620.6	4000
Gestación temprana	-915.3	-1258.7	-598.8	4000
Gestación media	-748.7	-1090.0	-438.6	4000

También se observaron diferencias en las concentraciones de estrógenos conjugados el día del parto en relación a los días postparto. Ya el día 1 postparto se observaron disminuciones en las concentraciones de estrógenos (Fig. 3.4; Tabla 3.6).

Tabla 3.6: Diferencias en las concentraciones de estrógenos conjugados entre el día de parto y los días postparto (n_{eff} =número efectivo de cadenas markovianas).

Días postparto	Media	Intervalos de credibilidad		n_{eff}
		25%	95%	
Intercepto	1719	1408	2014	4000
Uno	-1388	-1764	-1016	4000
Dos	-1472	-1841	-1101	4000
Tres	-1558	-1998	-1164	4000
Cuatro	-1574	-1991	-1136	4000
Cinco	-1551	-2043	-1091	3795
Seis	-1580	-1962	-1208	3821

Los resultados de las concentraciones de PdG preparto indican diferencias del segundo y tercer grupo de mediciones con respecto al cuarto grupo (Tabla 3.7 y 3.8).

Tabla 3.7: Diferencias entre concentraciones de glucurónidos de pregnanediol (PdG) en muestras preparto en las diferentes etapas gestacionales analizadas. En negrita se indican las etapas de la gestación que se diferencian de la etapa de referencia (n_{eff} =número efectivo de cadenas markovianas). Comienzo de la gestación (entre días -347 y -240), gestación temprana (días -220 y -160), gestación media (-140,-80), gestación avanzada (-60, 0).

Etapa de gestación	Media	Intervalos de credibilidad		n_{eff}
		25%	95%	
Intercepto	88.516	73.548	104.182	4900
Comienzo de la gestación	-22.269	-44.583	2.935	4997
Gestación temprana	-25.164	-50.897	-2.511	4900
Gestación media	-37.819	-63.682	-12.448	4900

Tabla 3.8: Diferencias en las concentraciones de estrógenos conjugados entre el día de parto y los días postparto (n_{eff} =número efectivo de cadenas markovianas).

Días postparto	Media	Intervalos de credibilidad		n_{eff}
		25%	95%	
Intercepto	139.30	102.88	178.74	4000
Uno	-70.35	-120.11	-26.88	4837
Dos	-92.43	-137.23	-41.82	4000
Tres	-86.42	-139.03	-32.47	3855
Cuatro	-88.18	-145.27	-38.75	4000
Cinco	-86.81	-148.30	-27.96	4000
Seis	-62.04	-109.45	-10.59	4000

3.4.2. Extrapolación de los resultados experimentales a la población silvestre

Debido a que durante los primeros meses de gestación los niveles de metabolitos fecales fueron bajos, sumado a que todas las hembras quedaron preñadas en el experimento, la asignación de una hembra como preñada o no preñada durante este período fue difícil. Para asignar a una hembra como no preñada, se utilizaron los datos de las

hembras no preñadas obtenidos en los eventos de manejo para esquilas y reportados en el Capítulo 2. Se utilizó la información correspondiente a los progestágenos, dado que los estrógenos durante los primeros meses de gestación permanecen bajos, como se observó en los resultados obtenidos en este capítulo en condiciones experimentales (Fig. 3.4). En el caso de algunas muestras de 2017 y 2018 la asignación del estado de preñez se dificultó porque las concentraciones de metabolitos hormonales no podían ser claramente asignadas a la categoría preñadas o no preñadas. Esto puede deberse a la variabilidad interindividual de las concentraciones hormonales (Bravo et al. 1990, Riveros et al. 2009). Estas muestras se descartaron del análisis.

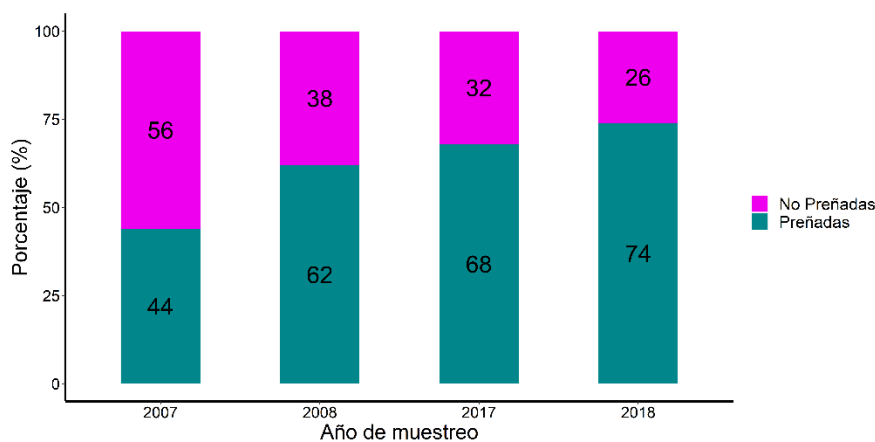


Fig. 3.8: Porcentaje de hembras preñadas y no preñadas durante los primeros meses de la gestación en la población de guanacos de La Payunia.

Para asignar los porcentajes de las hembras preñadas y no preñadas en la primavera (final de gestación) se utilizó el modelo predictivo elaborado en el capítulo 2.

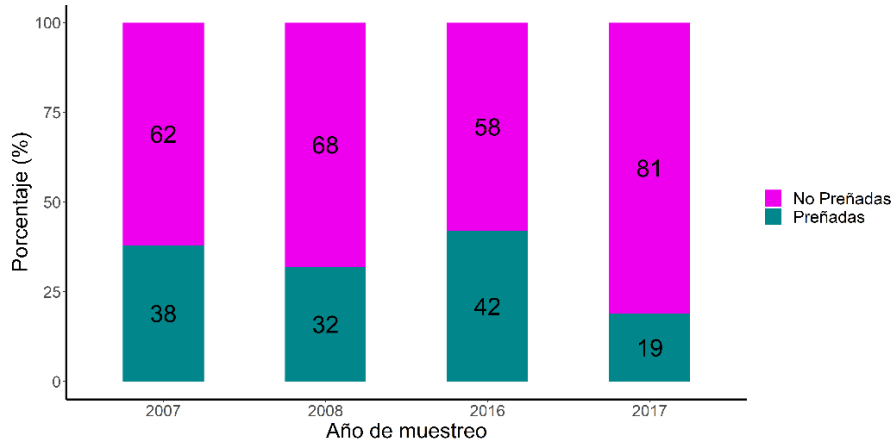


Fig. 3.9: Porcentaje de hembras preñadas y no preñadas al final de la gestación en la población de guanacos de La Payunia.

3.5. *Discusión*

Este es el primer estudio que valida biológicamente la aplicación de una metodología no invasiva para el seguimiento del proceso gestacional en guanacos. En el capítulo 2 se reportó la validación analítica de la metodología propuesta que muestra que el kit *in house* con el que se trabajó es adecuado en sensibilidad, exactitud y precisión para las mediciones realizadas (Palme 2005). Los resultados obtenidos aquí, complementan esa información y demuestran que las variaciones de las secreciones hormonales que sustentan el proceso gestacional pueden ser correctamente medidas en heces de guanacos utilizando la metodología propuesta en esta tesis.

Se observó un aumento gradual de la concentración de progestágenos durante la preñez y una disminución luego del parto. El perfil secretorio en sangre reportado por Riveros et al. (2009) indica una disminución de progesterona durante las últimas etapas de la gestación. Debido a los mecanismos involucrados en la excreción de hormonas esteroideas, los resultados que se observan en las heces tienen un retraso con respecto a lo que ocurre en la sangre (Palme 2005, Kersey y Dehnhard 2014). Por lo tanto, esta disminución preparto se observó recién en el primer día posparto. Los estrógenos también aumentaron en la última etapa de la gestación y descienden luego del parto, al igual que con los progestágenos, se observó un retraso en relación al perfil secretorio en sangre (Fig. 3.7; Riveros et al. 2009). En este sentido, si bien en muchas especies es suficiente la medición de metabolitos fecales de progesterona, posiblemente en el guanaco sea recomendable utilizar la información brindada por ambos metabolitos para realizar un diagnóstico más acertado en animales silvestres. Estos resultados además refuerzan el modelo predictivo propuesto en el capítulo 2, donde se utilizó la información brindada por los progestágenos y estrógenos para diagnosticar la preñez.

Estudios de este tipo se han realizado en otros mamíferos silvestres. Algunos ungulados en los que se estudiaron las variaciones de progestágenos son el ciervo almizclero (*Moschus chrysogaster*; Mithileshwari et al. 2016), la corzuela (*Mazama gouazoubira*; Pereira et al. 2006), el ciervo colorado (*Cervus elaphus*; White et al. 1995), entre otros. Además, las primeras etapas de la gestación se estudiaron en la vicuña (*Vicugna vicugna*) en el Parque Nacional Lauca (Norte de Chile; Schwarzenberger et al. 1995) y se observó un aumento notorio de los progestágenos al comienzo de la preñez (febrero) que se mantuvieron elevados hasta junio. Las concentraciones máximas de progestágenos se observaron en la semana 10 de gestación, a diferencia de los resultados obtenidos en esta

tesis que indican que en el guanaco un hay notorio aumento luego de la semana 30 de gestación (aproximadamente 80 días antes del parto) que se mantuvo hasta el final de la misma. No podemos comparar nuestros resultados con el perfil en vicuñas dado que el estudio de Schwarzenberger et al. (1995) finalizó en junio, varios meses antes del parto. Además, los autores del trabajo no evaluaron concentraciones de estrógenos.

En general, muchos de los estudios disponibles en la bibliografía realizan el seguimiento de progestágenos, ignorando el efecto de los estrógenos (ver por ejemplo Kirkpatrick et al. 1993, Garrott et al. 1998, Schoenecker et al. 2004, Mithileshwari et al. 2016, Flacke et al. 2017). El perfil secretorio de estas hormonas y, por lo tanto, su excreción suele ser más variable y por esa razón, en general no se eligen los estrógenos para realizar estudios de diagnósticos de preñez (Lasley y Kirkpatrick 1991, Schwarzenberger et al. 2000, Knott et al. 2013, Mastromonaco et al. 2015). Si bien es esperable que los metabolitos de progesterona sean buenos indicadores de la preñez, los resultados obtenidos aquí ponen en relevancia la información aportada por los estrógenos, durante las semanas próximas al parto en el guanaco. Esto no necesariamente es así en otros modelos biológicos (ver por ejemplo Mastromonaco et al. 2015, Nagl et al. 2015). Entonces, los estrógenos tienen el potencial de ser indicadoras de la proximidad del parto en el guanaco, evitando el manipuleo de los animales en instancias donde la preñez se encuentra avanzada y un tratamiento más invasivo puede poner en riesgo la vida del feto.

En este punto, también es importante recordar que la utilización de EIAs *in house* requiere de la validación de la metodología y por eso, es muy importante conocer el origen de los anticuerpos y el tipo de EIA que se realiza (Palme 2005). Las mediciones realizadas en esta tesis, se obtuvieron mediante un EIA competitivo y, por lo tanto, sólo pueden compararse con otros resultados que hayan utilizado los mismos anticuerpos policlonales y sus correspondientes conjugados de peroxidasa de rábano picante producidos en la Universidad de Davis (Anti –EC R522-2 y anti-PdG R13904; C.J. Munro, Department of Population Health and Reproduction, University of California Davis, Davis, California, USA). Existen otros anticuerpos e incluso algunos kits comerciales diseñados para metabolitos fecales (Arbor Assays 2011, 2015). Si se realizaran mediciones de metabolitos fecales utilizando otros anticuerpos u otro protocolo de extracción, los valores absolutos ya no serían comparables con los obtenidos en esta tesis y sería necesario realizar nuevamente una validación de la metodología mediante las pruebas de recuperación y precisión, además de una nueva validación biológica. Aun así, es posible

comparar tendencias generales (Schwarzenberger 2007). Entonces, los resultados obtenidos indican que es posible aceptar la hipótesis 1, los anticuerpos con los que hemos trabajado son adecuados para evaluar la actividad ovárica durante la gestación en guanacos y se observó un aumento paulatino de los progestágenos durante toda la gestación y un aumento de los estrógenos conjugados al final de la misma.

Durante la toma de muestras postparto se observó que, en ocasiones una sola madre parecía estar cuidando más de una cría (Fig. 3.10). En la bibliografía se reportaron algunos casos de aloamamantamiento tanto en condiciones de cautiverio como de silvestría (Zapata et al. 2009b, 2009a) y se ha propuesto que esto podría deberse a una mala condición corporal de las madres biológicas (Zapata et al. 2010). En este estudio la condición corporal de las madres era buena, por lo tanto, es necesario continuar explorando sobre este tipo de comportamientos, dado que sólo un trabajo lo ha evaluado hasta el momento en condiciones silvestres (Zapata et al. 2009a).



Fig. 3.10: Hembra seguida por cuatro crías sin otras madres cerca de ella.

Por otra parte, los resultados obtenidos de la población silvestre de La Payunia indicaron una mayor proporción de hembras preñadas al comienzo de la gestación que al final de la misma, y una notoria variación interanual (Figs. 3.5 y 3.6). Además, para evaluar la preñez temprana, no fue suficiente comparar las concentraciones de metabolitos fecales de hembras preñadas al comienzo de la gestación, sino que fue necesario comparar las concentraciones con la información de las hembras no preñadas. En algunos casos, no fue posible asignarlas al estatus preñadas o no preñadas, incluso utilizando la información del capítulo 2. Esto ocurrió principalmente en las muestras colectadas en febrero (Campañas de 2017 y 2018). Posiblemente, si se quiere realizar un diagnóstico de preñez temprana, sea recomendable evaluarla cuando se encuentra más avanzada, en marzo o abril, porque

en los primeros dos meses de gestación, la variabilidad fisiológica entre individuos dificulta la correcta asignación al estatus de preñez. Entonces, al comienzo de la gestación, las concentraciones de metabolitos fecales entre las hembras preñadas y no preñadas en algunos casos no son suficientemente diferentes. Asimismo, es importante marcar que los resultados presentados en el capítulo 2 y la información disponible en la bibliografía sobre las concentraciones hormonales en hembras no preñadas indica que son notoriamente más bajas durante toda la gestación (Riveros et al. 2009). Por lo tanto, si se tomaran muestras con la gestación uno o dos meses más avanzada, ya sería suficiente para realizar un diagnóstico de las primeras etapas de la preñez, principalmente utilizando metabolitos de progesterona, dado que los estrógenos aumentan recién al final de la misma. Por consiguiente, comparar las concentraciones de progestágenos de hembras con estado de preñez desconocido con las concentraciones de hembras no preñadas (teniendo en cuenta la dispersión de los datos), podría ser un criterio válido para el diagnóstico de preñez a partir de los tres meses (90 días) de gestación. Es decir, durante los primeros meses de la gestación, si las concentraciones de progestágenos son notoriamente mayores al intervalo de concentraciones esperado para hembras no preñadas, se puede considerar que esa hembra se encuentra preñada. En los últimos 20 - 30 días de gestación, la utilización de los dos metabolitos fecales es adecuada para realizar un diagnóstico de preñez, como se observó en los resultados de este capítulo y del capítulo 2.

También es importante tener en cuenta que el número de muestras colectadas en algunos casos fue bajo y posiblemente esto podría influir en las estimaciones de los porcentajes (Tabla 3.4). Aun así, el hecho de que en todos los casos veamos una menor proporción de hembras preñadas en la etapa final de la gestación sugiere que existe un número de hembras en las que la gestación no llega a término. Posiblemente factores como el clima o la productividad primaria estén influyendo sobre el éxito del proceso gestacional. Además, al igual que en la mayoría de los mamíferos, un cierto número de abortos ocurren espontáneamente debido a variaciones hormonales o metabólicas (Fowler y Bravo 2010). Los resultados obtenidos no permiten aceptar en su totalidad la hipótesis 2, dado que no fue posible en todos los casos realizar un correcto diagnóstico de preñez temprana, aunque sí fue posible observar las variaciones entre la preñez temprana y avanzada.

Las hembras de ungulados silvestres tienden a favorecer su supervivencia por sobre la reproducción (Hamel et al. 2010, Anouk Simard et al. 2014). En este sentido, una vez ocurrida la concepción, el éxito reproductivo va a estar en gran parte determinado por las

condiciones ambientales, por ejemplo, las fuertes nevadas que reducen el acceso a la vegetación y, por lo tanto, a la posibilidad de acumular nutrientes (Anouk Simard et al. 2014). Futuras investigaciones deberían estar orientadas a comprender la influencia de la disponibilidad de nutrientes y la condición corporal de las hembras al comienzo del proceso gestacional y durante su desarrollo (Russell et al. 1998). Posiblemente, las hembras que se encuentren en una mala condición corporal, no estén en condiciones metabólicas de sostener la preñez (Kirkpatrick et al. 1993, Russell et al. 1998, Albon et al. 2017). Los ungulados silvestres son un grupo de mamíferos extraordinariamente diversos con grandes variaciones en su biología reproductiva, ya sea en su anatomía, comportamiento y estacionalidad (Sontakke 2018). Por lo tanto, adquirir el conocimiento básico de su reproducción es un gran desafío que se debe abordar antes de tomar decisiones de manejo que puedan influir sobre este aspecto tan delicado de su vida.

Apéndice A1

Tabla A1: Concentraciones de glucurónidos de pregnanediol (PdG) y estrógenos conjugados (EC) de las hembras de guanacos que se preñaron en la estancia Los Peucos

Hembra	Fecha de muestreo	Tiempo de gestación	PdG	EC
K514	20/3/2019	-260	23,09	15,10
k514	30/3/2019	-240	96,53	62,67
K514	24/4/2019	-220	64,43	85,30
K514	18/5/2019	-200	63,07	69,69
		-180		
K514	1/7/2019	-160	40,89	52,06
		-140		
		-120		
K514	24/8/2019	-100	37,77	48,64
K514	18/9/2019	-80	61,72	123,65
		-60		
K514	18/10/2019	-40	67,67	247,71
K514	23/11/2019	-20	64,03	1687,05
K514	5/12/2019	-10	79,65	1876,72
K514	9/12/2019	0		
K514	10/12/2019	1	87,04	590,81
K514	11/12/2019	2	45,02	129,68
K514	12/12/2019	3	49,77	153,88
K514	13/12/2019	4	58,83	170,53
K514	14/12/2019	5	46,79	164,47
K514	15/12/2019	6	161,25	149,94
K514	16/12/2019	7	55,30	195,43
K504	17/1/2019	-320	26,89	22,69
K504	15/2/2019	-300	35,25	26,79
		-280		
K504	20/3/2019	-260	53,82	19,64

K504	30/3/2019	-240	91,05	86,77
K504	24/4/2019	-220	98,22	78,76
K504	18/5/2019	-200	67,68	95,06
		-180		
K504	1/7/2019	-160	41,91	53,6018
		-140		
		-120		
K504	24/8/2019	-100	54,45	56,1603
K504	18/9/2019	-80	58,32	79,3092
		-60		
K504	18/10/2019	-40	45,63	216,5229
K504	23/11/2019	-20	70,10	296,0485
K504	5/12/2019	-10	92,44	879,0727
K504	13/12/2019	0	177,41	2387,6238
K504	14/12/2019	1	88,78	368,9317
K504	15/12/2019	2	55,58	666,5345
K504	16/12/2019	3	61,19	241,1577
		4		
		5		
		6		
K592	15/2/2019	-320	65,27	25,8084
		-300		
K592	20/3/2019	-280	14,29	18,5933
k592	30/3/2019	-260	104,80	94,1241
K592	24/4/2019	-240	50,40	61,9884
K592	18/5/2019	-220	56,48	81,2583
		-200		
K592	1/7/2019	-180	44,68	47,2866
		-160		
		-140		

K592	24/8/2019	-120	32,76	60,8349
K592	18/9/2019	-100	40,76	137,6885
		-80		
K592	18/10/2019	-60	37,99	196,6337
K592	23/11/2019	-40	58,40	807,6955
K592	14/12/2019	-20	72,12	1070,0481
K592	24/12/2019	-10	126,63	1501,5216
K592	1/1/2020	0	157,24	1490,9664
K592	2/1/2020	1	51,97	142,4356
K592	3/1/2020	2	52,94	85,4500
		3		
K592	5/1/2020	4	65,3519	119,8545
		5		
K592	7/1/2020	6	45,51	107,4917
		-320		
k568	30/3/2019	-300	104,92	66,118885
K568	24/4/2019	-280	83,19	57,4450338
		-260		
		-240		
		-220		
K568	1/7/2019	-200	54,94	54,9659483
		-180		
K568	24/8/2019	-160	55,91	50,0340609
K568	18/9/2019	-120	56,54	67,4145169
K568	18/10/2019	-100	52,73	107,448175
		-80		
K568	10/12/2019	-60	79,59	1369,87806
K568	15/12/2019	-40	101,65	470,280757
K568	3/1/2020	-20	177,86	1236,11224
K568	1/2/2020	0		

K568	2/2/2020	1	65,15	71,567414
K568	3/2/2020	2	36,23	90,5247076
K568	4/2/2020	3	47,85	119,096736
		4		
K568	6/2/2020	5	58,58	152,308563
K568	7/2/2020	6	56,00	126,608048
		-320		
		-300		
		-280		
I436	30/3/2019	-260	112,25	69,2976
		-240		
I436	24/4/2019	-220	105,76	70,1930
I436	18/5/2019	-200	55,55	73,2687
		-180		
K568	1/7/2019	-160	54,94	54,9659483
		-140		
		-120		
I436	24/8/2019	-100	38,44	58,1803
I436	18/9/2019	-80	48,73	81,9776
		-60		
		-40		
K568	5/12/2019	-20	75,86	245,9571
I436	10/12/2019	-10	93,30	1367,2079
I436	18/12/2019	0	80,91	1281,5797
I436	19/12/2019	1	50,62	492,6743
I436	20/12/2019	2	44,63	248,6313
I436	22/12/2019	4	27,23	122,8856
I436	24/12/2019	6	44,64	143,7673

Capítulo 4: Estimación del reclutamiento poblacional mediante el desarrollo de una metodología innovadora

4.1. Introducción

Los factores que explican cambios en el tamaño poblacional son un tema central en la ecología de poblaciones, manejo de vida silvestre y biología de la conservación (Gaillard et al. 1998, Caswell 2001). Por ello, el monitoreo de las tendencias poblacionales resulta fundamental para la conservación de especies. La forma más adecuada de realizar estos monitoreos, principalmente en poblaciones bajo manejo, es considerando la estructura de edades de la población, y luego estimar parámetros poblacionales, como la tasa de natalidad, la supervivencia o el reclutamiento poblacional. Para realizar este tipo de monitoreos además de contar a los individuos, es necesario asignar una clase etaria y, de ser posible, establecer el sexo de los mismos (Gaillard et al. 2000). Mediante el análisis de estos parámetros se pueden estudiar relaciones entre factores ambientales y componentes específicos de la demografía, como, por ejemplo, el efecto de la mortalidad en una determinada clase etaria. Cuando ignoramos la estructura de edades y calculamos sólo densidades, podemos ver tendencias generales de las poblaciones, pero perdemos la información de cada grupo etario (Gaillard et al. 2000, Johnson et al. 2010). Además, para cada modelo de estudio, es fundamental conocer cuáles son los parámetros adecuados, dado que esto puede variar en diferentes taxa (McCullough 1992, Scott y Seigel 1992, Sæther et al. 2002, Sibly et al. 2005). Por ejemplo, en anfibios y reptiles es más útil realizar un monitoreo sobre sub-adultos y adultos que sobre neonatos y juveniles a diferencia de lo que ocurre en grandes herbívoros (Scott y Seigel 1992).

Cuando se trabaja con grandes mamíferos, uno de los problemas más frecuentes en la ecología de poblaciones es la necesidad de contar con series de tiempo lo suficientemente prolongadas para evaluar correctamente la dinámica de las mismas (Eberhardt 1991, Månsson et al. 2007). En el caso de los ungulados, esto podría significar contar con varias décadas de relevamientos poblacionales (Clutton-Brock y Coulson 2002). En ocasiones, los datos disponibles de una población son fragmentados y la forma de tomarlos puede variar a lo largo del tiempo. Por lo tanto, la utilización de series temporales o algunos otros métodos tradicionales como las regresiones para la estimación de parámetros poblacionales ha sido discutida en la bibliografía, porque muchas veces, se requiere de grandes volúmenes de datos que no se encuentran disponibles para la toma de decisiones o para evaluar el estatus de una población (Decesare et al. 2012; Bowyer et al. 2014).

Además, requiere establecer supuestos tales como que la variabilidad de entre poblaciones diferentes es baja y que el comportamiento de los parámetros poblacionales en poblaciones de la misma especie es semejante (Pfister 1998, Soetaert y Herman 2009). Debido a ello, en ecología de poblaciones se comenzaron a utilizar otras herramientas como las simulaciones que facilitan el análisis de factores complejos en los sistemas naturales como la estructura de edades o la densodependencia (Ferson et al. 1989).

Uno de los efectos más estudiados en ecología de poblaciones es la denso-dependencia, que es el fenómeno por el cual el valor de un parámetro vital como la supervivencia o la fecundidad depende de la densidad poblacional (Ginzburg et al. 1990). En estos casos, la fecundidad promedio de un individuo, el éxito reproductivo o las chances de que el individuo muera, no son constantes o estadísticamente estacionarias, sino que se modifican en función de la densidad de la población (Bonenfant et al. 2009). Los datos necesarios para calibrar modelos densodependientes incluyen mediciones de abundancias, muchas veces de grupos etarios que son difíciles de cuantificar como los neonatos y los juveniles (Ginzburg et al. 1990). En este sentido, las simulaciones pueden utilizarse para generar datos del sistema bajo estudio y para testear los procedimientos de estimación (Bolker 2008). Dado que nunca conocemos la respuesta a una pregunta ecológica y sólo tenemos mediciones imperfectas que nos acercan a ella, las simulaciones son una manera de evaluar si podemos estimar correctamente los parámetros de un sistema ecológico, con la información que contamos o el modelo que proponemos (Bolker 2008).

Uno de los principales parámetros a evaluar cuando se trabaja con grandes herbívoros es el reclutamiento, que es una medida de la adición de nuevos individuos a la población mediante la reproducción e inmigración y debe medirse luego que ocurrió la mayor mortalidad del grupo etario bajo estudio (Gaillard et al. 2008). Por ejemplo, en guanacos, la mayor mortalidad de las crías ocurre durante los primeros tres meses de vida y, por lo tanto, es recomendable medir el reclutamiento cuando los individuos pasaron ese primer período (Sarno et al. 1999). Este parámetro es un fuerte determinante en los cambios en el tamaño de la población (Gaillard et al. 1998) y mediante su estudio, es posible comprender los factores que influyen en la dinámica poblacional de los grandes ungulados resumiendo la información de otros parámetros demográficos más difíciles de medir como la natalidad o la mortalidad y, por esta razón, el reclutamiento es ampliamente utilizado en los planes de manejo y estudios ecológicos de grandes

ungulados (Hatter y Bergerud 1991, Decesare et al. 2012). La tasa de reclutamiento, es el resultado de una serie de procesos que están potencialmente afectados por las condiciones ambientales (Marino et al. 2014, Paterson et al. 2019). Algunos de estos procesos son la probabilidad de concepción, la supervivencia en el útero hasta el nacimiento y la supervivencia de la cría desde el nacimiento hasta el año de edad (Paterson et al. 2019). Los cuidados parentales también influyen sobre el reclutamiento de manera variable durante los diferentes momentos de vida de la cría. En la gestación y la lactancia, el estado nutricional de las madres regula el estado nutricional de las crías y, por lo tanto, su probabilidad de supervivencia. Este efecto se va modificando conforme la cría crece y se hace más independiente (Lubow y Smith 2004). En la medida que los individuos se alimentan solos, la influencia de la productividad primaria y las lluvias es mayor y éstos son los principales reguladores de este parámetro poblacional. La primera, determina la ganancia de masa corporal, y la segunda es un factor clave para regular disponibilidad de alimento (Owen-Smith y Mason 2005, Vors y Boyce 2009).

En poblaciones que no pueden asumirse cerradas, podrían estar incorporándose individuos provenientes de otros núcleos poblacionales cercanos y, por lo tanto, se podría proponer que las inmigraciones y las emigraciones influyen sobre el reclutamiento (Gaillard et al. 2008). Aun así, se ha observado que el reclutamiento continúa siendo un buen indicador de la dinámica de poblaciones abiertas (Mahoney y Schaefer 2002, Rolandsen et al. 2017). Por ejemplo, estudios realizados en poblaciones parcialmente migratorias de alces (*Alces alces*) indican que la supervivencia de las crías nacidas de madres residentes (que no se desplazaron) fue semejante a la de crías de madres migratorias y que su supervivencia anual no estuvo influenciada por el movimiento de las madres. Además, se observó que, al igual que en poblaciones sedentarias, el reclutamiento es un parámetro ampliamente variable y, por lo tanto, regulador de la población de esta especie (Rolandsen et al. 2017). También, las densidades poblacionales y su relación con la disponibilidad de nutrientes son factores reguladores de este parámetro y, en general, el reclutamiento tiende a ser densodependiente (Mahoney y Schaefer 2002, Sibly et al. 2002, Pierce et al. 2012). Esto ha sido observado en diversas poblaciones de ungulados, como por ejemplo poblaciones migratorias de Caribou (*Rangifer tarandus*), en ausencia de depredadores (Mahoney y Schaefer 2002).

En presencia de depredadores, su influencia en la regulación de las poblaciones de grandes herbívoros es menor que la que tiene la disponibilidad de alimento. En

consecuencia, los efectos de abajo hacia arriba o *bottom up* (i.e: productividad primaria, disponibilidad de nutrientes) son los que predominan en la regulación de las poblaciones de ungulados y, en general se espera que el reclutamiento sea densodependiente (Sibly et al. 2002, Pierce et al. 2012). Asimismo, en algunas poblaciones los efectos de la depredación están influenciados por la densodependencia mediante mecanismos de selección de hábitat, como se observó en poblaciones de ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*): cuando hay una elevada densidad de hembras, algunas de estas son desplazadas a hábitats desfavorables donde sus crías quedan más expuestas a predadores generalistas, y esto tiene un efecto sobre la supervivencia de las mismas (Hurley et al. 2020). Resumiendo, las poblaciones de ungulados tienden a mostrar un reclutamiento densodependiente, aún en contextos muy variables como los comportamientos migratorios, la presencia o ausencia de predadores y las variaciones climáticas.

Tradicionalmente, el reclutamiento se evalúa mediante conteos de animales en un momento dado en el tiempo y luego estimando la relación crías: hembras (C:H), este parámetro también ha sido utilizado para realizar otras estimaciones como: 1) la natalidad, cuando el recuento se realiza al final de la temporada de nacimientos (Fryxell y Sinclair 1988, Eberhardt et al. 1996, Laurian et al. 2000) y 2) la supervivencia, mediante la disminución en la relación C:H entre la época de partos y el año de edad de las crías (Sarno et al. 1999). Muchas veces, la estimación de la relación C:H se realiza mediante métodos de detección imperfecta y en algunas poblaciones, el recuento de crías o el sexado de individuos resulta difícil, debido a las características de la especie (ej.: falta de dimorfismo sexual, los adultos tapan a las crías) o del paisaje que dificulta de la detectabilidad, entre otros (Bonenfant et al. 2005, Buckland et al. 2016). Si bien los métodos de detección imperfecta han sido desarrollados teniendo en cuenta estos factores y permiten modelarlos, la proporción C:H estimada utilizando estas metodologías, ha sido cuestionada por algunos autores, principalmente en poblaciones bajo un manejo que implique la extracción de individuos, debido a que las estimaciones obtenidas por este método se realizan mediante recuentos aislados de animales y, por lo tanto, tienen un elevado error en la estimación (McCullough 1994, Bonenfant et al. 2005, Cameron et al. 2013, Kellner y Swihart 2014). Bonenfant et al. (2005) discuten las dificultades de contar crías al pie en una población de ciervos colorados (*Cervus elaphus*) y proponen una medida alternativa para estimar reclutamiento. Su propuesta consiste en complementar el recuento de animales con el marcado de un cierto número de hembras (no muy grande) y

realizar estimaciones de la probabilidad de nacimientos mediante el recuento de fetos de los animales que fueron cazados. Estos autores marcan la importancia de tener en cuenta los nacimientos mediante la estimación de la preñez, dato que suele ser ignorado en la mayoría de los estudios ecológicos. Cameron et al. (2013) cuestionaron la utilización de la proporción C:H para evaluar la producción neta de crías en caribú de Grant (*Rangifer tarandus granti*) debido a que las estimaciones obtenidas mediante conteos pueden incluir a las hembras de 2 años que no son sexualmente maduras y difícilmente distinguibles de las hembras de tres años o más, que sí lo son. Por lo tanto, realizar sólo el conteo de los animales implica una subestimación de la proporción C:H. Los autores recomiendan hacer el seguimiento de al menos 25 hembras marcadas con radiocollares.

Los resultados obtenidos mediante la relación C:H dan una idea anual del número de individuos que se suman a la población, es decir que si estimamos el reclutamiento en distintos años, vamos a tener una serie de “fotos” que nos indican la cantidad de individuos que se añaden a la población año a año en relación a la cantidad de hembras. Pero también es importante comprender el reclutamiento como un proceso, y para esto, se puede utilizar una función matemática, que de alguna forma permita transformar esas “fotos” en una “película”, de manera de poder predecir a lo largo del tiempo, el número de individuos que se van a sumar a la población de acuerdo a los individuos presentes. Dos de las ecuaciones más utilizadas para modelar el reclutamiento son la Ecuación de Beverton-Holt y la Ecuación de Ricker (Caswell 2001). Estas dos funciones fueron principalmente desarrolladas para manejos en pesquería, pero luego han sido aplicadas a poblaciones de otros modelos biológicos como mamíferos (ver por ejemplo Brook y Bradshaw 2006, Imperio et al. 2012, Shaw et al. 2012, Chambert et al. 2016, Nadeem et al. 2016). Ambas ecuaciones describen una disminución en el reclutamiento conforme aumenta el tamaño poblacional, es decir que proponen un reclutamiento densodependiente. La principal diferencia se basa en la importancia que le dan a la mortalidad por denso dependencia. La función de Beverton – Holt se basa en el supuesto de que la competencia entre los juveniles resulta en una tasa de mortalidad que es linealmente dependiente del número de individuos presentes en una cohorte en cualquier momento. Es decir, hay una abundancia máxima de juveniles determinada por la disponibilidad de alimentos o del espacio que va disminuyendo por el efecto de la competencia entre ellos (Quinn 2013). Además, para utilizar la ecuación de Beverton – Holt los predadores deben ajustarse inmediatamente a los cambios en la abundancia de

presas (Subbey et al. 2014). La función de Ricker, en cambio asume que la mortalidad de las crías y juveniles es proporcional al tamaño inicial de la cohorte (Ricker 1975, Subbey et al. 2014) y por lo tanto, la densodependencia del reclutamiento se debe a la influencia de los adultos (Quinn 2013).

Como se mencionó anteriormente, algunos autores marcaron la importancia de incluir la natalidad o la preñez en los modelos ecológicos en poblaciones bajo manejo para evaluarlas de una forma integral (Bonenfant et al. 2005, Cain et al. 2012, Pierce et al. 2012), aunque en la mayoría de los casos esto no ocurre por la complejidad de estimar este parámetro. Tanto Bonenfant et al. (2005) como Pierce et al. (2012), han estimado el efecto de la preñez en la dinámica poblacional mediante el recuento de fetos en animales muertos. Esta metodología es válida para el diagnóstico de la preñez en poblaciones bajo manejo de cacería, pero cuando se trabaja con animales que no se encuentran bajo presión cinegética, no es recomendable. En caso de estudiar poblaciones silvestres sin la posibilidad de acceder al cadáver, es necesario utilizar herramientas invasivas (como la captura para la extracción de sangre o las ecografías) o no invasivas (mediante la recolección de heces, como las utilizadas en esta tesis) que nos permiten evaluar la preñez y posibilitan su inclusión en modelos poblacionales (Bergman et al. 2019). En este sentido, la utilización de metabolitos fecales de hormonas reproductivas como los glucurónidos de pregnanediol (PdG) y estrógenos conjugados (EC) son una herramienta que puede aplicarse para monitorear el estado reproductivo, sin la necesidad de capturar a los individuos, evitando el estrés que puede tener consecuencias sobre la preñez y la supervivencia luego del manejo (Altmann y Alberts 2004, Burger 2006, Cain et al. 2012, Marozzi et al. 2020). Si bien, la bibliografía sobre la temática es amplia y la mayoría de los trabajos proponen que estos métodos pueden ser aplicados en poblaciones silvestres, en general esto no ocurre y la mayoría de las investigaciones que realizan diagnósticos de preñez mediante metabolitos fecales de hormonas esteroideas lo hacen en zoológicos (Schwarzenberger et al. 1991, 1995, Schoenecker et al. 2004, Mastromonaco et al. 2015, Nagl et al. 2015, Cao et al. 2016, Ahuja-Aguirre et al. 2017, Flacke et al. 2017) y es escasa la bibliografía que las refiera a poblaciones naturales. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, en este capítulo de la tesis se desarrolla una metodología de estimación del reclutamiento poblacional, utilizando los valores de los niveles de hormonas reproductivas de las hembras de guanaco, obtenidos mediante una metodología no invasiva, como indicadores de la proporción de hembras preñadas. Es la primera vez

que esta metodología es utilizada para la estimación del reclutamiento en una población de guanacos silvestres expuesta a un manejo no extractivo como la utilización de su fibra.

En el capítulo 1 se resumieron algunos aspectos de la historia de uso del guanaco por parte de los humanos y su situación actual. Si recordamos lo descrito allí, el nuevo plan de manejo de la especie, redactado en 2019 otorga permisos de cacería para producción de carne a las provincias que cuentan con poblaciones abundantes (SAyDS 2019 - Resol. 243/2019). Este nuevo plan de manejo, ha descartado algunos aspectos fundamentales de la biología y ecología de la especie, por ejemplo, asume que la dinámica de las poblaciones en toda la superficie de las provincias de la Argentina es semejante. En este contexto, generar nueva información sobre la ecología de las poblaciones de guanacos y herramientas que faciliten su monitoreo es importante para que la toma de decisiones sobre el manejo de la especie esté fundamentada en la información, teniendo en cuenta las particularidades de cada una de sus poblaciones. En este capítulo se pretende brindar herramientas innovadoras para el monitoreo de las poblaciones de guanacos que podrían ser aplicadas también en otras especies de ungulados silvestres.

4.2. Objetivos, hipótesis y predicciones del capítulo:

En este capítulo se propone la posibilidad de incluir la preñez en modelos poblacionales y se exploran algunos aspectos de la ecología poblacional de los guanacos presentes en la Reserva Provincial La Payunia. Para ello se plantean los siguientes **objetivos**:

- 1) Desarrollar una metodología para estimar la producción de crías y el reclutamiento utilizando la tasa de preñez obtenida mediante técnicas no invasivas
- 2) Explorar, mediante simulaciones de datos, la relación entre el reclutamiento estimado por la tasa de preñez y las densidades de guanacos.

Hipótesis 1: La proporción de hembras preñadas de una población es una herramienta que puede ser utilizada para realizar estimaciones de la producción de crías y del reclutamiento poblacional.

Predicción 1: Las estimaciones de reclutamiento poblacional obtenidas mediante la relación de la proporción de hembras preñadas con parámetros poblacionales como la supervivencia y las densidades totales de individuos, brindará información confiable que podrá ser aplicada en el monitoreo de poblaciones de guanacos y de otros ungulados silvestres.

Hipótesis 2: El reclutamiento en la población de guanacos de La Payunia es densodependiente y tiene una relación inversa con las densidades de guanacos.

Predicción 2: El reclutamiento de la población de guanacos bajo estudio obtenido con simulaciones de datos será explicado mediante una ecuación de Ricker.

4.3. Materiales y métodos

En este capítulo se evaluó el reclutamiento de la población de guanacos silvestres de La Payunia mediante dos metodologías que se resumen en la Fig. 4.1. Previo al desarrollo metodológico se llevó a cabo un relevamiento bibliográfico para obtener información de base que permita, luego, hacer las simulaciones (Sección 4.3.1). En primer lugar, se realizaron estimaciones de densidad de crías (TDC) y adultos (TDA) utilizando la metodología tradicional de *Distance Sampling* mediante transectas de ancho variable con la información obtenida de los relevamientos poblacionales de La Payunia. En segundo lugar, se trabajó sobre las estimaciones de densidad de crías y se desarrolló una metodología alternativa para su cálculo (ADC; Sección 4.3.2). Luego, con las densidades calculadas por cada una de las dos metodologías se realizaron estimaciones de reclutamiento, mediante la relación C:H (ver más abajo) y se compararon (Sección 4.3.3). Además, se realizó una simulación de datos de la metodología alternativa, se estimó el reclutamiento poblacional y se evaluó el ajuste a un modelo densodependiente (Sección 4.3.4; Mahoney y Schaefer 2002, Sinclair y Krebs 2002, Pierce et al. 2012, Marino et al. 2014).

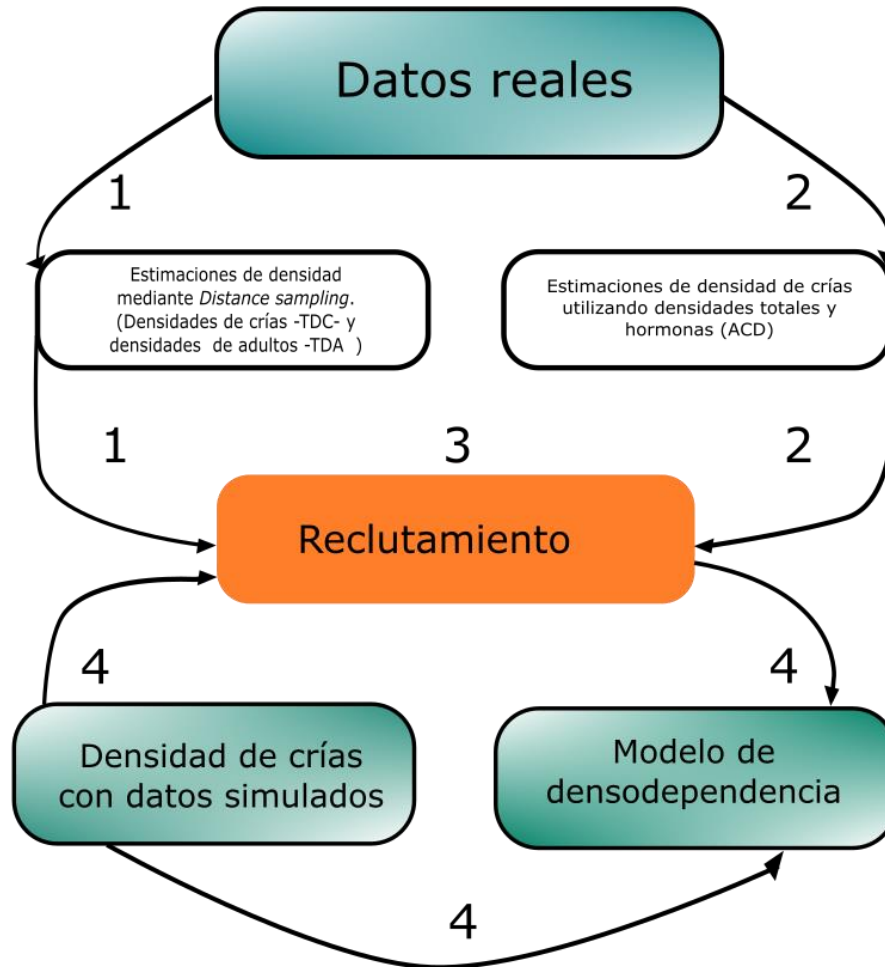


Fig. 4.1: Diagrama de los pasos seguidos durante esta investigación. 1) estimación de las densidades de crías y adultos mediante la metodología tradicional de *Distance Sampling* (TDA, TDC) y estimación del reclutamiento 2), estimación de las densidades de utilizando la información sobre la proporción de hembras preñadas en la población y las densidades totales (ACD), y estimación del reclutamiento a partir de estos datos 3) comparación de las estimaciones de TCD y ADC. 4) simulación de datos de ADC, reclutamiento calculado con los datos simulados y evaluación del ajuste de un modelo de dependiente de la densidad.

4.3.1 Relevamiento de datos bibliográficos sobre parámetros poblacionales de diferentes poblaciones de guanaco

En primer lugar, se realizó un relevamiento bibliográfico de los datos publicados sobre poblaciones de guanacos para tener información de base que brinde criterios para elaborar una simulación de datos sobre la población de La Payunia. La búsqueda se enfocó en los parámetros poblacionales de interés para este capítulo y la forma en que los mismos se midieron, que puede ser variable, y es importante tenerlo en cuenta en el momento en que se obtienen y comparan resultados. Por ejemplo, la supervivencia se puede estimar mediante datos de telemetría (Ruiz Blanco et al. 2014), usando modelos matriciales (Zubillaga et al. 2018) o mediante una tabla de vida vertical (Puig 1987). Se trabajó

principalmente con información de Argentina y Chile y también se tuvo en cuenta información relevada por Franklin (1975) en Perú.

Se revisó el trabajo de Puig (1987) que realizó su investigación sobre la población de guanacos de La Payunia. La autora evaluó diversos aspectos de la biología de la especie y entre ellos su ecología poblacional. Esta autora realizó una tabla de vida vertical, utilizando además de los recuentos de animales, información de los cráneos encontrados en el campo. Aquí se tuvieron en cuenta sólo los parámetros que resultan más informativos a los fines de este capítulo. Por ejemplo, parámetros como la distribución de edades obtenidos mediante erupción y desgaste dentario no se consideraron en esta síntesis, dado que para esta tesis se tuvieron en cuenta tres clases o estadios de vida: chulengos (crías menores a un año), añales (crías de aproximadamente un año que ya pasaron el mayor riesgo de depredación) y adultos (individuos de dos años o más). También sobre esta misma población se tuvieron en cuenta los datos publicados por Ruiz Blanco (2014) sobre supervivencia de las crías ya que son los más recientes disponibles para La Payunia.

Además, se revisó la información de las poblaciones de la provincia de Chubut en donde se realizaron estimaciones de reclutamiento teniendo en cuenta una capacidad de carga variable (Marino et al. 2014) y el efecto de la territorialidad sobre este parámetro (Marino et al. 2016) y los datos disponibles para la provincia de Tierra del Fuego (De Lamo et al. 1982). También se revisaron los trabajos realizados con la población de guanacos de Tierra del Fuego chilena. Se consideraron los trabajos clásicos realizados en la estancia Cameron por Raedeke (1979) que describió diversos aspectos de la ecología poblacional y la sociabilidad de la especie y los trabajos recientes realizados en ese mismo sitio por Zubillaga et al. (2014, 2018) en los que se evaluó el efecto de la densodependencia y del clima sobre esa población de guanacos, utilizando primero, densidades totales, ignorando la estructura de edades (Zubillaga et al. 2014) y luego, modelos matriciales (Zubillaga et al. 2018). También se tuvieron en cuenta las investigaciones realizadas por Fritz (1985) que evaluó la potencialidad de realizar cosechas de guanacos en Torres del Paine (Chile) y el trabajo realizado por Sarno et al. (1999), en dónde se midieron variaciones en la tasa de natalidad de la especie.

4.3.2 Estimaciones de densidades de crías y cálculo de reclutamiento poblacional mediante la metodología tradicional

Desde el año 2005 en La Payunia nuestro grupo de trabajo realiza relevamientos poblacionales para cumplir con diferentes objetivos de estudio y tomar decisiones de manejo (Schroeder 2013, Carmanchahi et al. 2015, Gregorio 2018, Panebianco 2019). De esos muestreos, los que se realizaron durante febrero de 2010 y septiembre de 2016 y 2017 registraron la edad de los individuos. Estos muestreos se realizaron mediante transectas de línea utilizando la metodología transectas de ancho variable mediante de *Distance Sampling* (Buckland et al. 1993, 2016), recorriendo los caminos y huellas internas de la reserva con una o dos personas paradas en la parte de atrás de una camioneta y registrando todos los individuos detectados. Para cada animal o grupo detectado (A), el observador debe medir la distancia perpendicular (x) del animal o del centro del grupo hacia la línea de marcha (Fig. 4.2). En muchos relevamientos esto no es posible y es más fácil estimar la distancia del observador al animal o grupo en el momento de la detección, denominada distancia radial (r). En estos casos además se debe tomar el ángulo formado entre la distancia radial y la línea de marcha y calcular la distancia perpendicular mediante la siguiente ecuación trigonométrica: $x = r \text{ sen}\theta$ (Fig. 4.2).

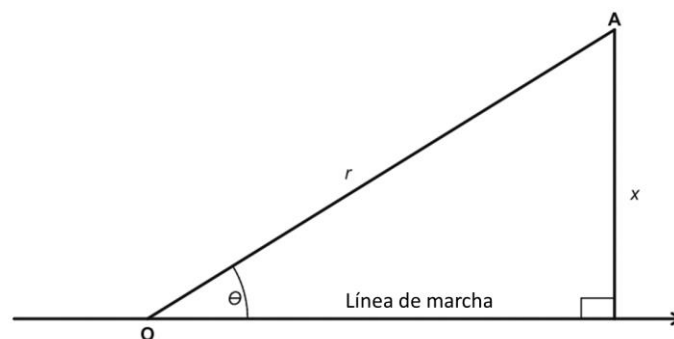


Fig. 4.2: Esquema que representa la forma en que se realizan los relevamientos mediante transectas de ancho variable utilizando *Distance sampling* (modificado de Buckland et al. 2016). O: observador que se desplaza sobre la línea de marcha y cuando detecta un animal o grupo registra de distancia perpendicular a la línea de marcha (x). Si esto es dificultoso se toman los datos de distancia radial (r) y el ángulo formado entre r y la línea de marcha (θ) para luego calcular la distancia perpendicular.

Los relevamientos de *Distance sampling* asumen que todos los animales sobre la línea de marcha son detectados es decir que, sobre la línea de marcha, la probabilidad de detección es 1 y disminuye conforme los individuos se encuentran más lejos. Este tipo de metodologías donde, a partir de una muestra, se realizan estimaciones de densidad, abundancia u ocupación de una población se denominan métodos de detección imperfecta

(Kellner y Swihart 2014) . Los mismos resultan de gran utilidad y son aplicados en diversos modelos biológicos, como grandes ungulados, aves, primates, entre otros (Buckland et al. 2010, Garcés-Restrepo y Saavedra-Rodríguez 2013, Schroeder 2013, Moore y Barlow 2014).

Para asegurar una buena estimación de los datos mediante esta metodología es fundamental obtener una gran cantidad de registros (más de 60). También es importante realizar una correcta elección de la función de detección $g(x)$ que es la probabilidad de detectar a un animal que se encuentra a una distancia x de la línea de marcha, en donde x es un valor mayor a cero y menor al ancho de faja definido (rectángulo o faja determinado por el valor máximo al que se detectan animales y la línea de marcha; Buckland et al. 2016). Para modelar la función de detección se utilizan las distancias x registradas durante el relevamiento poblacional. Para esta tesis doctoral se utilizó el paquete Distance para R (Miller 2019) y se evaluó el ajuste de las funciones de detección “half-normal” (semi-normal) y “hazard-rate” (tasa de riesgo). Los modelos de detección utilizados tienen cuatro supuestos básicos:

- 1) Los animales se distribuyen independientemente de las líneas de marcha
- 2) Los animales que se encuentran sobre la línea de marcha son detectados con certeza
- 3) Las mediciones de distancias son exactas
- 4) Los animales son detectados en su localización exacta

Sobre el supuesto 1, los autores afirman está relacionado con el diseño de muestreo, es decir que se cumple porque las transectas se definen de manera aleatoria (Buckland et al. 1993, 2016). Los relevamientos que se realizaron en La Payunia, rompen este supuesto porque siguen las huellas y caminos disponibles. Nuestro grupo de trabajo ha realizado los muestreos de esta forma porque las características topográficas del terreno, con ondulaciones, irregularidades y abundancia de rocas volcánicas (Martínez Carretero 2004), dificultan generar un muestreo completamente aleatorio. Por esta razón, se asume que las estimaciones de densidad realizadas pueden extrapolarse a una superficie de 4 km de ancho (Schroeder et al. 2014). Aun así, recientemente se ha explorado el efecto de los caminos sobre las estimaciones de densidad de esta población de guanacos y no parecen tener un mayor impacto, en parte debido a la baja presión de cacería de la misma

(Schroeder et al. 2018), de todas formas, para esta tesis se adoptó la postura más conservadora siguiendo a Schroeder et al. (2014).

Además, para evitar el sesgo de la distribución de las transectas, se recomiendan realizar al menos 12 transectas durante relevamiento poblacional (Buckland et al. 2016). En general, esta recomendación se ha logrado cumplir durante los relevamientos poblacionales realizados en La Payunia, aunque en el transcurso de los años desde que nuestro grupo de trabajo desarrolla actividades en la reserva, algunos caminos internos se han perdido por diversas razones (paso de agua, dejaron de ser recorridos con frecuencia, establecimiento de barreras por parte de los pobladores), y esto llevó a la reducción del número de transectas.

Otros factores como el comportamiento gregario, la topografía o la vegetación también pueden influir en la detección. Buckland et al. (2016) proponen algunas formas de salvar estos problemas: asumir que éstos no influyen en la inferencia o incluirlos en el modelo. En el primer caso, se trabaja con *Distance Sampling* convencional (CDS) y en el segundo, con *Distance Sampling* con múltiples covariables (MCDS; Buckland et al. 2016) donde las variables que influyen en la detección se incluyen en el modelo. Además, en lugares donde hay variaciones en el hábitat es importante estratificar el muestreo diferenciándolos. En el caso de que el número de transectas sea suficiente se puede utilizar una función de detección para cada estrato, en caso contrario (que suele ser el más frecuente según Buckland et al. 2016, y el que ocurrió con las transectas utilizadas para esta tesis) es posible utilizar una sola función de detección y elegir el tipo de hábitat como covariable para evaluar su influencia.

Otros supuestos menos relevantes de acuerdo a Buckland et al. (2016) son; que las detecciones son independientes y que, en poblaciones agrupadas, el tamaño de grupo se registra sin error. Los autores sugieren que los métodos estadísticos utilizados son muy robustos y, por lo tanto, el supuesto de falla en detecciones independientes es fácilmente salvable por la estadística utilizada. Además, sobre el supuesto del tamaño de grupo, Rextad (2020) en un estudio de caso propone que la mejor forma de resolver esto en el paquete Distance para R es incluyendo el tamaño de grupo en el modelo utilizado (explicado en <http://examples.distancesampling.org/Distance-groupsize/Remedy-size-bias-for-dolphin-surveys.html>).

Además, durante los relevamientos a campo se toman datos a la mayor distancia posible de acuerdo con las herramientas de medición disponibles, luego con el análisis exploratorio de los datos, muchas veces se detectan observaciones extremas que se recomienda eliminar para mejorar el ajuste de la función de detección. Buckland et al. (1993) sugieren eliminar al menos el 5% de los datos. Para ajustar la función de detección, existe la posibilidad de agrupar los datos en intervalos o usarlos de forma continua. La primera opción implica la pérdida de información para evaluar los supuestos y el ajuste de la función de detección, por lo tanto, Buckland et al. (2016) sugieren el uso de los datos de forma continua siempre que sea posible.

Para evaluar el ajuste de los modelos analizados se utilizó la prueba de bondad de ajuste de Cramér-von Mises (CvM) que nos informa si el modelo propuesto explica o no los datos (Buckland et al. 2016). Con el test CvM lo que hacemos es poner a prueba la hipótesis nula de que no hay relación entre los datos versus la hipótesis alternativa que dice que hay un modelo que explica los datos. Entonces, lo que buscamos es rechazar la hipótesis nula ($p\text{-valor} > 0,05$). Una vez que tenemos varios modelos que explican correctamente nuestros datos, que, además, tienen la misma distancia de truncado y, en caso de trabajarse con intervalos, tienen los mismos intervalos, entonces pueden compararse mediante criterios de información para seleccionar de todos esos modelos, uno, que es el que finalmente nos brinda la densidad de individuos (Burnham et al. 2011, Buckland et al. 2016). Para seleccionar el modelo, se utiliza el criterio de información de Akaike (AIC), que consiste en establecer un ranking de los modelos disponibles de acuerdo a la evidencia a favor de cada uno de ellos, el modelo seleccionado es el más informativo (Burnham et al. 2011). Los modelos analizados para las estimaciones de densidad fueron: 1) el modelo de CDS, sin covariables (~ 1); 2) el modelo con efecto del tamaño de grupo (\sim tamaño) y 3) el modelo con efecto del tamaño de grupo y de la región de estudio, es decir que se diferenció entre relevamientos realizados en el NE y NO de la reserva (\sim tamaño + Región).

Una vez calculadas las densidades, se realizó una estimación de reclutamiento, utilizando la relación C:H (Ec. 4.2; Gaillard et al. 2008). El número de hembras se estimó a partir del cálculo de densidades de adultos totales multiplicadas por la proporción de hembras. Para determinar la proporción de hembras, se utilizó información bibliográfica disponible para La Payunia (Puig 1987) y algunos análisis exploratorios realizadas para esta tesis doctoral que consistieron en medir la proporción de hembras calculadas mediante

Distance Sampling [hembras adultas/(machos adultos + hembras adultas)]. La proporción de hembras utilizada en este punto es la misma que se empleó para realizar las estimaciones de reclutamiento utilizando los datos de preñez descripta en el punto 4.3.3 y la simulación de datos descripta en el punto 4.3.4. Para calcular el error asociado a estas estimaciones se utilizó la ecuación de propagación de errores que consiste en calcular las derivadas parciales de cada uno de los parámetros que tienen un error asociado, multiplicar la derivada del parámetro por el error y finalmente sumarlas (Kirchner 1995). La ecuación 4.1 representa una forma general de la ecuación de propagación de errores que toma formas diferentes en cada caso.

$$\Delta p = \left| \frac{\partial f(x)}{\partial x} \right| \times \Delta x + \left| \frac{\partial f(y)}{\partial y} \right| \times \Delta y \quad (\text{Ec. 4.1})$$

El reclutamiento utilizando la metodología tradicional se calculó de la siguiente forma:

$$R_{TD} = \frac{D_y}{D_{ad} \times f} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Donde R_{TD} es el reclutamiento calculado utilizando densidades tradicionales, D_y es la densidad de crías estimada mediante TDC, D_{ad} es la densidad de adultos y f es la proporción de hembras de la población, obtenida de Puig (1987). Para el cálculo de la incerteza de la ecuación 4.2 la ecuación 4.1 toma la siguiente forma:

$$\Delta R_{TD} = \left| \frac{1}{D_{ad} \times f} \right| \times \Delta D_y + \left| \frac{-D_y}{D_{ad}^2 \times f} \right| \times \Delta D_{ad} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

Donde ΔD_y es la incertidumbre asociada a la estimación de crías y ΔD_{ad} es la incertidumbre asociada a la estimación de adultos.

4.3.3 Estimaciones de densidades crías y cálculo de reclutamiento utilizando la proporción de hembras preñadas

En este capítulo se propuso realizar estimaciones de las densidades de crías utilizando información de la proporción de hembras preñadas calculadas mediante datos hormonales y luego, con esas densidades realizar estimaciones de reclutamiento. Para cumplir con ese objetivo, además de las muestras tomadas durante este doctorado, se utilizaron muestras colectadas por otros miembros de nuestro grupo de trabajo (Ver capítulo 3). En parte, esto facilitó el conocimiento de la proporción de hembras preñadas, pero como las muestras hormonales no siempre se correspondían con relevamientos poblacionales, para este capítulo se decidió utilizar un promedio de la proporción de hembras preñadas para

realizar las estimaciones de densidad de crías de acuerdo con la ecuación que se muestra a continuación modificada de Whitmer et al. (2010):

$$A_t = m \times f \times s \times D_{t-1} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

Dónde A es la densidad de crías estimada en el tiempo t , m es el promedio de la proporción de hembras preñadas, f es la proporción de hembras presentes en la población ya sean preñadas o no preñadas, s es la supervivencia y D_{t-1} es la densidad de adultos del año anterior. Es decir, que para estimar el reclutamiento para 2016, por ejemplo, es necesario saber cuántas son las hembras preñadas en 2015 que van a parir a finales de ese año o a comienzos de 2016. Para saber esto, se relaciona la densidad total de individuos en la población en 2015 con la proporción de hembras de la población. Luego, del total de hembras se calcula una proporción de preñadas y esa información se relaciona con la supervivencia (Fig. 4.3). Una vez que se tiene el número de crías que se van a incorporar efectivamente a la población (en 2016), luego de pasar por el filtro de la supervivencia, este dato se relaciona con la proporción de hembras de la población en el año t , en el ejemplo mencionado aquí es 2016. Entonces, para realizar las estimaciones de reclutamiento utilizando la metodología alternativa, necesitamos un par de años consecutivos de relevamientos poblacionales (Tabla 4.1).



Fig. 4.3: Esquema que representa el razonamiento realizado para realizar las estimaciones de las densidades de crías utilizando los datos de proporción de hembras preñadas.

Tabla 4.1: Resumen de los años utilizados para estimar la producción de crías y el reclutamiento mediante densidades alternativas.

Relevamientos poblacionales	Producción de crías	Estimaciones de reclutamiento	Edad aproximada de los reclutas
Octubre 2008	Diciembre 2008 Enero 2009	Febrero de 2010	Un año
Septiembre 2015	Diciembre de 2015 Enero de 2016	Septiembre de 2016	Entre nueve y diez meses
Septiembre 2016	Diciembre de 2016 Enero de 2017	Septiembre de 2017	Entre nueve y diez meses

El momento ideal para realizar las estimaciones de reclutamiento es el verano (diciembre - enero) cuando los individuos ya tienen un año de vida y se los llama añales. Como no fue posible realizar todos los relevamientos en esta época del año por razones logísticas, aquí se consideraron algunos muestreos de primavera (Tabla 4.1) cuando los individuos tienen entre 9 y 10 meses y pasaron el filtro de mortalidad de los primeros meses de vida. Por esta razón, en este capítulo cuando se habla de crías se hace referencia a los individuos que ya pasaron ese filtro de depredación y tienen más de 8 meses, pero todavía no pueden llamarse añales porque son menores a un año de edad. Sólo se nombran añales en la tabla 4.4 que resume información bibliográfica.

Tabla 4.2: Resumen de las campañas utilizadas en este capítulo y el tipo de estimación realizada con ese relevamiento poblacional.

Relevamiento poblacional	Datos de adultos y crías	Densidades totales	Tipo de estimación
Octubre 2008		X	ADC
Febrero 2010	X	X	TDC TDA
Septiembre 2015		X	ADC
Septiembre 2016	X	X	ADC TDA
Septiembre 2017	X	X	TDC TDA

Para el parámetro de supervivencia se utilizaron las estimaciones realizadas por Ruiz Blanco et al. (2014), obtenidas mediante colocación de radiotransmisores VHF a neonatos en la misma población. Para la proporción de hembras se tuvieron en cuenta los datos de Puig (1987) que trabajó con la misma población de guanacos. En sus estimaciones, se observó una proporción de hembras variable de 0,53; 0,50 y 0,44 de acuerdo a la unidad social que corresponda (Tabla 4.4). El análisis exploratorio de la proporción de sexos de los datos empleados para esta tesis sugiere un sesgo leve hacia las hembras y, por lo tanto, se optó por considerar que la proporción de hembras es 0,53. Este dato corresponde a la proporción de hembras estimada por Puig (1987) para los grupos familiares. En este punto, es necesario tener en cuenta que la población de guanacos de La Payunia presenta hábitos de migración parcial, y los individuos con mayor movilidad son las hembras (Bolgeri 2016); por lo tanto, los parámetros poblacionales estimados aquí, podrían estar influenciados por estos desplazamientos. Aun así, dado que en esta tesis no se tomaron datos de los movimientos de los animales, este aspecto será considerado solamente en la discusión de los resultados.

Para calcular el error asociado a las estimaciones de densidades de crías, sólo se trabajó con los errores de los parámetros estimados para esta tesis y se utilizó la siguiente versión de la ecuación 4.1:

$$\Delta Y = |f \times s \times D_{t-1}| \times \Delta m_1 + |m \times f \times s| \times \Delta D_{t-1} \quad (\text{Ec. 4.5})$$

En dónde ΔY es el error asociado a la estimación de crías, ΔD_{t-1} es el error de las estimaciones de densidad total calculado mediante *Distance Sampling* y Δm_1 es el error asociado a la probabilidad de preñez. Para el cálculo de Δm_1 se utilizó la información de falsos positivos del modelo predictivo descrito en el capítulo 2 y el teorema de Bayes (Wilcox 1977, Stanton 2017). En la tabla 2.5 (capítulo 2) se mostró el número de hembras que se encuentran preñadas pero que el modelo predijo como no preñadas y viceversa. Si llevamos estos números a probabilidades (Tabla 4.3), esto se puede evaluar en término de “aciertos o fallas”. Si el modelo “acierta” pueden ocurrir dos cosas: que el modelo prediga a las hembras como preñadas dado que realmente lo estén, $P(+|p)$, o que el modelo las prediga como no preñadas y éste sea realmente su estado $P(-|np)$. Si el modelo “falla en el diagnóstico”, esta falla puede darse también de dos maneras: que el modelo las prediga como no preñadas, pero en realidad están preñadas $P(-|p)$ y que el modelo las prediga como preñadas y que realmente no lo estén $P(+|np)$.

Tabla 4.3: Tabla de probabilidades de preñez de acuerdo al modelo predictivo del capítulo 2. Abreviaturas p: hembra preñada, np: hembra no preñada, “+” predicción positiva del modelo, “-” predicción negativa del modelo.

Diagnóstico esquilas	durante	Predicciones del modelo	
		Preñadas	No preñadas
Preñadas		0,44 $P(+ p)$	0,06 $P(- p)$
No preñadas		0,03 $P(+ np)$	0,46 $P(- np)$

Ahora, cuando se trabaja con muestras colectadas a campo, no se sabe si las hembras están preñadas o no y sólo se dispone de la información brindada por el modelo. Entonces, lo que realmente se quiere saber es la probabilidad de que la hembra se encuentre realmente preñada dado que el modelo da un resultado positivo $P(p|+)$ y viceversa $P(np|-)$, porque el modelo tiene un error asociado que es el que se describe en el párrafo anterior y se desconoce el verdadero estado de preñez de las hembras. Por lo tanto, se puede utilizar el teorema de Bayes para calcular esa probabilidad:

$$\Delta m_1 = P(np|+) = \frac{P(+|np) \times P(np)}{P(+)} \quad (\text{Ec. 4.6})$$

$$\Delta m_2 = P(p|-) = \frac{P(-|p) \times P(p)}{P(-)} \quad (\text{Ec. 4.7})$$

Para este capítulo, se trabajó con la proporción de hembras preñadas, por lo tanto, sólo se utiliza la ecuación 4.6 que indica la proporción de las hembras que no se encuentran preñadas pero que el modelo predijo como preñadas, es decir los falsos positivos. Ese error del modelo predictivo del capítulo 2 es parte del error estimado para los cálculos de densidad mediante el método alternativo propuesto en este capítulo. Finalmente, se realizó un cálculo de reclutamiento utilizando la relación C:H mediante la estimación de crías obtenida por este método alternativo y la proporción de hembras calculada a partir de la densidad total de individuos, es decir:

$$R_{AD} = \frac{Y_t}{D_t \times f} \quad (\text{Ec. 4.8})$$

Dónde R_{AD} es el reclutamiento mediante densidades alternativas, D_t es la densidad total de guanacos, f es la proporción de hembras y Y_t es la densidad de crías de acuerdo con 4.3. El cálculo del error de las estimaciones de reclutamiento, se realizó utilizando la ecuación general 4.1 que en este caso toma la siguiente forma:

$$\Delta R_{AD} = \left| \left(\frac{1}{D_t \times f} \right) \right| \times \Delta Y + \left| \frac{-Y}{D_t^2 \times f} \right| \times \Delta D_t \quad (\text{Ec. 4.9})$$

Dónde ΔY es el error de las estimaciones de densidad de crías por ACD y ΔD_t es el error asociado a las estimaciones de densidad total en el tiempo t (Ec. 4.5).

4.3.4 Simulación de densidades de crías, cálculo de reclutamiento y ajuste de función de Ricker.

Debido a que sólo se contaba con datos de densidades poblacionales correspondientes a tres años, para evaluar la posibilidad de un reclutamiento densodependiente en las estimaciones realizadas mediante la metodología alternativa propuesta en 4.3.3, se realizó una simulación de la tasa de reclutamiento poblacional mediante la generación de datos aleatorios de densidades poblacionales totales de guanaco teniendo en cuenta las densidades conocidas para la población bajo estudio (Ver capítulo 5; y Schroeder et al. 2014). Se utilizó el generador de números aleatorios de R (<https://cran.r-project.org/>) con una distribución logNormal que contempla valores positivos continuos con parámetros μ y σ tal que:

$$D_{sim} \sim \text{LogN}(\mu_{gua}, \sigma_{gua}) \quad (\text{Ec. 4.10})$$

Siendo D_{sim} la densidad de guanacos, μ_{gua} el logaritmo natural de la media de las densidades totales de guanacos ($15 \text{ Gua/km}^2 \Rightarrow \mu_{gua} 2,7$) y σ_{gua} el logaritmo natural de la varianza ($2,25 \Rightarrow \sigma = 0,8$). Densidades totales se refiere a considerar en su conjunto todas las clases etarias para obtener un valor de densidad total de guanacos. Los parámetros se definieron tal que las densidades generadas de manera aleatoria se concentren alrededor de los valores de densidad semejantes a los conocidos para la población de guanacos de La Payunia, no obstante, algunos de los resultados obtenidos fueron mucho mayores o menores debido a que la distribución logNormal es una distribución infinita sobre los reales positivos (Crawley 2007). También se generaron datos simulados de densidades de crías incorporando los valores de densidad simuladas con la ecuación 4.10 a la ecuación 4.4. Para ello se asumió que las densidades de crías tienen una distribución logNormal tal que:

$$D_a \sim \text{LogN}(A, V) \quad (\text{Ec. 4.11})$$

En este caso A es el logaritmo de las estimaciones de densidades de crías obtenidas mediante densidades alternativas. V es el logaritmo de la varianza ($1.11 \text{ crías/km}^2 \Rightarrow V=0,1$). Una vez obtenidos los datos, bajo el supuesto de que las poblaciones de ungulados suelen presentar reclutamiento densodependiente se evaluó su ajuste a una función de Ricker para reclutamiento (Ricker 1975), utilizando estadística Bayesiana con el paquete jagsUI para R (Kellner 2015). Para esto se asumió que el reclutamiento (R) tiene una distribución logNormal tal que

$$R \sim \text{LogN}(\mu_{rec}, \sigma_{rec}) \quad (\text{Ec. 4.12})$$

Donde μ_{rec} es la media de la distribución de reclutamiento estimada mediante la ecuación 4.13 y σ_{rec} es el Ln de la varianza:

$$\mu_{rec} = \alpha * D * [\exp(-\beta * D_{sim})] \quad (\text{Ec. 4.13})$$

α y β son los parámetros de la función de Ricker (1975). Para evaluar el ajuste del modelo se observaron el número efectivo de cadenas Markovianas (n_{eff}) y el estadístico de convergencia de Gelman-Rubin (R_{hat} ; Kellner 2015). Además, se observó que los intervalos de credibilidad estimados no contengan el cero. Para la estimación de todos los parámetros del modelo se utilizaron previas no informativas.

4.4 Resultados

4.4.1 Relevamiento bibliográfico

Los datos relevados en la bibliografía indican que hay variabilidad de los parámetros relevados entre poblaciones (Tabla 4.4). Además, las poblaciones de guanacos parecen responder de forma diferente en distintos ambientes, dificultando el abordaje de conclusiones generales y, por lo tanto, sería necesario realizar más relevamientos y unificar criterios en las estimaciones.

Tabla 4.4: Síntesis de parámetros poblacionales disponibles en la bibliografía en diversas poblaciones de guanaco de Argentina, Chile y Perú que son de interés para esta tesis. Nota: chulengo hace referencia a las crías menores a un año que todavía no pasaron el filtro de la depredación; añales hace referencia a las crías de aproximadamente un año que ya sufrieron el efecto de la depredación. En los casos en que los datos reportados originalmente eran porcentajes, se transformaron en proporciones para facilitar su comparación.

Parámetro	Forma de estimación	Estimación	Sitio de Muestreo	País (Provincia)	Referencia bibliográfica
Tasa de natalidad	Hembras nacidas por adulto	0,24	Estancia Cameron	Chile (Tierra del fuego)	Zubillaga et al. 2018
	Número de nacimientos por hembras adultas	0,73	Torres del Paine	Chile (Tierra del fuego)	Fritz 1985
	Recuentos corregidos por mortalidad	0,38-0,60	Estancia Cameron	Chile (Tierra del fuego)	Raedeke 1979
	Recuentos corregidos por supervivencia	0,75	Torres del Paine	Chile (Tierra del fuego)	Sarno et al. 1999
	Recuento de chulengos/recuentos de madres	0,74	Torres del Paine	Chile (Tierra del fuego)	Fritz 1985
	Chulengos nacidos	0,35	SO de Chubut	Argentina (Chubut)	De Lamo et al. 1982
	Proporción de pariciones	0,69	SO de Chubut	Argentina (Chubut)	De Lamo et al. 1982
	Proporción chulengos por hembras	0,36-0,56	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1978
Reclutamiento	Cría (añales): hembra	0,44	Cabo dos Bahías	Argentina (Chubut)	Marino et al. 2014
	Cría (añales): hembra	0,52	San Pablo	Argentina (Chubut)	Marino et al. 2014

	Juveniles: hembra	0,34	Calipuy	Perú (Santiago de Chuco)	Franklin 1975
	Recuento	0,33-0,37	SO de Chubut	Argentina (Chubut)	De Lamo et al. 1982
Tasa de Mortalidad	Datos de censos	0,21-0,44	Estancia Cameron	Chile (Tierra del fuego)	Raedeke 1979
	Mortalidad al año	0,43	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1987
	Mortalidad al segundo año	0,19	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1987
	Mortalidad al tercer año de vida	0,09	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1987
	Mortalidad entre cuarto y octavo año de vida	0,08-0,04	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1987
Tasa de Supervivencia	Estimación utilizando modelos matriciales	0,84	Estancia Cameron	Chile (Tierra del fuego)	Zubillaga et al. 2018
	Telemetría	0,61	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Ruiz Blanco et al. 2016
	Recuento de individuos (1979 - 1980)	0,33	SO de Chubut	Argentina (Chubut)	De Lamo et al. 1982
	Recuento de individuos (1980 - 1981)	0,07	SO de Chubut	Argentina (Chubut)	De Lamo et al. 1982

	Tasa media de supervivencia entre 1,5 años y 13,5	0,88	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1987
Tasa de preñez	Examinación uterina temprana	0,65	Estancia Cameron	Chile (Tierra del fuego)	Raedeke 1979
	Recuento de hembras preñadas y hembras totales de acuerdo a evaluación visual	0,57	Calipuy	Perú (Santiago de Chuco)	Franklin 1975
	Utilización de datos de Raedeke (1979)	0,65	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig (1987)
Proporción de hembras	hembras adultas/total de adultos	0,61	Torres del Paine	Chile (Tierra del Fuego)	Fritz 1985
	Chulengos capturados	0,53	SO de Chubut	Argentina (Chubut)	De Lamo et al. 1982
	Recuentos (tropillas familiares)	0,53	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1987
	Recuento (agrupaciones temporales)	0,50	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1987
	Recuento (tropillas de adultos de gran tamaño)	0,44	La Payunia	Argentina (Mendoza)	Puig 1987

4.4.2 Estimaciones de densidad

Las estimaciones de densidad calculadas mediante *Distance Sampling* se representan en la tabla 4.5. Se calcularon densidades de crías, de adultos y densidades totales (considerando en su conjunto todas las clases etarias para obtener un valor de densidad total de guanacos). Las densidades de crías y adultos se utilizaron para realizar estimaciones de reclutamiento tradicional y las densidades totales se utilizaron para realizar las estimaciones de las densidades alternativas de crías y su respectivo reclutamiento. En la tabla 4.4 se indica el modelo seleccionado en cada caso, la estimación de abundancia de densidad de individuos con sus errores estándar y coeficiente de variación (CV). Además, se muestran los histogramas que representan el ajuste de cada modelo (Fig. 4.4, 4.5 y 4.6) y el porcentaje de grupos mixtos en cada año muestreado (Fig. 4.7).

Tabla 4.5: Densidades estimadas de crías y adultos estimadas en la población de guanacos de La Payunia considerando la región NO y NE de la reserva. Abreviaturas: EE: error estándar, CV (Coeficiente de Variación), CmV p-valor (p- valor del coeficiente de Cramér-von Mises). La densidad está expresada en guanacos/km². Además del tamaño medio de grupo y su error estándar, se incluye el tamaño máximo y mínimo de grupo registrado. En el caso de los relevamientos de adultos y crías, los tamaños corresponden a el número máximo y mínimo de individuos identificados dentro de grupos en donde algunos individuos pueden quedar como indeterminados.

Relevamiento	Función de detección	Modelo seleccionado	Densidad (EE)	Esfuerzo de muestreo	Número de individuos relevados (n)	Tamaño máximo y mínimo de animales contados en los registros de cada relevamiento.	Tamaño medio de grupo (EE)	CV	CvM p-valor
Crías									
feb-2010	Hazard-rate	~1	1,24 (0,34)	177,78	169	(0 - 11)	2,03 (0,20)	0,27	0,44
sep-2016	Hazard-rate	~tamaño + Región	5,38 (2,28)	115,67	297	(0-18)	3,52 (0,97)	0,42	0,71
sep-2017	Hazard-rate	~1	4,62 (1,52)	106,19	180	(0-14)	2,59 (0,44)	0,33	0,31
Adultos									
feb-10	Hazard-rate	~1	5,23 (1,09)	177,71	490	(0-65)	2,39 (0,30)	0,21	0,53
sep-16	Half normal	~1	4,68 (3,42)	116	103	(0-7)	3,76 (0,71)	0,74	0,64
sep-17	Half normal	~1	4,16 (1,19)	105,79	123	(0-20)	2,33 (0,40)	0,29	0,28
Totales									

Oct-08	Hazard-rate	~tamaño	22,93 (4,50)	141,69	3882	(1-316)	8,25 (1,08)	0,20	0,52
Feb-10	Hazard-rate	~tamaño + Región	17,12 (4,14)	177,78	3935	(1-146)	4,72 (0,65)	0,24	0,54
Sep-15	Hazard-rate	~1	26,41 (5,62)	77,03	1452	(0-133)	7,48 (1,30)	0,21	0,54
sep-16	Hazard-rate	~tamaño + Región	26,05 (4,86)	116,46	2851	(0-113)	5,47 (0,67)	0,19	0,45
sep-17	Hazard-rate	~tamaño	34,77 (7,02)	106,17	1755	(1-132)	5,55 (1,36)	0,20	0,30

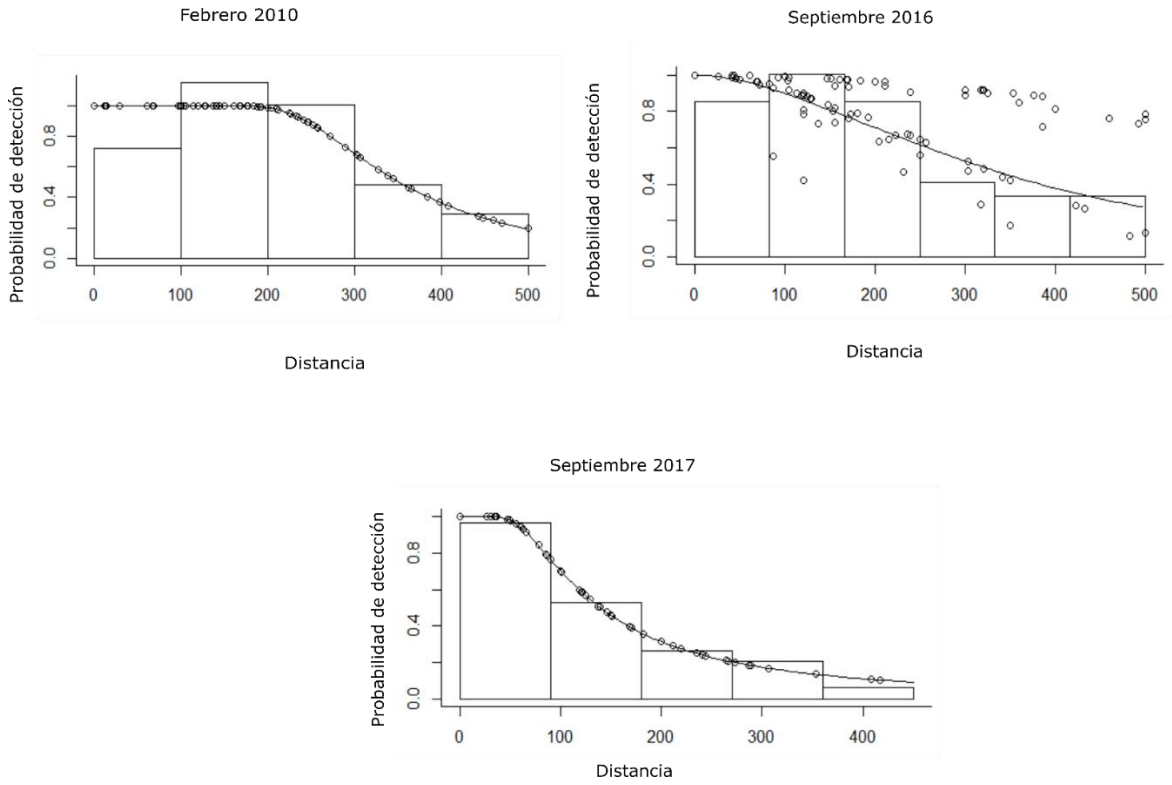


Fig. 4.4: Histogramas de los modelos seleccionados para crías de guanaco en La Payunia.

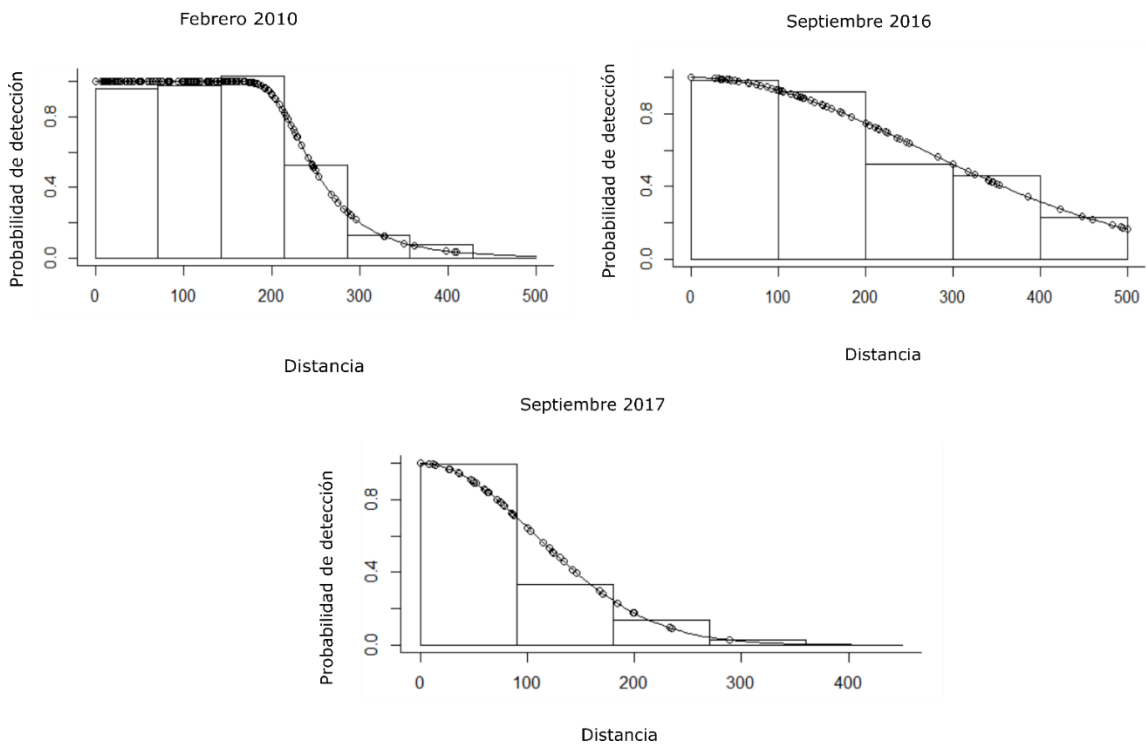


Fig. 4.5: Histogramas de los modelos seleccionados para adultos de guanaco en La Payunia.

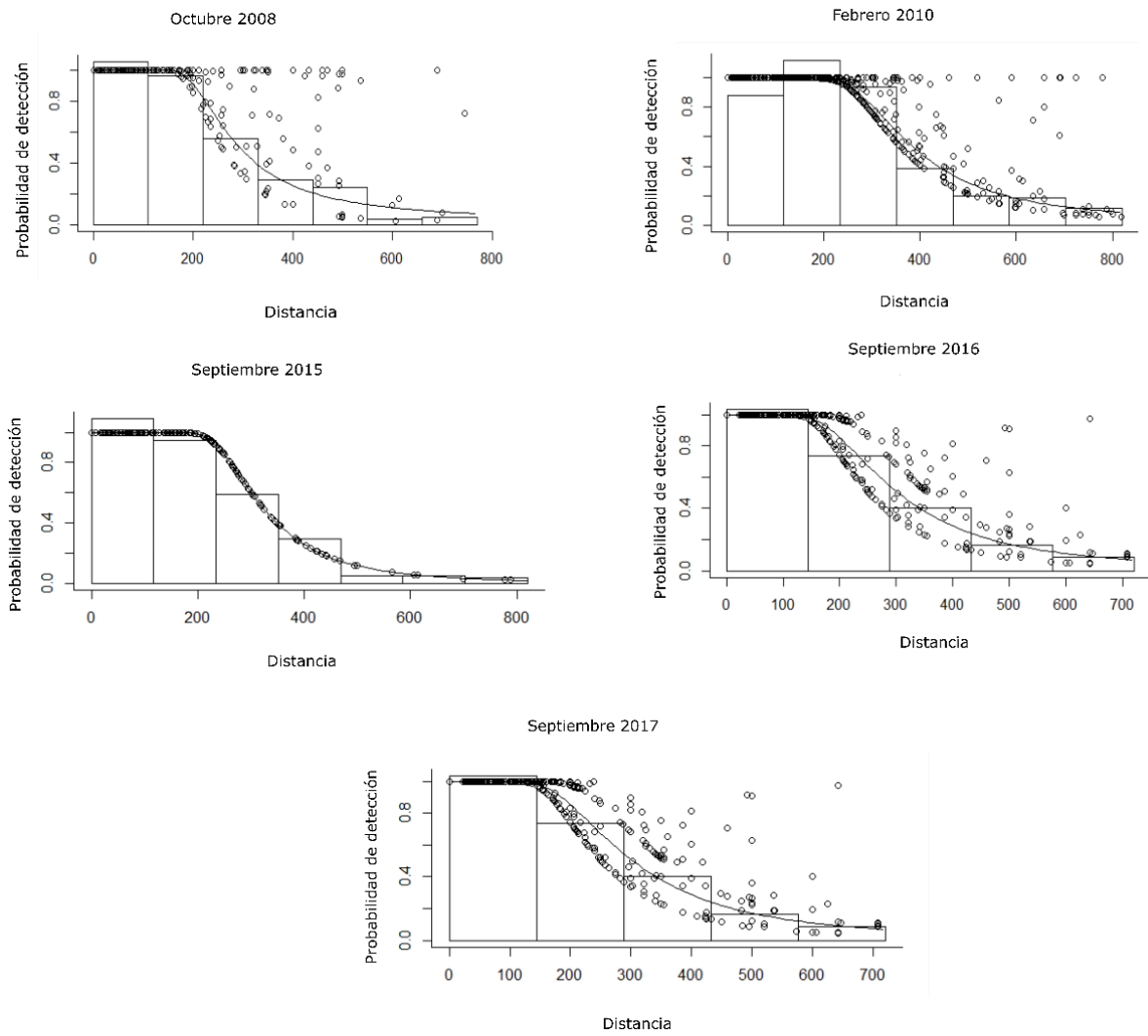


Fig. 4.6: Histogramas de los modelos seleccionados para densidades totales de guanaco en La Payunia.

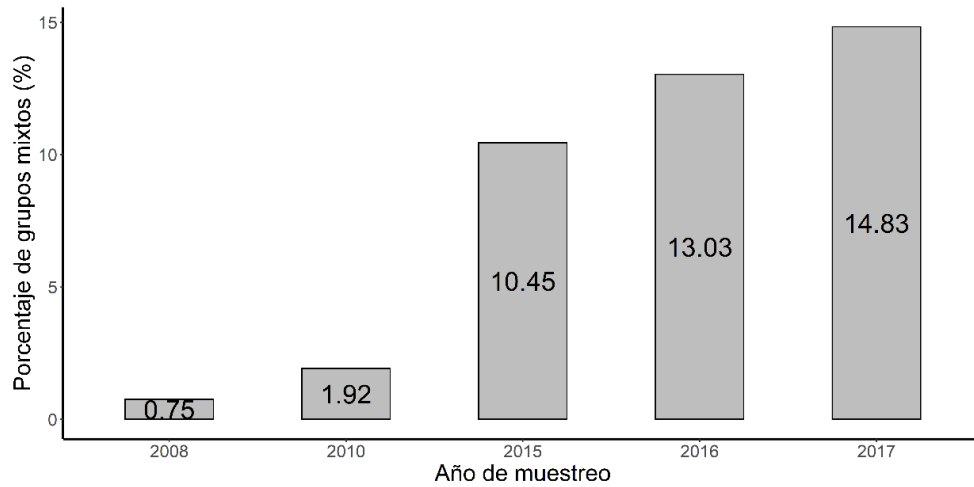


Fig. 4.7: Porcentaje de grupos mixtos en cada año muestreado

4.4.3 Estimaciones de reclutamiento mediante densidades alternativas y comparación con el reclutamiento utilizando densidades tradicionales

Las estimaciones de densidades de crías utilizando datos de preñez, presentaron errores semejantes a los de las estimaciones de densidad tradicional. Las estimaciones obtenidas por recuento de animales por *Distance Sampling* (TCD) fueron mayores a las realizadas por la metodología alternativa (ACD) en 2016 y 2017. Las estimaciones realizadas para 2010 fueron menores por la metodología tradicional (TCD) y también presentaron un error menor. (Tabla 4.6; Fig. 4.8).

Tabla 4.6: resumen de las estimaciones de densidad de crías por TDC y ADC y reclutamiento. La densidad está expresada en Guanacos/Km²

Año	Densidad		Reclutamiento	
	Metodología tradicional	Metodología alternativa	Metodología tradicional	Metodología alternativa
	(Error Estándar)	(Error Estándar)	(Error Estándar)	(Error Estándar)
2010	1,24(0.34)	2,85(0.93)	0,45 (0,13)	0,31(0, 18)
2016	4,73(1.81)	3,13 (1,06)	1,91(1,60)	0,23(0,17)
2017	4,62(1.52)	3,23(1,09)	2,10 (0,79)	0,18 (0,16)

Es notorio el elevado error en las estimaciones de densidades realizadas por la metodología tradicional, tanto para crías como para adultos en 2016 y 2017 (Tabla 4.5). De todas las estimaciones, la que mayor variabilidad presentó es la estimación de adultos para 2016. Por otra parte, si observamos los coeficientes de variación de las densidades totales y los comparamos con los coeficientes de variación de las estimaciones de adultos y crías, los primeros fueron en general menores que los coeficientes de variación de las estimaciones de un estadio particular (Tabla 4.5). Además, en los años en los que se observa mayor variabilidad en las estimaciones, se observa una mayor frecuencia de grupos mixtos en relación al total de los registros (Fig. 4.7).

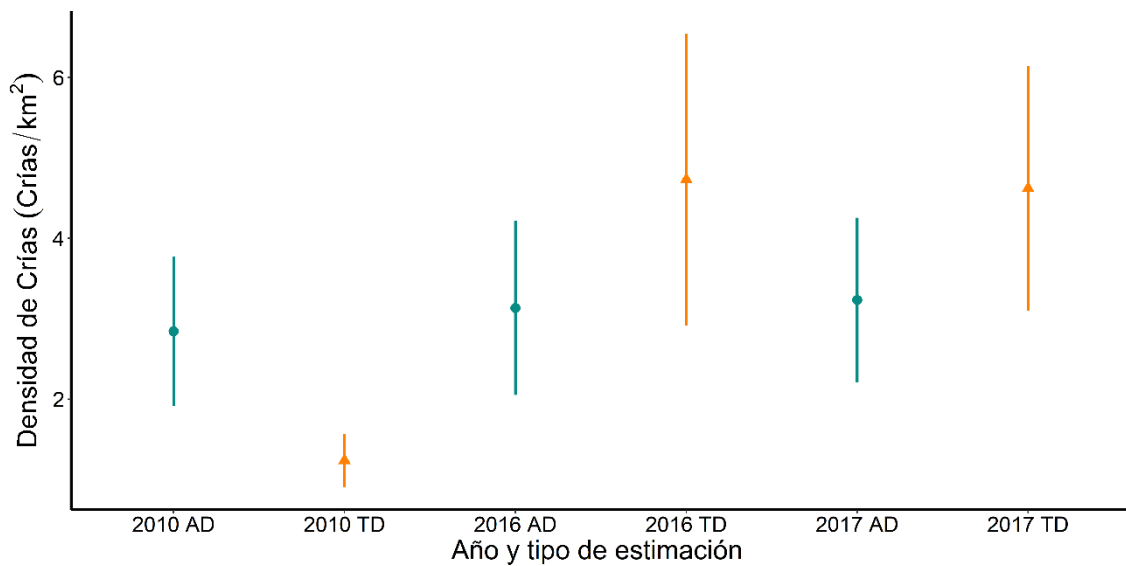


Fig. 4.8: Comparación de densidades de crías realizadas utilizando sólo relevamientos poblacionales (Densidad tradicional: TD) y utilizando densidades totales y la proporción de hembras preñadas (Densidad alternativa: AD).

Con respecto a las estimaciones de reclutamiento realizadas por ambas metodologías, se observó un patrón semejante a lo observado con las densidades para los años 2016 y 2017, aunque es notorio que para 2010, el reclutamiento por la metodología tradicional es mayor al predicho por la metodología alternativa, aunque las densidades son menores (Fig. 4.9). Este último caso indica que, aunque la proporción de crías es menor a la esperada de acuerdo con la natalidad, la proporción C:H es mayor. Asimismo, al propagar el error de las estimaciones, vemos que el error calculado para ambas es semejante (Tabla 4.6).

Además, es importante mencionar que, si bien las estimaciones de reclutamiento mediante densidades alternativas son más bajas que las estimaciones obtenidas mediante densidades tradicionales, el patrón que describen las mismas es semejante. Por ejemplo, en 2016 el reclutamiento es mayor por ambas metodologías si lo comparamos con las estimaciones de 2017. Por otra parte, los resultados obtenidos para el reclutamiento en 2016 y 2017 por metodología tradicional son notoriamente elevados, posiblemente asociado a los problemas de identificación de edades en ambientes de topografía irregular.

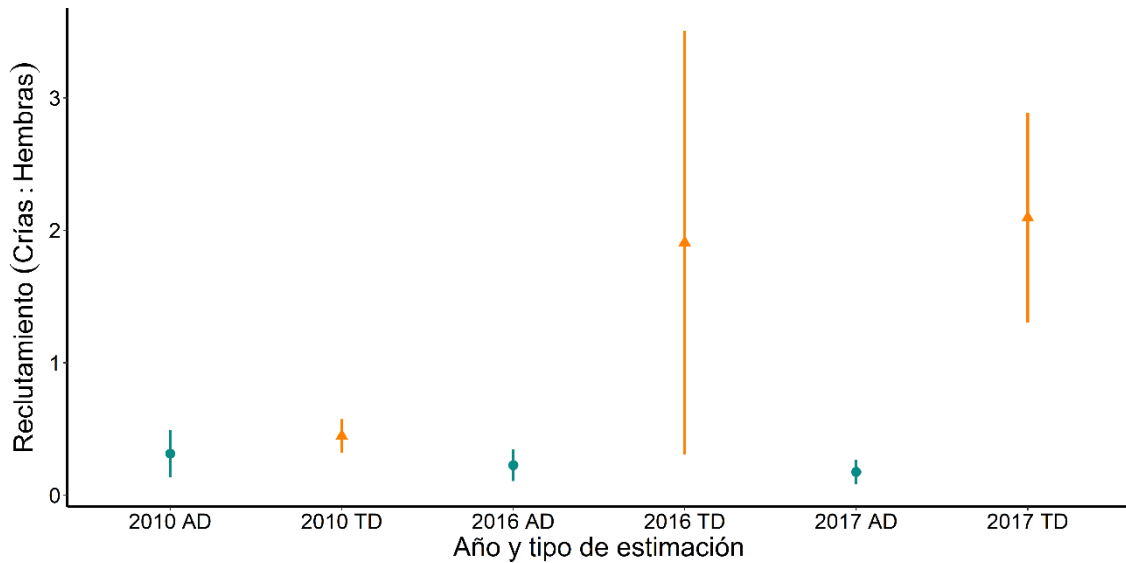


Fig. 4.9: Comparación de las estimaciones de reclutamiento realizadas mediante datos de densidades obtenidos de la forma tradicional (TD) y mediante densidades estimadas de forma alternativa (AD) utilizando los datos de proporción de hembras preñadas.

4.4.4 Modelo de simulación de densidades de crías y cálculo de reclutamiento

Las densidades de crías simuladas presentaron una relación negativa con respecto a las densidades totales de guanacos de la población de La Payunia. El cálculo de reclutamiento muestra relación inversa con las densidades totales de los animales (Fig. 4.10) y la función de Ricker se ajustó correctamente a los datos simulados para esa población (Tabla 4.7).

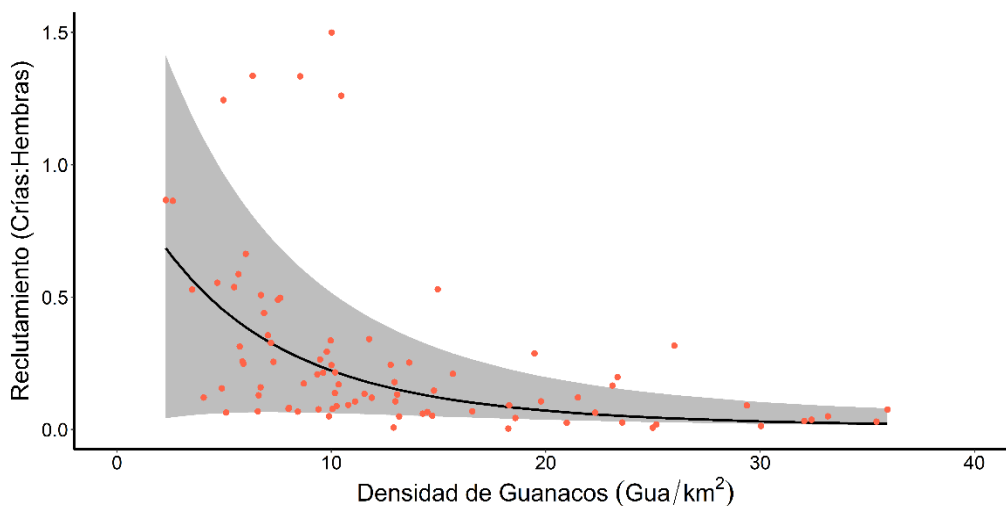


Fig. 4. 10: Ajuste de la función de Ricker de acuerdo con los datos simulados. Los puntos representan los datos. La curva negra representa el modelo ajustado y en gris se representan los intervalos de credibilidad del modelo ajustado.

Tabla 4.7: Parámetros estimados para el modelo de Ricker.

	Media	SD	Intervalos de credibilidad			Rhat	n _{eff}
			2.5%	50%	97.5%		
α	-0,171	0,014	-0,198	-0,170	-0,145	1,00	18163
β	0,013	0,002	0.009	0,013	0,017	1,00	14149
Log σ	1,135	0,154	0.853	1.128	1.455	1,00	61004

4.5. *Discusión*

En este capítulo se realizó un relevamiento de la información demográfica disponible sobre el guanaco y se observó una gran variabilidad al comparar el mismo parámetro en diferentes poblaciones. La variabilidad en las metodologías utilizadas para realizar las estimaciones puede deberse en parte a las diferencias en momento en que los datos fueron tomados. En el caso de los trabajos realizados en los años ‘70s y ‘80s, no contaban con las herramientas tecnológicas que se utilizan actualmente. De todas maneras, estas investigaciones tienen un trabajo de campo muy exhaustivo y esto hace que la información aportada por las mismas sea muy valiosa. Si bien, en los últimos años se han realizado nuevas evaluaciones poblacionales (Marino et al. 2014, 2016, Zubillaga et al. 2014, 2018, Travaini et al. 2015, Pedrana et al. 2019), es necesario continuar efectuando investigaciones que permitan establecer criterios sobre la mejor forma de evaluar la dinámica de estas poblaciones y tener una mayor comprensión sobre las mismas. La información disponible indicó una gran variabilidad entre poblaciones y, por lo tanto, no se puede asumir que los datos que se originan en una población pueden extrapolarse a otra para la elaboración de modelos poblacionales o planes de manejo sin una revisión de los datos y una adecuada descripción de las razones por las cuales se seleccionaron esos parámetros.

Para esta tesis, se realizaron estimaciones de densidades de crías, adultos y densidades totales de guanacos utilizando estimaciones de densidades de animales por la metodología de *Distance sampling* mediante transectas de ancho variable. Los resultados de estas estimaciones indican que los recuentos considerando los estadios de vida presentan, en general, mayor variabilidad que las estimaciones de densidades totales (Tabla 4.5). Además, los histogramas de los adultos y las crías (Fig. 4.4 y 4.5) sugieren que, a distancias mayores a 200 metros, se identifican más crías que adultos. Por otra parte, es notorio como las estimaciones de 2016, tanto para las crías como para los adultos,

presentaron una gran dispersión de los datos, ya que los errores estándar y coeficiente de variación fueron muy elevados. Es importante tener en cuenta estos factores al analizar los resultados obtenidos, dado que la elevada variabilidad podría sesgar las estimaciones de parámetros demográficos. Además, en cinco de los seis muestreos, el modelo seleccionado fue de *Distance Sampling* convencional en lugar de *Distance Sampling* con múltiples covariables. Para una especie con comportamiento gregario y con diferentes unidades sociales (i.e: grupos familiares, grupos mixtos, grupos de machos solteros, grupos de hembras con crías, machos solitarios) esperaríamos que se obtenga un mejor ajuste de un modelo que tenga en cuenta, al menos la variable “tamaño de grupo” (~tamaño), dado que puede influir en la detectabilidad (Buckland et al. 2016). Las dificultades encontradas en las estimaciones podrían deberse a las características topográficas y de vegetación en conjunto con la elevada presencia de grupos mixtos (Fig.4.7). Si varios individuos se encuentran separados por unos pocos metros la clasificación por clase etaria se dificulta, principalmente cuando los individuos se localizan en regiones de relieve irregular. Además, en la primavera, los animales de esta población forman grandes grupos mixtos (Franklin 1983; Puig 1975) que tienen una respuesta más rápida a la presencia del vehículo. Estos grupos comienzan a desplazarse rápidamente y en ocasiones sólo es posible contar los individuos sin asignar una clase etaria. Si bien esto no se observó en los modelos propuestos, la mayor reactividad de estos grupos también fue descrita en La Payunia en relación al riesgo de depredación (Taraborelli et al. 2014) y en pruebas de vuelos de drones (Schroeder et al. 2020). Esta es una de las principales dificultades que nos llevan a buscar nuevas estrategias para estimar las densidades de crías en esta población.

Además, si observamos las estimaciones de reclutamiento calculadas utilizando densidades obtenidas por recuentos de animales, los valores de 2016 y 2017 son muy elevados, y los resultados son mayores a uno, lo que estaría indicando una mayor densidad de crías que de hembras. Esto es consistente con lo observado en los histogramas, pero es poco probable para esta especie en la primavera (que es cuando se realizaron los relevamientos), porque las crías todavía se encuentran junto a sus madres (Franklin 1983), es decir que, si contamos una cría, deberíamos haber contado una madre asociada a esa cría. Entonces, además de considerar recursos alternativos, en esta población, para realizar estimaciones de reclutamiento, sería recomendable utilizar relevamientos poblacionales más cerca del verano (diciembre, enero, febrero). Como se observa con las

estimaciones realizadas en febrero, la mayor facilidad para identificar los diferentes estadios vitales resulta en una menor variabilidad en las estimaciones. Esto se debe a que la población presenta una mayor estabilidad interna, porque los grupos de la estación reproductiva se encuentran ya establecidos y el número de grupos mixtos disminuye de forma considerable. Por esa razón es que de las tres estimaciones realizadas utilizando la metodología convencional, posiblemente, el resultado más confiable sea el de febrero de 2010. Aunque es importante tener en cuenta que, a finales de febrero, los individuos ya comienzan nuevamente a agruparse para desplazarse hacia el sur de la reserva (Bolgeri 2016), entonces la ventana temporal para realizar un correcto recuento de crías es bastante acotada.

Además, en esta tesis doctoral se propone por primera vez la incorporación de información de preñez obtenida mediante una metodología no invasiva para la estimación de un parámetro poblacional como el reclutamiento en una población de guanacos silvestres. Raedeke (1979) estimó la tasa de preñez temprana mediante análisis de los ovarios y Franklin (1975), estimó la preñez tardía mediante observación del tamaño de las hembras. Las estimaciones realizadas por Raedeke (1979) implicaron el sacrificio de los individuos, por lo tanto, actualmente resulta casi impensable realizar este tipo de cálculos; salvo que se trate de animales que se sacrificaron por otra razón, como por ejemplo la cacería deportiva o para la utilización de la carne. Por otra parte, la metodología propuesta por Franklin (1975) requiere de mucho entrenamiento visual, por lo tanto, actualmente resulta poco aplicable dado que tenemos metodologías más rápidas y certeras. Estos datos pertenecen a diferentes poblaciones y en diferentes momentos del año. Aun así, ponen en evidencia las diferencias entre la proporción de hembras preñadas y la elevada variabilidad del parámetro entre poblaciones. Este punto es importante, dado que, en muchos casos, debido a la escasez de información demográfica con series de tiempo largas en esta especie, se realizan modelos poblacionales y de manejo teniendo en cuenta datos de otras poblaciones y esto no es recomendable para el guanaco debido a la variabilidad en los parámetros demográficos.

Recientemente se elaboró un modelo de cosecha para la provincia de Chubut que tomó la serie de datos más larga disponible de guanacos proveniente de Tierra del Fuego (Chile; Rabinovich y Zubillaga 2011a, 2011b, 2012). En este sentido es necesario evaluar si realmente la información utilizada para este modelo de cosecha puede ser aplicada a los datos disponibles de la provincia de Chubut. Tres establecimientos ganaderos de esta

provincia fueron propuestos para aplicar el modelo de cosecha, y en todos ellos, sólo se realizaron estimaciones de densidades totales y en función de esos datos se realizaron las estimaciones de número de animales que pueden ser cazados (Rabinovich y Zubillaga 2012). Uno de los aspectos fundamentales que deben ser considerados cuando se propone realizar manejo extractivo de ungulados es la historia de vida de la población bajo manejo (Bowyer et al. 2014). En este sentido, el reclutamiento poblacional es uno de los parámetros vitales más sensibles en los ungulados y por lo tanto es fundamental considerarlo cuando se manejan este tipo de mamíferos (Gaillard et al. 2008). Además, en general, desconocemos cómo es el efecto de la mortalidad en estas poblaciones (i.e: compensatoria o aditiva) y, por lo tanto, no es posible, con la información disponible predecir el efecto del sacrificio de las hembras preñadas sobre el reclutamiento al año siguiente. La importancia de incorporar información sobre la tasa de preñez en los modelos de dinámica poblacional, especialmente en poblaciones bajo manejo, ya ha sido marcada en la bibliografía (Bonenfant et al. 2005, Bowyer et al. 2014), aun así, pocas veces este parámetro es realmente tenido en cuenta. Sólo unos pocos trabajos incorporan el diagnóstico de preñez en modelos ecológicos y lo hacen mediante muestras de sangre, causando la restricción física de los animales (Wittmer et al. 2005, 2010, Hebblewhite y Merrill 2011). En este sentido, la utilización de metabolitos fecales es una herramienta que facilita el diagnóstico de preñez dado que no se requiere una gran inversión logística ni económica.

En general, la mayoría de los trabajos disponibles en la bibliografía que utilizan metodologías no invasivas para el diagnóstico de preñez, marcan la importancia de su aplicación en poblaciones silvestres, pero sólo presentan datos obtenidos en condiciones de cautiverio con objetivos de conservación ex situ (Schwarzenberger et al. 1995, 1996, Schwarzenberger 2007, Mastro Monaco et al. 2015, Nagl et al. 2015). También, en algunos casos, se realizan diagnósticos de preñez en animales silvestres y se propone su potencial aplicación en modelos poblacionales (Altmann y Alberts 2004, Burgess et al. 2012, Cain et al. 2012), pero hasta el momento sólo unos pocos trabajos lo llevan adelante. Entre ellos, Wittmer et al. (2005) realizaron estimaciones de preñez mediante hormonas plasmáticas para evaluar la producción de crías en caribú del bosque (*Rangifer tarandus caribou*). Los autores proponen que, en esta especie, las tasas de preñez se mantienen constante entre poblaciones y que el reclutamiento es variable. Dado que no conocemos cálculos recientes de la tasa de preñez en otras poblaciones de guanacos, la

comparación de los datos obtenidos para la población de La Payunia con los de otras poblaciones sólo es posible con la información de Raedeke (1979) para una población chilena y Franklin (1975), para una población de Perú, como se mencionó anteriormente. Futuras investigaciones deberían estar orientadas a evaluar la variabilidad interanual del reclutamiento y los factores ecológicos y ambientales que puedan tener influencia sobre el mismo.

Hebblewhite y Merrill (2011), utilizaron muestras séricas para estimar preñez y fecundidad en una población parcialmente migratoria de elks (*Cervus canadensis*). Estos autores también estimaron otros parámetros poblacionales como la supervivencia, fecundidad, y tasa de crecimiento poblacional. Sus resultados indicaron que las migraciones parciales tienen un efecto sobre la regulación de algunos parámetros vitales. Observaron que la tasa de preñez en los individuos migratorios fue mayor que en los sedentarios debido a que los primeros tuvieron ventajas en el acceso a los nutrientes. La supervivencia de las crías de madres migratorias y de madres sedentarias fue la misma, aunque no se evaluaron las causas de muerte porque las crías no estaban marcadas. Para esta tesis, los animales no fueron marcados y, por lo tanto, no es posible evaluar el efecto de sus desplazamientos sobre los parámetros estimados, aun así, es importante mencionarlo y pensar su influencia sobre la población porque no todos los muestreos analizados se realizaron en la misma época del año y esto puede influir en las estimaciones de densidades, como se discutió más arriba. Un factor importante en relación a los desplazamientos de los animales es que el área en la cual realizamos este estudio es sólo una pequeña parte de la reserva, y como los individuos se desplazan estacionalmente, la densidad de los guanacos que se localizan en esa zona cada primavera es variable (Schroeder et al. 2014), por lo tanto, podría ocurrir que factores como la productividad primaria, las precipitaciones o la presencia de ganado, tengan influencia sobre el número de animales que se localicen en la región estudiada (Schroeder et al. 2013). Como se observa con las densidades totales (Schroeder et al. 2014, ver capítulo 5), posiblemente en años de mayor productividad, la densidad de individuos radicados en el área sea mayor que años menos productivos, en donde los individuos podrían utilizar otras regiones que no fueron estudiadas aquí. Esto podría tener una relación con el reclutamiento, porque el número de hembras que se localicen en la zona con sus crías de aproximadamente un año podría variar año a año y eso, en parte no estaría reflejado por las estimaciones de reclutamiento por la metodología alternativa propuesta en este capítulo. Sería interesante

determinar formas de incluir esa variabilidad en futuras investigaciones. En otras poblaciones de guanacos se ha propuesto que núcleos poblacionales próximos podrían estar influyendo sobre el reclutamiento mediante inmigraciones (Marino et al. 2014). Aquí asumimos que esta probabilidad es baja porque el otro núcleo poblacional de mayor tamaño presente en la región es el del Área Natural Protegida Ahuca Mahuida (provincia de Neuquén) y se encuentra separado del de La Payunia por una barrera geográfica (el Río Barrancas) y entre las dos reservas hay aproximadamente 200 km de distancia, con escasa protección de las poblaciones.

Las densidades estimadas mediante la metodología tradicional en 2016 y 2017 fueron mayores a las estimadas mediante la metodología alternativa. En cambio, en 2010 la densidad estimada mediante la metodología tradicional fue menor a la calculada mediante la metodología alternativa (Fig. 4.7). Aun así, cuando miramos el reclutamiento, en los tres casos analizados, fue mayor cuando se estimó por la metodología tradicional que al calcularlo mediante el método alternativo (Fig. 4.8). Es decir que la relación C:H mantiene la misma tendencia en todos los años estudiados, y se observa que la proporción de hembras con una cría al pie estimada mediante la metodología alternativa siempre es menor que mediante la metodología tradicional.

Raedeke (1979) propuso que la tasa reproductiva estimada por recuento podría estar subestimando la producción de crías en relación a la información de examinación ovárica. En otro modelo biológico como el Caribú de Grant, Cameron et al. (2013) propusieron que la relación C:H obtenida mediante estimaciones a campo estaría subestimando la producción de crías debido a que las hembras de dos años no son reproductivas, pero son indistinguibles de las hembras de tres años o más, que son las efectivamente reproductivas. En el ciervo colorado, Bonenfant et al. (2005) propusieron que la falta de relación entre la proporción de hembras preñadas y los datos observacionales de hembras con crías al pie, indican que la relación C:H obtenida mediante recuento de animales no es un indicador confiable del reclutamiento en la población. En esta tesis se observó que el reclutamiento estimado de forma tradicional, en algunos casos estaría indicando que tenemos más crías que madres, lo cual no es posible considerando que las hembras paren a lo sumo, una cría al año y que las crías de guanacos permanecen con sus madres, en algunos casos hasta los 15 meses de edad (Franklin 1983). Entonces, en los datos analizados para la población de guanacos silvestres de La Payunia, podría haber una sobreestimación del reclutamiento mediante la metodología de conteo de animales, al

menos en dos de los tres relevamientos analizados. Si bien es necesario evaluar el poder predictivo de la metodología alternativa propuesta, estos resultados sugieren que estimar el reclutamiento mediante recuento de crías y madres no es confiable, al menos en esta población de guanacos, y es aconsejable complementar esta información con otro tipo de datos, como se propone en esta tesis.

Sabemos que la población de guanacos de La Payunia es parcialmente migratoria (Bolgeri 2016), pero poco sabemos sobre los factores que regulan este movimiento. Posiblemente, nuevas investigaciones que brinden mayor comprensión sobre los factores que regulan las migraciones podrían facilitar la inclusión de este aspecto en las estimaciones de la producción de crías mediante el método alternativo propuesto aquí y obtener resultados más ajustados. Además, es notorio que las estimaciones tradicionales y el método alternativo, siguieron un patrón semejante, es decir que los años en que el reclutamiento aumentó en las estimaciones tradicionales, también se observó un aumento en las estimaciones alternativas y viceversa. Entonces, los resultados obtenidos mediante la proporción de hembras preñadas, posiblemente sean realmente informativos sobre el reclutamiento poblacional o al menos, teniendo varios años de muestreos, nos puedan informar sobre la tendencia de este parámetro.

Actualmente, en Argentina no hay planes de monitoreos sistemáticos de las poblaciones de guanacos sino datos de relevamientos poblacionales que se realizan con diferentes objetivos de investigación (ver por ejemplo: Schroeder et al. 2014, Travaini et al. 2015, Pedrana et al. 2019). Si se llevaran adelante planes de monitoreo poblacionales adecuados, la tasa de preñez anual y su relación con las densidades totales podrían ser utilizadas para realizar predicciones de la producción de crías y el reclutamiento año a año y tomar decisiones de manejo más acertadas según la población de la que se trate. Entonces, los resultados obtenidos para las estimaciones de reclutamiento apoyan la hipótesis 1 propuesta para este capítulo: la probabilidad de preñez de las hembras puede ser utilizada para realizar estimaciones de la producción de crías y del reclutamiento poblacional y las estimaciones obtenidas mediante esta metodología tienen sustento biológico y ecológico.

Finalmente, los datos simulados utilizando la información disponible sobre la población bajo estudio, sugieren una relación inversa entre las densidades de animales y el reclutamiento. Como los datos utilizados para probar el ajuste se simularon a partir de

una distribución logNormal, se obtuvieron algunos valores extremos de densidades de guanacos que podrían influir en una mayor variabilidad en los valores de reclutamiento, más frecuentes, a diferencia de lo que ocurren en los menos frecuentes donde los pocos valores obtenidos sugieren una menor variabilidad (Fig. 4.10). La mayoría de los datos se localizan entre 0 y 10 Gua/km² y muy pocos datos en densidades mayores como 20 o 30 Gua/km². Como consecuencia, la menor dispersión a mayores distancias, se debe a la simulación de los datos y no a la variabilidad real de los mismos. Aun así, los parámetros utilizados para evaluar el modelo indican un buen ajuste de los datos generados al modelo propuesto, por lo tanto, es posible aceptar la hipótesis 2. Probablemente la ecuación de Ricker sea adecuada para explicar el reclutamiento de guanacos en la población de La Payunia, porque el reclutamiento podría estar influenciado, al menos en parte, por los adultos mediante la tasa de pariciones y el uso del espacio por parte de las hembras. En este capítulo no se han explorado posibles causas de esta relación porque es recién una primera aproximación a la estimación de esta tendencia poblacional utilizando información fisiológica. Posiblemente, las causas de esta relación podrían deberse a la influencia de la disponibilidad de nutrientes dado que ya se ha observado que este factor tiene incidencia sobre otros aspectos de la ecología y fisiología de esta población (Schroeder et al. 2013, Gregorio et al. 2019).

En este capítulo no se buscó comprender cuáles fueron los factores que regulan el reclutamiento denso-dependiente sino detectar si este proceso podría estar presente en la población. Sería interesante orientar futuras investigaciones a la comprensión de los factores que influyen sobre el reclutamiento en esta población de guanacos. Los resultados obtenidos aquí brindan nuevos aportes sobre la biología de la especie y, a partir de los mismos, surge la necesidad de poner énfasis durante los relevamientos poblacionales en el recuento diferencial de las crías y adultos o en aplicar alternativas para evaluar la producción de crías, dado que este grupo etario posiblemente sea fundamental para la regulación poblacional (Festa-Bianchet et al. 1994, Gaillard et al. 1998, 2000) y por lo tanto, conocer la variación en este parámetro ecológico puede contribuir a tomar mejores decisiones de manejo.

Desde el año 2019 hasta el momento de redacción de esta tesis, diversos factores del manejo de guanaco están siendo discutidos. Uno de los aspectos más controversiales de esta discusión es la autorización de la cosecha de la especie para producción de carne (SAyDS 2019 - Resol. 243/2019) dado que, según la percepción de algunos productores

patagónicos, es una plaga que impide aumentar las cargas ovinas (Oliva et al. 2019). Los resultados obtenidos aquí nos muestran claramente la necesidad de realizar un correcto análisis de los datos y la importancia de examinar la población bajo estudio previamente a tomar decisiones que impliquen reducir el número de animales. Si la intención de realizar un manejo extractivo de guanacos tuviera éxito, entonces obtener información sobre la proporción de hembras preñadas de esa población específica, posiblemente contribuya a tomar mejores decisiones sobre el número real de individuos adultos que se pueden extraer. Obtener un dato de reclutamiento esperado, predicho mediante las tasas de preñez, puede ser una herramienta útil para tomar decisiones sobre el número de animales que se pueden extraer de una población. El actual Plan Nacional de Manejo de Guanacos establece que las provincias que quieran hacer un manejo extractivo deben realizar muestreos poblacionales a escala provincial, con una frecuencia que no exceda los cuatro años y establece que los modelos poblacionales aplicados deberán contemplar la estructura de edades de la población (SAyDS 2019), aunque los mismos no se están realizando. De cualquier forma, antes de sacrificar individuos es necesario evaluar qué se va a sacar, si es lo más adecuado y qué consecuencias va a tener para que esa población siga siendo viable.

La ecología de poblaciones es una disciplina que ha buscado brindar respuesta a la necesidad de realizar manejos controlados, principalmente cuando se trata de manejos extractivos (Caswell 2001), pero esto no debe ser tomado a la ligera y se requiere una comprensión exhaustiva de la población bajo estudio. Los resultados de este capítulo comienzan a dar luz sobre algunos aspectos biológicos poco estudiados de guanacos silvestres y nos muestran todo lo que nos falta conocer sobre este modelo biológico antes de tomar decisiones que pueden tener un efecto negativo, no sólo sobre la especie, sino sobre los ecosistemas patagónicos.

Capítulo 5: Relación entre un indicador de la productividad primaria y la densidad de guanacos en La Payunia

5.1. Introducción

En ambientes con alta estocasticidad, la dinámica poblacional es dependiente de las condiciones ambientales (Pettorelli et al. 2007, Bårdsen et al. 2011). Los eventos climáticos extremos, como primaveras con temperaturas demasiado bajas o altas, o derretimientos tempranos de la nieve pueden influir sobre las densidades de las poblaciones que habitan esos ambientes causando, en casos extremos, disminuciones drásticas de la abundancia de individuos (Rattenbury et al. 2018). Además, durante el verano, los herbívoros acumulan energía para responder al invierno, por lo tanto, las precipitaciones o sequías que regulan la productividad primaria influyen de manera indirecta sobre la capacidad de acumular energía (Parker et al. 2009). Si un verano es seco, la productividad primaria se verá reducida y, por lo tanto, la asimilación de nutrientes va a ser menor y la probabilidad de supervivencia disminuirá, principalmente si en el invierno el acceso al forraje está limitado por las nevadas (White et al. 2011).

El acceso al alimento está asociado a la capacidad de los individuos de realizar el resto de sus funciones biológicas dado que todas ellas implican utilización de energía (Halsey et al. 2019). Como consecuencia, la disponibilidad de nutrientes y la calidad de la dieta influyen sobre la ecología y el comportamiento de los organismos vivos (Tveraa et al. 2007, Mcart et al. 2009, Monteith et al. 2015) y sobre su abundancia (Jetz et al. 2004, Carbone y Pettoelli 2009). Por ejemplo, cuando las hembras de ungulados de montaña como el íbex (*Capra ibex*), las cabras de montaña (*Oreamnos americanus*) o la oveja de cuernos grandes (*Ovis canadensis*) acceden a vegetación de menor calidad, deben invertir más tiempo en alimentarse, lo que disminuye el tiempo proporcionado a los cuidados parentales, reduciendo la probabilidad de supervivencia de las crías (Pettorelli et al. 2007, Scornavacca et al. 2016). También, el acceso a nutrientes de las madres influye sobre el peso al nacimiento de las crías y, como consecuencia, en la probabilidad de supervivencia durante los primeros días de vida (Gaillard et al. 2000).

Además, la productividad primaria es uno de los factores que regula los movimientos de los herbívoros y su *home range* (Morellet et al. 2013) y, por lo tanto, en los sitios donde ésta es variable, los individuos tienden a tener un *home range* mayor que en ambientes donde es más estable (Viana et al. 2018). Estudios realizados en poblaciones de vicuñas (*Vicugna vicugna*) indican que los recursos son utilizados de manera diferencial de

acuerdo a las precipitaciones. En años más secos, las vicuñas consumen la vegetación de manera más homogénea, mientras que los años de mayor precipitación son más selectivas y se concentran en los hábitats más productivos (Arzamendia et al. 2006). Además, en esta especie se observó una relación entre las variaciones en la productividad primaria y la condición corporal. Estudios realizados en el PN San Guillermo indicaron que la cantidad de forraje se correlaciona con el peso de las crías al nacimiento y con la susceptibilidad de los adultos a la depredación. En esta población se observó que, los individuos con en una menor condición corporal utilizan ambientes con mayor riesgo de depredación por pumas (*Puma concolor*) como los cañadones y praderas para acceder a alimento (Donadio et al. 2012).

En guanacos se han realizado diversos estudios orientados a comprender la utilización del espacio por parte de la especie, principalmente su distribución en relación con los herbívoros domésticos. En diversos sitios de la Patagonia, el guanaco presentó mayor abundancia en ambientes de menor productividad primaria, posiblemente debido a la competencia con el ganado (Baldi et al. 2001, Travaini et al. 2015, Pedrana et al. 2019, Antún y Baldi 2020). A diferencia de ello, en Reserva Provincial La Payunia la competencia con el ganado es baja, si se lo compara con otras poblaciones patagónicas, por lo tanto, los guanacos pueden acceder a sitios de alta productividad (Schroeder et al. 2013). Además, en la región norte de la Reserva se observó que las abundancias varían entre las estaciones, esto es, las densidades son mayores en la primavera y en el verano, y menores en el invierno, lo cual es consistente el comportamiento migratorio de la población (Schroeder et al. 2014). También se registraron importantes variaciones interanuales en la misma estación durante tres años sucesivos de relevamientos (Schroeder et al. 2014). Asimismo, estudios acerca de la calidad nutricional realizados en esta población indicaron una relación lineal positiva entre la calidad de la dieta, evaluada en términos de contenido de nitrógeno fecal, y un indicador de la productividad primaria como el índice EVI (*enhanced vegetation index* – índice de vegetación mejorado) productividad primaria (Gregorio 2018).

La variación en la disponibilidad de nutrientes en diferentes estaciones del año es uno de los factores que regulan movimientos cíclicos de los animales como las migraciones (Fryxell y Sinclair 1988, Mueller et al. 2011, Gandiwa et al. 2016). En algunos casos, los herbívoros siguen gradientes la maduración del forraje, optimizando el acceso a nutrientes de alta calidad. Para esto, los individuos pueden adelantarse al reverdecer (*green – up*) de

la vegetación, es decir que se desplazan antes de que éste ocurra, o “seguir” el aumento en la productividad primaria (Bischof et al. 2012, Lendrum et al. 2014). Este efecto ha sido estudiado en diversos ungulados silvestres, por ejemplo, en poblaciones migratorias de caribú (*Rangifer tarandus*) se observó que la productividad primaria tiene una relación positiva con las densidades de los animales y se sugirió que es un regulador de la capacidad reproductiva de las hembras (Tveraa et al. 2007). Estudios que consideran a las lluvias como un indicador de la vegetación disponible, demostraron que en épocas de sequías los animales se desplazan hacia áreas con mayor probabilidad de contener forraje y agua superficial disponible (Gandiwa et al. 2016). También, la interacción entre la condición nutricional y los recursos alimenticios pueden influenciar el tiempo (*timing*) de los movimientos en algunas especies de ungulados (Parker et al. 2009). Por ejemplo, en alces (*Alces alces*) se propuso que machos y hembras podrían tener un *timing* distinto para desplazarse, debido a las diferentes necesidades metabólicas: los machos requieren acumular más energía para la siguiente temporada de celo y apareamiento, mientras que las hembras requieren sincronizar la migración para asegurar la supervivencia de las crías (Singh et al. 2012).

La productividad primaria neta aérea puede ser estimada mediante índices de vegetación (como EVI, NDVI, etc.) que además pueden ser considerados indicadores indirectos de la calidad nutricional de un herbívoro porque se relacionan con el contenido de nitrógeno fecal (Hamel et al. 2009, Villamuelas et al. 2016). Por ejemplo, en el rebeco pirenaico (*Rupicapra pyrenaica*) se observó una relación entre la calidad nutricional y el EVI, utilizando como indicadores de calidad nutricional el contenido de nitrógeno, la fibra de detergente neutro y ácida y el contenido de lignina en heces. Los resultados indicaron que el EVI indica correctamente el contenido de proteínas y, por el contrario, el contenido de fibra no es correctamente representado por estos índices. Por lo tanto, el EVI podría utilizarse como un indicador del nitrógeno disponible en ambientes con elevada estacionalidad (Villamuelas et al. 2016). También, se observó una correlación entre el NDVI y las proteínas fecales crudas en cabras de montaña (*Oreamnos americanus*) y ovejas (*Ovis canadensis*) y se propuso que el NDVI es un buen indicador de la disponibilidad de nitrógeno de la vegetación (Hamel et al. 2009). Por otra parte, estos índices no detectan correctamente del contenido de fibra de la vegetación (Hamel et al. 2009, Villamuelas et al. 2016). Estudios realizados en renos, también indicaron una relación directa entre el NDVI y la masa corporal de las hembras y, a su vez, de la masa

corporal con el éxito reproductivo. Es decir, que la productividad primaria podría estar regulando la probabilidad de las hembras de producir una cría y la masa corporal de las mismas (Bårdsen y Tveraa 2012, Tveraa et al. 2013). En los ambientes con alta variabilidad, esta influencia es más evidente, debido a que los pulsos en la productividad impactan sobre la calidad del hábitat (Wiegand et al. 2008).

Como se mencionó anteriormente, en la población de guanacos estudiada para esta tesis, se observó una relación positiva entre el EVI como indicador de la productividad primaria y la calidad nutricional estimada mediante contenido de nitrógeno fecal (Gregorio 2018). En este sentido, considerando que el EVI es un indicador del alimento disponible y su calidad, se puede predecir que, en años menos productivos, los individuos tendrán alimento de menor calidad y que en años más productivos, la calidad nutricional será mayor. Posiblemente, esto se relacione con los movimientos de los animales dado que los mismos podrían ser explicados, en parte, por la variabilidad estacional en las condiciones ambientales de la región (Mueller et al. 2011). Probablemente, en ausencia de los movimientos migratorios, en La Payunia no se podría sostener una densidad de animales tan elevada debido a su baja productividad primaria (Bolgeri 2016). Además, durante la primavera y el verano ocurren una serie de eventos que implican una gran demanda energética para la especie. Como, por ejemplo: el establecimiento de territorios por parte de los machos que van a cuidar durante toda la estación reproductiva; el final de la gestación de las hembras que, además, todavía cuidan a su cría del año anterior; la ocurrencia de partos y nuevos apareamientos al comienzo del verano (Gregorio et al. 2019). Estos eventos se superponen en el tiempo y luego, al final de la estación reproductiva, los grupos de guanacos se comienzan a reunir nuevamente conformando grupos mixtos (Young y Franklin 2004a), y parte de los individuos se desplazarán nuevamente hacia el sur (Bolgeri 2016). En este contexto de alta demanda energética es importante poder integrar la influencia de factores ambientales como la productividad primaria o indicadores de la misma con las variaciones temporales en las densidades de individuos.

5.2. Objetivos, hipótesis y predicciones del capítulo

En este capítulo se analiza por primera vez la serie temporal más larga disponible de relevamientos poblacionales de guanacos en La Payunia y su relación con el EVI como indicador de la productividad primaria, para ello se plantea como **objetivo:**

Realizar un análisis exploratorio entre los patrones de densidad de guanacos y el índice EVI como indicador de la productividad primaria a lo largo de los años en el norte de La Payunia.

Hipótesis de trabajo: Las densidades de guanaco en primavera, durante los últimos meses de gestación y al comienzo de la estación reproductiva, varían en relación un indicador de la productividad primaria.

Predicción: Existirá una covariación entre las densidades de guanacos de La Payunia y el índice EVI (*Enhanced Vegetation Index*) como indicador de productividad primaria.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1: Estimación de densidades poblacionales

Desde el año 2005, en la reserva provincial La Payunia se realizan relevamientos poblacionales durante los meses de primavera, utilizando la metodología de *Distance Sampling* mediante transectas de ancho variable (Buckland et al. 2016). Entre los años 2005 y 2007 estos relevamientos se realizaron sólo en la región NO de la reserva, dado que se efectuaron como parte del “Protocolo de buenas prácticas de manejo de guanacos silvestres”, previo al manejo de captura, esquila y liberación de esta especie (Carmanchahi y Marull 2017). A partir del año 2008 estos relevamientos comenzaron a realizarse en la región NO y NE de la reserva, con diversos objetivos de investigación (Ver Schroeder 2013; Moreno 2014; Gregorio 2018; Panebianco 2019). En este capítulo, se utilizaron los relevamientos poblacionales realizados a partir de 2008, dado que incluyen las dos regiones de la reserva que son ocupadas por el guanaco en la primavera y verano (Bolgeri 2016; ver capítulo 1, Fig. 1.5). Con las tablas de datos originales tomados por distintos miembros del grupo de trabajo, se realizaron estimaciones de densidades para los años comprendidos en el período mencionado, a excepción del año 2013 porque en ese año no se efectuaron relevamientos poblacionales en primavera. Si bien se realizó una sola estimación de densidad para toda el área de estudio, para realizar los relevamientos la reserva se dividió en dos regiones (NO y NE) (Buckland et al. 2016). Aunque los observadores variaron entre los relevamientos, la metodología utilizada en todos los casos fue la misma y se recorrieron las mismas transectas.

Los datos se analizaron utilizando el paquete *Distance* (Miller 2019), del software R (R Core team 2020). La metodología de *Distance Sampling* se describió en detalle en el capítulo 4, por lo tanto, en este capítulo sólo se menciona la forma en que fue aplicada

aquí. Se evaluaron modelos de *Distance Sampling* convencional (CDS) y de múltiples covariables (MCDS) para la estimación de las densidades. Las covariables utilizadas para ajustar la función de detección fueron el sitio de muestreo (NO y NE) y el tamaño de grupo, de esta forma se tuvo en cuenta la posible variabilidad entre las dos zonas de muestreo y además las grandes diferencias entre los grupos (Buckland et al. 2016). Para evaluar si el modelo de la función de detección provee un buen ajuste a los datos se utilizó la prueba de Cramér–von Mises (CvM). Una vez seleccionada la función de detección se aplicó el Criterio de Información de Akaike (AIC) para establecer el mejor modelo para cada año.

5.3.2: Estimación de un indicador de la productividad primaria

Se estimó la productividad primaria en las zonas donde se realizaron los relevamientos poblacionales. Para ello se utilizó el índice EVI (*Enhanced Vegetation Index*) obtenido de imágenes satelitales MODIS de 250 m. Este índice es una versión mejorada del NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*) y es adecuado para sistemas áridos y semiáridos debido a que considera las porciones de suelo desnudo (Mohr Bell y Siebert 2008, Wallace et al. 2008). Los índices de vegetación operan en una base por pixel y dependen de un período de observación de 16 días para generar un valor compuesto. Se obtienen un máximo de 64 observaciones por ciclo de 16 días, las imágenes de mala calidad son descartadas y sólo las de alta calidad, y libres de nubes se utilizan para calcular el índice (Huete et al. 2002). Se calculó la estadística descriptiva para cada imagen (promedio, desvío estándar, mínimo y máximo) y para la comparación con las densidades de guanacos se utilizó el promedio. En algunos casos, el relevamiento poblacional coincidió con dos imágenes consecutivas y se realizó un promedio del promedio de cada imagen.

5.3.3. Análisis estadístico

Para evaluar la covariación entre la el índice EVI y las densidades de guanacos se realizó una correlación de Spearman. Se utilizó el software estadístico R (R Core Team 2020).

5.4. Resultados

Las densidades de guanacos estimadas pueden verse en la Tabla 5.1. El esfuerzo de muestreo (kilómetros recorridos) varió entre los años, esto fue así principalmente porque los objetivos originales con los que se realizaron los relevamientos fueron diferentes. Además, algunas huellas que formaban parte de las transectas que se recorrían

originalmente, desaparecieron debido a fuertes temporales de lluvia. En general, el esfuerzo de muestreo superó los 100 km y si bien, en 2014 y 2015 fue algo menor, el valor p del CvM y la exploración visual de los datos indicaron un buen ajuste del modelo. Además, el coeficiente de variación también fue semejante al observado para otros relevamientos, lo que sugiere que la variabilidad de los datos fue similar y, por lo tanto, estos muestreos también se tuvieron en cuenta para el análisis realizado en este capítulo.

Los resultados obtenidos sugieren una elevada variación en las densidades poblacionales en la región norte durante la primavera. En todos los casos, el mejor ajuste lo presentó la función de detección Hazard-Rate (Tabla 5.1, Fig.5.1).

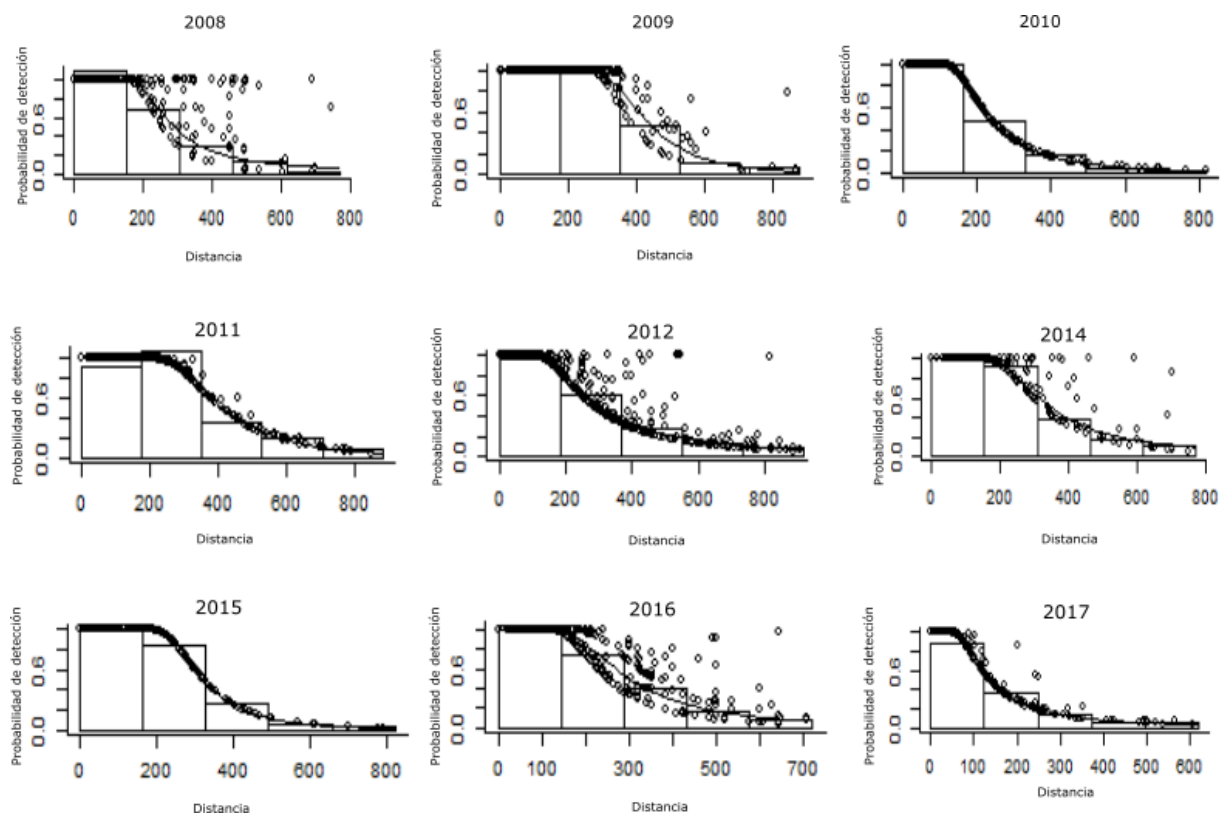


Fig. 5.11: Histogramas de ajuste de la función de detección para los relevamientos poblacionales analizados.

Tabla 5.1: Modelos seleccionados de densidad de guanacos para la primavera entre los años 2008 y 2017. Tamaño: tamaño de grupo; Región: incluye la separación entre los dos sitios de muestreo (NE – NO) de la reserva La Payunia. Abreviaturas E.E.: error estándar, CV: Coeficiente de variación, CmV p-valor: Valor p de la prueba de bondad de ajuste de Cramér von Mises.

Año	Función de detección	Modelo seleccionado	Esfuerzo de muestreo	Densidad (E.E.)	Número de individuos muestreados (n)	Tamaño medio de grupo (E.E.)	CV	CmV p-valor
2008	Hazard-rate	~tamaño	141,69	22,93(4,50)	3882	8,25 (1,08)	0,20	0.52
2009	Hazard-rate	~tamaño+Región	162,21	17,19(4,76)	3189	15,05 (3,80)	0,28	0.50
2010	Hazard-rate	~1	161,39	19,39(4,13)	1773	5,37 (1,21)	0,21	0.72
2011	Hazard-rate	~tamaño	151,587	16,46(3,93)	2462	8,92 (1,88)	0,24	0.53
2012	Hazard-rate	~tamaño	110,459	32,34(7,75)	4029	5,38 (0,58)	0,24	0,99
2014	Hazard-rate	~tamaño	84,72	13,62(3,51)	1419	4,36 (0,98)	0,26	0.52
2015	Hazard-rate	~1	77,03	26,41(5,63)	1452	7,48 (1,34)	0,21	0.44
2016	Hazard-rate	~tamaño+Región	116,46	26,05(4,86)	2851	5,47 (0,67)	0,19	0.48
2017	Hazard-rate	~tamaño	106,17	34,77(7,02)	1755	5,55 (1,35)	0,20	0.30

Los valores de índices EVI indican que la productividad primaria en La Payunia es en general baja. En la tabla 5.2 se muestran los parámetros calculados para cada imagen EVI.

Tabla 5.2: Resumen de la estadística descriptiva calculada para el EVI de las imágenes correspondientes a cada relevamiento poblacional. También se presentan las fechas de los relevamientos poblacionales. La imagen EVI utilizada incluye los días en que se realizó el relevamiento poblacional. En caso de que las fechas de los relevamientos poblacional se correspondan con el intervalo de tiempo abarcado por dos imágenes, se utilizaron ambas. Cada imagen corresponde a un intervalo de 16 días, la columna fecha de inicio de imagen EVI hace referencia al primer día de ese intervalo.

Año	Fecha de los relevamientos poblacionales		Fecha inicio Imagen EVI	Media	Desvío Standard	Mínimo	Máximo
	Noreste	Noroeste					
2008	11/10/2008	08-09/10/2008	29/9/2009	0,07	0,01	0,02	0,12
2009	10-12/09/2009	12-13/09/2008	29/8/2009	0,06	0,01	0,03	0,12
2010	23/11/2010	23/11/2010	17/11/2010	0,07	0,01	0,03	0,11
2011	23-25/09/2011	17-19/09/2011	14/9/2011	0,06	0,01	0,03	0,10
2012	30-31/10/2012	29-30/10/2012	29/9/2012	0,07	0,01	0,04	0,11
2014	29/09-01/10/2014	23-24/09/2014	14/9/2014	0,07	0,01	0,01	0,12
2014	29/09-01/10/2014	23-24/09/2014	30/9/2014	0,07	0,01	0,01	0,12
2015	29/9/2015	23-24/09/2015	14/9/2015	0,07	0,01	0,01	0,13
2016	01-02/10/2016	24-25/09/2016	13/9/2016	0,08	0,01	0,03	0,12
2016	01-02/10/2016	24-25/09/2016	29/9/2016	0,08	0,01	0,04	0,13
2017	23-24/09/2017	17/9/2017	14/9/2017	0,08	0,01	0,03	0,14

El análisis comparativo de los perfiles de densidades poblacionales junto con el perfil de índice EVI sugiere que la trayectoria descrita por las densidades de guanacos entre un año y el siguiente sigue un patrón semejante al de la productividad primaria (Fig. 5.2). Además, el cálculo del coeficiente de Spearman indicó una correlación entre las densidades de animales y el índice EVI ($\rho=0.7$, $p\text{-valor}=0.02$).

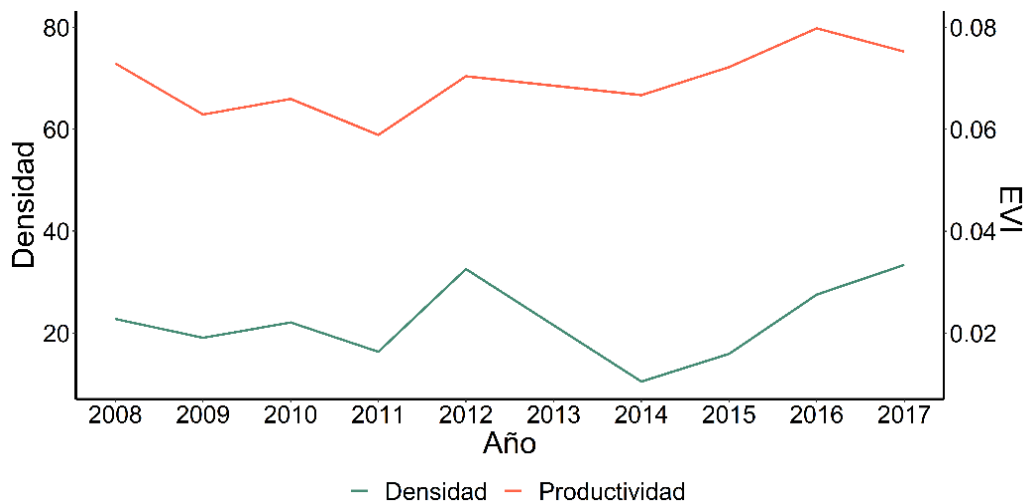


Fig. 5. 1: Variación en las densidades de guanacos y en el EVI promedio en los meses de primavera entre los años 2008 y 2017.

5.5: *Discusión*

Los datos analizados para este capítulo, indican que la densidad de individuos de la población de guanacos de La Payunia aumentó significativamente si los comparamos con las estimaciones realizadas por Puig (1987) que calculó una densidad de 8,87 guanacos/km² para la misma época del año en 1984. En este capítulo se analizaron las variaciones de las densidades de guanacos durante la primavera utilizando la serie temporal más larga disponible hasta el momento. Este es el primer análisis realizado en La Payunia que incluye nueve años de relevamientos. Los resultados obtenidos indican una variabilidad interanual en las densidades de animales y ponen en evidencia su relación con el EVI que es un indicador de la productividad primaria neta aérea. Estos resultados corresponden a la región norte de la reserva (NO y NE), que es dónde se localizan los individuos sedentarios y migratorios durante la primavera y el verano (Bolgeri 2016), coincidente con la estación reproductiva (Franklin 1983). El patrón observado en la trayectoria de los valores medios de productividad primaria y de las densidades de guanacos en el período de tiempo considerado es semejante. Si bien los datos analizados son preliminares, sugieren que las densidades de guanacos en primavera en la región norte de la reserva podrían variar en relación con el indicador de productividad primaria utilizado. En este sentido, esta tesis doctoral brinda un aporte novedoso que, sumado a la información disponible, contribuyen a la comprensión de las variaciones temporales de las densidades de guanacos en La Payunia y es posible aceptar la hipótesis propuesta.

La productividad primaria es un indicador de la disponibilidad de nitrógeno (Duncan et al. 2015, Villamuelas et al. 2016). Diversos aspectos de la ecología nutricional y energética han sido abordados en esta y otras poblaciones de guanacos. Por ejemplo, Puig et al. (1997) observó que la abundancia de guanacos en La Payunia se correlaciona con la disponibilidad de vegetación preferida por la especie. En otra población de guanacos de la provincia de Mendoza, en Laguna del Diamante, la misma autora propuso que durante las nevadas del invierno la vegetación preferida por el guanaco queda cubierta por la nieve, favoreciendo los movimientos de los animales hacia tierras más bajas (Puig et al. 2011). Además, diversos estudios han evaluado el efecto de indicadores de la productividad primaria en relación con el uso del espacio por parte del guanaco y el ganado (Schroeder et al. 2014, Travaini et al. 2015, Pedrana et al. 2019, Antún y Baldi 2020). Sin embargo, hasta el momento, pocas investigaciones han evaluado las variaciones temporales de las densidades de animales y sus causas. Una de las series temporales más largas disponibles de guanacos pertenece a la Estancia Cameron (Tierra del Fuego; Chile). Esta población se encuentra fluctuando próxima a su capacidad de carga y posiblemente el clima (precipitaciones y temperatura) y la competencia con el ganado sean factores influyentes sobre su tamaño (Zubillaga et al. 2014). En este sentido, el análisis presentado aquí es el primero realizado en La Payunia y uno de los primeros de Argentina que considera una serie de tiempo de nueve años de relevamientos poblacionales. Este estudio brinda información novedosa sobre los factores que podrían estar regulando las densidades de guanacos donde la presión de las actividades humanas es baja, y los animales estarían respondiendo principalmente a variables ambientales y ecológicas (Schroeder et al. 2013). Aquí se observó que los años menos productivos hay una menor densidad de guanacos en el norte de la reserva, pero no sabemos dónde se localizan esos individuos. Por lo tanto, nuevos estudios deberían estar orientados a comprender las variaciones interanuales en los movimientos de los animales y en la utilización del espacio por parte de los guanacos en La Payunia.

Todavía se desconocen los factores que regulan los movimientos migratorios de los guanacos de la población estudiada, aunque algunos estudios preliminares indican una covariación entre la dinámica del paisaje y los movimientos de los animales, lo que podría indicar que existe una relación entre el patrón de los movimientos y la productividad vegetal (Mueller et al. 2011). Entonces, la variación interanual observada en este capítulo en las densidades de guanacos, que es coincidente con la variación en un indicador de la

productividad primaria, posiblemente pueda ser explicada por los movimientos de los animales hacia la región norte de la reserva en la primavera. Además, en la población bajo estudio se encontró una relación positiva entre el índice EVI y el estado nutricional de los individuos (Gregorio 2018). Si consideramos que los índices de vegetación pueden ser indicadores del nitrógeno disponible (Hamel et al. 2009, Villamuelas et al. 2016), entonces en años de menor oferta de éste nutriente, el número de individuos que se localizan en la región estudiada posiblemente sea menor. Los animales podrían utilizar otras áreas no incluidas en esta tesis doctoral, buscando una mejor ingesta nutricional.

Los desplazamientos de guanacos hacia la región norte de la reserva coinciden con la estación reproductiva, período en que la demanda energética de los individuos es mayor (Gregorio et al. 2019, Panebianco 2019). Por lo tanto, si la oferta energética del ambiente varía año a año, posiblemente la localización de los animales en la zona se modifique en relación a este factor, de manera de reducir la competencia intraespecífica en años menos productivos. Teniendo en cuenta que la reproducción tiene un elevado costo energético (Millar 1977, Gittleman y Thompson 1988, Monteith et al. 2018), los mamíferos desarrollan diversas estrategias para resolverlos. Una posibilidad es variar la energía destinada a la reproducción según los recursos disponibles (Bårdsen et al. 2011), otra es la segregación espacial de los sexos de acuerdo a los requerimientos nutricionales (Barboza y Parker 2008, Barboza et al. 2018). En la población estudiada no se dan estos escenarios, pero sabemos que la proporción de hembras que se desplaza es mayor a la de los machos (Bolgeri 2016). Bolgeri (2016) propuso que esto podría deberse a la estrategia reproductiva de la especie, porque el número de hembras con las que un macho puede aparearse se relaciona con la cantidad y calidad de recursos disponibles su territorio (Young y Franklin 2004b). Desde una mirada ecofisiológica, la posibilidad de las hembras de acceder a los nutrientes es muy importante para asegurar el éxito gestacional y la supervivencia de las crías, aunque esto no siempre es fácil en los ambientes de elevada estacionalidad (Monteith et al. 2014). Entonces, se podría hipotetizar que la variación en las densidades interanuales se debe, al menos en parte, a que algunas madres se localizan en sitios no estudiados cuando la productividad primaria es baja en la región norte y, cuando la disponibilidad de nutrientes es mayor, el ambiente puede sustentar una mayor densidad de madres y, por lo tanto, más hembras se localizan en la región estudiada. En este sentido, futuras investigaciones deberían estar orientadas a poner a pruebas esta

hipótesis y a evaluar si existe un efecto diferencial de la productividad primaria sobre las hembras que sobre los machos.

La forma en que las hembras de guanacos sustentan la gestación en términos energéticos, no está comprendida. En general, se describieron dos maneras en que esto puede ocurrir: pueden acumular nutrientes previamente a la estación reproductiva y sostener la gestación con sus reservas energéticas (son *capital breeders*) o pueden ajustar su ingesta de alimentos durante la gestación sin depender de las reservas endógenas (son *income breeders*; Jönsson 1997). Si bien algunos organismos desarrollan claramente una u otra estrategia, otros se localizan en algún punto intermedio entre estos dos extremos, y pueden adaptar su estrategia en relación a la disponibilidad de alimento (Williams et al. 2017). Entonces, más que dos estrategias separadas, se ha propuesto un *continuum* en que los organismos vivos se adaptan y responden de acuerdo con las variaciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes (Jönsson 1997, Stephens et al. 2014). En el guanaco, desconocemos el punto de este *continuum* en que la especie se localiza. Entonces, si en esta especie existiera la plasticidad de adaptarse a diferentes estrategias, tendría sentido que las hembras tiendan a elegir ambientes con mayor productividad o que, en años menos productivos, durante la primavera y verano se dispersen de manera de reducir la competencia intraespecífica para asegurar el acceso al forraje y de esa forma lograr la mejor condición corporal posible para sostener la gestación durante la estación seca. Además, muchas de esas hembras tienen una cría de 8 o 9 meses que necesita acceder a pasturas para completar su desarrollo y sería esperable que las madres busquen asegurarles el acceso a nutrientes.

La información obtenida aquí abre nuevas preguntas en torno a la ecología nutricional del guanaco y su relación con la inversión energética durante la reproducción. Futuras investigaciones deberían estar orientadas a comprender en mayor profundidad las variaciones temporales en la utilización de espacio por parte de las hembras y relacionar esta información con los movimientos de los animales y la inversión energética de las madres. Además, estos resultados muestran la importancia de los relevamientos sistemáticos de fauna, principalmente cuando se trata de especies de tamaño grande y con intereses económicos. La sistematización de grandes bases de datos es una etapa fundamental del monitoreo que, en el caso del guanaco debería trabajarse en profundidad, dado que todavía hay mucho por aprender sobre este modelo biológico.

Capítulo 6: Aportes originales realizados en esta tesis y perspectivas futuras

La producción de nuevas crías es uno de los mecanismos más importantes para asegurar la viabilidad de las poblaciones. En general, su estudio a escala poblacional estuvo limitado a realizar recuentos de crías y evaluar los efectos del ambiente o de la depredación. Sin embargo, comprender las respuestas fisiológicas de los individuos y llevarlas a escala poblacional, es esencial en un marco de cambio global (Albon et al. 2017). En este sentido, la ecofisiología brinda recursos para comprender el funcionamiento del organismo de los animales que luego tienen efectos sobre las poblaciones y el ambiente (Bergman et al. 2019). En esta tesis se estudió la endocrinología ovárica del guanaco durante la gestación mediante técnicas no invasivas. Por un lado, se elaboró un modelo predictivo de diagnóstico de preñez que podrá ser utilizado en ésta y otras poblaciones para evaluar la proporción de hembras preñadas mediante una metodología no invasiva. Por otro, se estudiaron las variaciones en las concentraciones de metabolitos fecales durante todo el proceso gestacional y se evaluó el éxito de la gestación en la población silvestre de La Payunia. Las herramientas desarrolladas y utilizadas aquí, permitirán realizar comparaciones en la proporción de hembras preñadas y el éxito de la gestación en diferentes poblaciones de guanacos de manera fácil y sin causar ningún impacto en el feto. Agregar conocimiento sobre la biología reproductiva del ungulado silvestre de mayor tamaño y con mayor distribución de Sudamérica es fundamental para poner en valor este modelo biológico y poder evaluar el efecto que las actividades antrópicas y las variaciones ambientales tienen sobre sus poblaciones.

Como se describió a lo largo de esta tesis, la fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos y en particular el guanaco, tienen una serie de características distintivas si se la compara con otros modelos biológicos semejantes. Una de ellas es la duración de la gestación (más de 340 días) que es al menos unos 100 días más larga que la de otros ungulados de clima templado. Por ejemplo, en el alce americano (*Alces americanus*), la gestación dura aproximadamente 240 días (Bartalucci y Weinstein 2000); en el ciervo colorado (*Cervus elaphus*) unos 250 días (Senseman 2002) y en el ibex (*Capra pyrenaica*) 165 días (Blaha 2003). La forma en que diferentes mamíferos sustentan este proceso, tan costoso energéticamente, puede ser variable y en general, los recursos que las madres destinan a este mecanismo van a estar en parte influenciados por las condiciones ambientales (Bårdsen et al. 2011). En este sentido, a partir de los resultados obtenidos en

esta tesis, quedan planteadas líneas futuras de investigación para evaluar los mecanismos energéticos asociados al éxito gestacional que todavía no están totalmente comprendidos en ninguno de los camélidos sudamericanos.

También, se discutieron aspectos de la ecología del guanaco, como el reclutamiento poblacional, las densidades de individuos y su relación con la productividad primaria. A partir de una revisión bibliográfica, se puso en evidencia la variabilidad entre en los parámetros demográficos de diferentes poblaciones de la especie y, como consecuencia, la importancia del estudio de la población de interés en caso de que se quieran realizar acciones de manejo. Además, se propuso una metodología para estimar la producción de crías utilizando la proporción de hembras preñadas. La misma supone una alternativa a las estimaciones tradicionales mediante recuento de individuos que, en ocasiones, se ven dificultadas debido a la topografía y la vegetación entre otras problemáticas que presentan los muestreos terrestres (Buckland et al. 2016). En este sentido, también, se abren una serie de preguntas a futuro para probar esta metodología en otras poblaciones de guanacos y con una serie temporal mayor para realizar una correcta validación a campo de la misma. La metodología propuesta resulta innovadora ya que, el desarrollo de alternativas para resolver las dificultades de los relevamientos terrestres continúa siendo un desafío en la ecología de poblaciones (ver por ejemplo Buckland et al. 2010, 2016, Chandler 2011). Además, esta herramienta podría ser probada y aplicada a otros modelos biológicos.

Finalmente, se analizó una de las series de tiempo de relevamientos poblacionales más largas disponibles para el guanaco en Argentina. Este resultado fue el producto del trabajo del Grupo de Investigaciones en Ecofisiología de Fauna Silvestre (GIEFAS) que, con diversos objetivos, viene realizando sistemáticamente evaluaciones de distintos parámetros poblacionales de guanacos silvestres en la región (Carmanchahi et al 2011, 2014; Schroeder et al. 2013, 2014, 2018; Moreno et al. 2015; Gregorio 2018; Panebianco 2019). Si bien estos resultados son preliminares, demuestran la importancia de que este tipo de monitoreos poblacionales se realicen, sobre todo en una especie como el guanaco que, en ciertas regiones, está sometido al manejo para obtención de fibra y carne. Por lo tanto, es necesario que las evaluaciones periódicas de las poblaciones, que permitan definir acciones de manejo, sean parte de las políticas públicas ambientales de nuestro país.

6.1. Relevancia del diagnóstico de preñez en el manejo de guanacos silvestres

Actualmente, en Argentina se encuentra autorizada la esquila en vivo de guanacos silvestres y la extracción de individuos para producción de carne (SAyDS 2019 - Resol. 243/2019). En caso de que se realicen cosechas de animales, es importante tener en cuenta que, cuando se sacrifica a una hembra, existe la posibilidad de que esté preñada y, además, tenga una cría al pie que queda sin madre. Entonces, de acuerdo con su edad, la cría va a tener más o menos probabilidades de sobrevivir, pero, además, el número de individuos que van a nacer se reduce, dado que las hembras que se encontraban preñadas y fueron sacrificadas ya no van a parir la cría que estaba en gestación. En este sentido, el modelo de cosecha actualmente en uso para el guanaco propone establecer densidades umbrales estimadas en cada predio en relación a la capacidad de carga del mismo (Rabinovich y Zubillaga 2012). Esto implica que si las densidades de herbívoros (guanacos y ovejas) están por encima de la capacidad de carga, se puede cazar un número de guanacos tal que, la densidad total de herbívoros alcance un valor próximo al umbral (Lande et al. 1997, Rabinovich y Zubillaga 2012). Para realizar una correcta estimación de las densidades umbrales es importante considerar la incerteza en las estimaciones de densidad, la tasa de crecimiento poblacional, la forma en que se regula la densodependencia (i.e: cerca o lejos de la capacidad de carga) y las variaciones temporales en estos parámetros (Lande et al. 1997). En el modelo propuesto, para realizar estimaciones de capacidad de carga, se consideró que un guanaco es equivalente a 1,5 ovejas (Rabinovich y Zubillaga 2011b). Esta estimación ignora la eficiencia del guanaco para extraer nutrientes de los pastizales patagónicos que presenta una mayor digestibilidad para este tipo de vegetación que las ovejas y por lo tanto la equivalencia debería ser 1:1 (Moseley 1993).

Además, como se mencionó en el capítulo 4, en las poblaciones de grandes ungulados es conveniente considerar la historia de vida de la población cuando se realizan manejos extractivos para determinar la posición relativa de una población en relación a su capacidad de carga (Bowyer et al. 2014). Algunos ejemplos de parámetros a tener en cuenta son: la condición corporal de las hembras, la proporción de hembras preñadas, la existencia o no de pausas en la reproducción año a año por parte de las hembras, el recuento de cuerpos lúteos, la edad de la primera reproducción, el peso de los neonatos, calidad de la dieta, entre otros factores (Bowyer et al. 2014). Recolectar este tipo de información contribuye a evaluar el estado de la población con respecto a la capacidad de carga además de la importancia de los efectos *bottom up* o *top down* (Pierce et al. 2012).

En una primera instancia, el modelo propuesto consideró esta estructura y propuso enfocar la cacería en los machos, pero debido a las dificultades logísticas de identificar sexos, se decidió trabajar en un modelo basado sólo en hembras (Rabinovich y Zubillaga 2012). De todas formas, el efecto de la cacería de las hembras sobre la producción de crías y la viabilidad poblacional debería, al menos, ser evaluado (Rughetti et al. 2017). Por lo tanto, utilizar un método indirecto como la tasa de preñez mediante metabolitos fecales, podría aportar al menos una estimación de algunos parámetros de la historia de vida de la población como la proporción de hembras preñadas, la natalidad y el reclutamiento. Esta información podría contribuir a asegurar la sustentabilidad del manejo y la viabilidad de las poblaciones porque además de considerar la capacidad de carga de los campos se tendría una estimación de la cantidad de individuos que se podrían sumar a la población.

En este sentido, ya que en el Plan Nacional de Manejo de Guanacos (PNMG) modificado en 2019 se propone que la cosecha de los animales también puede realizarse mediante arreos, captura y sacrificio (SAyDS 2019 - Resol. 243/2019), la identificación de sexos ya no sería una dificultad, dado que se pueden observar los órganos sexuales. Entonces, si se realiza una evaluación no invasiva previa a la cosecha de la proporción de hembras preñadas de la población a manejar, sería posible establecer un cupo de sacrificio diferente para hembras y machos, para asegurar la viabilidad poblacional. Asegurar la supervivencia de las hembras preñadas para garantizar la producción de crías y el reclutamiento al año siguiente es un objetivo inherente al aprovechamiento sustentable de una especie silvestre (White y Bartmann 1997).

En especies de ungulados dimórficas con segregación sexual durante la mayor parte del año se ha propuesto que, si las poblaciones se encuentran próximas a la capacidad de carga, la competencia intraespecífica entre las hembras podría tener influencias sobre el éxito reproductivo de los machos (Monteith et al. 2018). Entonces, se recomienda realizar una mayor extracción de hembras para disminuir la competencia y favorecer el desarrollo de machos más vigorosos (Monteith et al. 2018). El guanaco no presenta dimorfismo sexual ni segregación de sexos (Franklin 1983), por lo tanto, la disponibilidad de nutrientes es la misma para hembras y machos, y el mayor desarrollo de los machos no necesariamente está regulado por la competencia entre las hembras, o al menos no hay información que avale esta hipótesis. Además, la principal estrategia reproductiva del guanaco es la polígina en defensa del recurso (Franklin 1983), entonces las densidades de

las poblaciones podrían mantenerse por debajo de la capacidad de carga ambiental debido al efecto de la dispersión (Marino et al. 2016). De ser así, la competencia intraespecífica y la disponibilidad de forraje ya no serían los únicos factores a considerar para evaluar la capacidad de carga de una población. Aun así, si asumimos que el manejo extractivo enfocado en las hembras podría ser una opción para una especie monomórfica, sin segregación de sexos, como el guanaco, éste no funciona en condiciones diferentes a las de una población próxima a la capacidad de carga, como por ejemplo en poblaciones que se localizan en ambientes de baja calidad nutricional (Shea et al. 1992). En las provincias con mayor interés en realizar manejo extractivo de guanacos, la mayoría de las poblaciones se localizan en ambientes degradados y campos abandonados, donde la competencia con las ovejas es menor (Baldi et al. 2001, Pedrana et al. 2010). Por lo tanto, enfocar la cacería en las hembras no sería recomendable (Shea et al. 1992, Monteith et al. 2018).

En Patagonia, hay una percepción negativa del guanaco por parte de la mayoría de los productores debido a la competencia con el ganado (Baldi et al. 2001, Marino et al. 2020). Esta es una de las principales razones que sustenta la autorización, por parte de las autoridades de aplicación de algunas provincias, del manejo para la cosecha de individuos. Esta situación, que en el PNMG 2019 queda inmersa bajo el relato del aprovechamiento sostenible de la especie, carece de modelos de extracción consensuados entre los sectores involucrados (productivo, científico, autoridades) y con falencias metodológicas (Carmanchahi et al. en prensa-b). Entonces, es imprescindible asegurar que la extracción de animales se lleve a cabo garantizando la viabilidad de las poblaciones, de lo contrario, pueden llevar nuevamente a una reducción dramática de la abundancia de guanacos como ocurrió en el pasado (Ojeda y Mares 1982).

Además, la información sobre la proporción de hembras preñadas puede contribuir a mejorar las prácticas del manejo durante las esquilas en vivo de animales silvestres. Durante las experiencias de manejo se tiene especial cuidado con las hembras, debido al estado avanzado de la preñez. De hecho, en la actualización más reciente del protocolo de buenas prácticas de manejo de guanacos se describe una maniobra para la liberación de hembras preñadas (Carmanchahi y Marull 2017). Si se conoce la proporción de hembras preñadas en la población bajo manejo, entonces se estaría sumando información que contribuye a brindar especial cuidado sobre estos animales cuando se realizan las esquilas. Cuidar a las hembras preñadas es una etapa importante de la sustentabilidad del

manejo *in vivo* de los animales dado que, un manejo inadecuado puede poner en riesgo la vida del feto (Carmanchahi y Marull 2017). En este sentido, asegurar buenas prácticas de manejo que cuiden a los animales y a las personas que lo llevan a cabo, es fundamental para que la actividad logre certificaciones y cuente con el apoyo de los sectores productivos, las autoridades de aplicación y el sector científico técnico.

6.2. Perspectivas futuras de investigación

6.2.1. Efecto de la disponibilidad de nutrientes sobre el éxito gestacional

En esta tesis se discutieron aspectos de la endocrinología de la gestación del guanaco y se observó que una parte de las hembras en condición silvestre no llegan a término con su gestación. Hasta el momento se desconocen los factores que podrían influir sobre el éxito gestacional, aunque el acceso a nutrientes posiblemente sea un factor influyente si consideramos la elevada estacionalidad de los ambientes que ocupa el guanaco (Russell et al. 1998, Stephens et al. 2014). Además, en general, debido a la presencia del ganado, el guanaco ocupa espacios marginales, de menor productividad (Pedrana et al. 2010, 2019, Nabte et al. 2013, Travaini et al. 2015). Entonces, comprender cómo la ecología nutricional del guanaco influye sobre el éxito gestacional, es información relevante para evaluar la dinámica de las poblaciones y posibles respuestas de la especie frente a presiones antrópicas y escenarios de cambio global (Williams et al. 2017). A modo de ejemplo, en el invierno de 2020, debido a condiciones climáticas extremas en la provincia de Santa Cruz, se registraron elevadas mortalidades de guanacos (Gregorio et al. 2021). La mayor frecuencia de mortalidad se detectó en las hembras adultas y en crías. Como la región en donde ocurrieron estos eventos corresponde a campos privados con alambrados, las crías quedan “encerradas” en los predios donde nacen hasta que alcanzan un tamaño suficiente para saltarlos. Posiblemente, las muertes detectadas sean madres que permanecieron junto a sus crías y, frente a las temperaturas extremadamente bajas y el escaso accesos al alimento, no sobrevivieron el evento extremo (Gregorio et al. 2021). En un escenario de cambio global, si este tipo de eventos extremos se incrementan, entonces es importante comprender cómo responderán los individuos a estas condiciones. Por lo tanto, surgen interrogantes en cuanto a la inversión energética que harán los individuos en condiciones extremas, por ejemplo, ¿se verán favorecidos los mecanismos relacionados a la inversión energética en cuidados maternos o al éxito gestacional? Si este tipo de eventos ocurren con mayor frecuencia, causando grandes mortalidades de crías y madres, ¿cómo se verían afectadas la tasa de natalidad y el reclutamiento?

Como se discutió en el capítulo tres, sostener el proceso gestacional tiene un elevado costo energético para las madres que en ocasiones deben “elegir” sostener la vida del feto o priorizar la supervivencia de la cría en pie (Russell et al. 1998, Stephens et al. 2009, 2014). Comprender estos mecanismos y el origen de los nutrientes utilizados en este proceso, es una pregunta que se ha abordado en diversas especies de ungulados. En algunos casos, como la oveja de cuernos grandes (*Ovis canadensis*), las hembras pueden acumular nutrientes previamente a la estación reproductiva y sostener la gestación con sus reservas energéticas, por lo tanto, se las considera *capital breeders* (Festa-Bianchet y Jorgenson 1998). En otros, como el corzo (*Capreolus capreolus*) las hembras ajustan su consumo de alimentos durante la gestación sin depender de las reservas, en este caso son considerados como *income breeders* (Andersen et al. 2000). Hasta el momento, se desconoce en qué instancia del *continuum capital breeders – income breeders* se encuentra el guanaco. Entonces, futuras investigaciones deberían estar orientadas a comprender los mecanismos de inversión en energética de las madres durante la gestación y la lactancia. Si bien posiblemente el guanaco se trate de una especie con una estrategia *capital*, durante la última etapa de la gestación y la lactancia las madres probablemente se apoyen en el alimento disponible para sostener la elevada demanda energética que enfrentan.

6.2.2. Ecofisiología de las migraciones de guanacos

Hasta el momento, se conocen las rutas migratorias de los guanacos de La Payunia y sabemos que, posiblemente, uno de los factores que influye sobre los mismos es la disponibilidad de nutrientes (Mueller et al. 2011, Bolgeri 2016). Aun así, todavía no se conocen en profundidad los mecanismos fisiológicos involucrados en el desplazamiento de los animales. Los resultados observados en el capítulo 5 de esta tesis nos llevan a proponer que, posiblemente, estén relacionados al acceso a nutrientes y la elevada demanda energética durante la estación reproductiva (Hamel et al. 2010). Además, sabemos que los desplazamientos de las hembras fueron mayores que los de los machos (Bolgeri 2016). En diversas especies se han observados comportamientos migratorios diferentes entre las hembras y los machos (Singh et al. 2012, Barboza et al. 2018). En otros modelos biológicos, como por ejemplo el alce (*Alces alces*) parte de esa diferencia se ha explicado por las variaciones en la inversión energética durante la estación reproductiva (Singh et al. 2012). En este sentido, futuras investigaciones sobre la población de guanacos de La Payunia deberían estar orientadas a comprender los factores fisiológicos que influyen sobre el desplazamiento de los animales.

Para los animales que habitan ambientes de elevada estacionalidad, sincronizar la producción de crías con el momento del año en que los recursos sean más abundantes o de mayor calidad es fundamental para asegurar la reproducción (Post y Forcharmer 2008; Klein 1990). En este sentido, posiblemente, las demandas energéticas de las hembras durante la última etapa de la gestación y el hecho de que algunas de esas hembras también están cuidando una cría al pie, sean factores que favorezcan un mayor movimiento migratorio de las hembras que de los machos en esta población (Bolgeri 2016). Además, una gestación tan larga como la del guanaco, probablemente tenga un efecto notorio sobre la condición corporal de las madres, influyendo además sobre la probabilidad de quedar preñadas al año siguiente. Entonces, podemos hipotetizar que el mayor desplazamiento de las hembras en relación a los machos se relaciona con la necesidad de asegurar el acceso a nutrientes y, además, años de baja productividad, las hembras posiblemente utilicen otras regiones de la reserva que no han sido estudiadas.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis abrieron nuevas preguntas sobre la biología del guanaco y brindaron información novedosa sobre la fisiología y ecología de la especie. Las metodologías innovadoras propuestas aquí tienen la potencialidad de ser aplicadas en ésta y otras poblaciones, y también, podrían ser probadas en otras especies de ungulados. Concretamente, la utilización de herramientas no invasivas para realizar el diagnóstico de preñez, la producción de crías y el reclutamiento poblacional pueden brindar información útil para tomar acciones orientadas a disminuir el impacto del manejo sobre las hembras y asegurar la viabilidad de las poblaciones.

7. Referencias bibliográficas

- Ahuja-Aguirre, C., L. López-deBuen, S. Rojas-Maya, y B. C. Hernández-Cruz. 2017. Progesterone and estradiol profiles in different reproductive stages of captive collared peccary (*Pecari tajacu*) females assessed by fecal metabolites. *Animal reproduction science* 180:121-126.
- Albon, S. D., R. J. Irvine, O. Halvorsen, R. Langvatn, L. E. Loe, E. Ropstad, V. Veiberg, R. van der Wal, E. M. Bjørkvoll, E. I. Duff, B. B. Hansen, A. M. Lee, T. Tveraa, y A. Stien. 2017. Contrasting effects of summer and winter warming on body mass explain population dynamics in a food-limited Arctic herbivore. *Global Change Biology* 23:1374-1389.
- Altmann, J., J. W. Lynch, N. Nguyen, S. C. Alberts, y L. R. Gesquiere. 2004. Life-history correlates of steroid concentrations in wild peripartum baboons. *American Journal of Primatology*. 64:95-106.
- Altmann, J., y S. C. Alberts. 2004. Growth rates in a wild primate population: ecological influences and maternal effects. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57:490-501.
- Andersen, R., J.-M. Gaillard, J. D. C. Linnell, y P. Duncan. 2000. Factors affecting maternal care in an income breeder, the European roe deer. *Journal of Animal Ecology* 69:672-682.
- Anouk Simard, M., J. Huot, S. De Bellefeuille, y S. D. Côté. 2014. Linking conception and weaning success with environmental variation and female body condition in a northern ungulate. *Journal of Mammalogy* 95:311-327.
- Antún, M., y R. Baldi. 2020. Choosing what is left: The spatial structure of a wild herbivore population within a livestock-dominated landscape *PeerJ* 8:e8945.
- Arzamendia, Y., M. H. Cassini, y B. L. Vilá. 2006. Habitat use by vicuña (*Vicugna vicugna*) in Laguna Pozuelos Reserve, Jujuy, Argentina. *Oryx* 40:198-203.
- Arbor Assays. 2011. DerectX 17B Estradiol. Enzime Immunoassay Kit.
- Arbor Assays. 2015. ISWE Progesterone Mini-Kit.
- Bakker, J., y M. J. Baum. 2000. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21:220-262.
- Baldi, R., S. Albon, y D. Elston. 2001. Guanacos and sheep: evidence for continuing competition in arid Patagonia. *Oecologia* 129:561-570.
- Baldi, R. B., P. Acebes, E. Cuéllar, M. Funes, D. Hoces, S. Puig, y W. Frankli. 2016. *Lama guanicoe* (Guanaco). <https://www.iucnredlist.org/species/11186/18540211>. Consultada: agosto 2020.
- Baldi, R., D. A. de Lamo, M. Failla, P. Ferrando, M. C. Funes, P. Nugent, S. Puig, S. Rivera, y J. von Thungen. 2006. Plan Nacional de Manejo del Guanaco (*Lama guanicoe*). República Argentina. Anexo I. Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nacion.
- Baldi, R., A. Pelliza-sbriller, D. Elston, y S. Albon. 2004. High potential for competition between guanacos and sheep in Patagonia. *Journal of Wildlife Management* 68:924-938.

- Bamberg, E., E. Möstl, M. Patzl, y G. J. King. 1991. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*:73-77.
- Barboza, P. S., y K. L. Parker. 2008. Allocating protein to reproduction in arctic reindeer and caribou. *Physiological and Biochemical Zoology* 81:835-855.
- Barboza, P. S., L. L. Van Someren, D. D. Gustine, M. S. Bret-Harte, y M. Syndonia Bret-Harte. 2018. The nitrogen window for arctic herbivores: plant phenology and protein gain of migratory caribou (*Rangifer tarandus*). *Ecosphere* 9:e02073.
- Bårdsen, B.-J., J.-A. Henden, P. Fauchald, T. Tveraa, y A. Stien. 2011. Plastic reproductive allocation as a buffer against environmental stochasticity – linking life history and population dynamics to climate. *Oikos* 120:245-257.
- Bårdsen, B. J., y T. Tveraa. 2012. Density-dependence vs. density-independence - linking reproductive allocation to population abundance and vegetation greenness. *J Anim Ecol* 81:364-376.
- Barraza, D. E., R. Zampini, S. A. Apichela, J. I. Pacheco, y M. E. Argañaraz. 2020. Modifications of extracellular matrix features in the left and right uterine horns during the embryo pre-implantation period in *Vicugna pacos*. *Theriogenology* 157:440-448.
- Bartalucci, A., y B. Weinstein. 2000. ADW: *Alces americanus*: INFORMATION. https://animaldiversity.org/accounts/Alces_americanus/. Consultada: octubre 2021.
- Bergman, J. N., J. R. Bennett, A. D. Binley, S. J. Cooke, V. Fyson, B. L. Hlina, C. H. Reid, M. A. Vala, y C. L. Madliger. 2019. Scaling from individual physiological measures to population-level demographic change: Case studies and future directions for conservation management. *Biological Conservation* 238:108242.
- Bischof, R., L. E. Loe, E. L. Meisingset, B. Zimmermann, B. Van Moorter, y A. Mysterud. 2012. A Migratory Northern Ungulate in the Pursuit of Spring: Jumping or Surfing the Green Wave? *Am. Nat* 180:407-424. Consultada: octubre 2021.
- Blaha, D. 2003. ADW: *Capra pyrenaica*: INFORMATION. https://animaldiversity.org/accounts/Capra_pyrenaica/. Consultada: octubre 2021.
- Bolgeri, M. J. 2016. Caracterización de movimientos migratorios en guanacos (*Lama Guanicoe*) y patrones de depredación por pumas (*Puma concolor*) en la Payunia, Mendoza. Universidad Nacional del Comahue.
- Bolker, B. M. 2008. *Ecological models and data in R*. Princeton University Press.
- Bonenfant, C., J.-M. Gaillard, F. Klein, y J.-L. Hamann. 2005. Can we use the young : female ratio to infer ungulate population dynamics? An empirical test using red deer (*Cervus elaphus*) as a model. *Journal of Applied Ecology* 42:361-370.
- Bonenfant, C., J. Gaillard, T. Coulson, M. Festa-Bianchet, A. Loison, M. Garel, L. E. Loe, P. Blanchard, N. Pettorelli, N. Owen-Smith, J. Du Toit, y P. Duncan. 2009. Chapter 5: Empirical Evidence of Density-Dependence in Populations of Large Herbivores. Páginas 313-357 *Advances in Ecological Research*. Academic Press.
- Bravo, P. W. 1994. Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 10:265-279.

- Bravo, P. W., M. E. Fowler, G. H. Stabenfeldt, y B. L. Lasley. 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology of Reproduction* 43:579-585.
- Bowyer, R. T., V. C. Bleich, K. M. Stewart, J. C. Whiting, y K. L. Monteith. 2014. Density dependence in ungulates: A review of causes, and concepts with some clarifications. *California Fish and Game* 100:550-572.
- Brook, B. W., y C. J. A. Bradshaw. 2006. Strength of evidence for density dependence in abundance time series of 1198 species. *Ecology* 87:1445-1451.
- Brown, J. L. 2018. Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered mammals. *Theriogenology* 109:2-13.
- Buckland, S. T., D. R. Anderson, K. P. Burnham, y J. L. Laake. 1993. *Distance Sampling: Estimating Abundance of Biological Populations*. Chapman and Hall, London, UK.
- Buckland, S. T., A. J. Plumptre, L. Thomas, y E. A. Rexstad. 2010. Design and Analysis of Line Transect Surveys for Primates. *International Journal of Primatology* 31:833-847.
- Buckland, S. T., E. A. Rexstad, T. A. Marques, y C. S. Oedekoven. 2016. *Distance Sampling: Methods and Applications*. *Página Methods in Statistical Ecology*.
- Burger, J. 2006. Bioindicators: Types, Development, and Use in Ecological Assessment and Research. *Environmental Bioindicators* 1:22-39.
- Burgess, E. A., J. M. Lanyon, J. L. Brown, D. Blyde, y T. Keeley. 2012. Diagnosing pregnancy in free-ranging dugongs using fecal progesterone metabolite concentrations and body morphometrics: a population application. *General and comparative endocrinology* 177:82-92.
- Burnham, K. P., D. R. Anderson, y K. P. Huyvaert. 2011. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: Some background, observations, and comparisons. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65:23-35.
- Cain, S. L., M. D. Higgs, T. J. Roffe, S. L. Monfort, y J. Berger. 2012. Using fecal progestagens and logistic regression to enhance pregnancy detection in wild ungulates: A bison case study. *Wildlife Society Bulletin* 36:631-640.
- Cameron, R. D., B. Griffith, L. S. Parrett, y R. G. White. 2013. Efficacy of calf:cow ratios for estimating calf production of arctic caribou. *Rangifer* 33:27-34.
- Candia, R., S. Puig, A. Dalmaso, F. Videla, y E. E. Martinez Carretero. 1993. Diseño del plan de manejo para la reserva provincial La Payunia (Malargüe, Mendoza). *Multequina* 2:5-21.
- Cao, X., H. Wei, H. Xue, X. Li, W. Zhao, C. Xu, S. Wang, Y. Diao, J. Rose, y B. Xu. 2016. Fecal progestin concentrations as an indicator of reproductive success in American Mink. *Animal Reproduction Science* 165:11-16.
- Carbone, C., y N. Pettorelli. 2009. Testing Relationships between Energy and Vertebrate Abundance. *International Journal of Ecology*.
- Carmanchahi, P., M. Funes, A. Panebianco, P. Gregorio, L. Leggieri, A. Marozzi, y R. Ovejero. (en prensa – a). Taxonomy, distribution, and conservation status of wild guanaco's populations. *Página Guanacos and people: a relationship of conflicts and opportunities in Patagonia*.

- Carmanchahi, P., G. Lichtenstein, P. Gregorio, A. Panebianco, A. Marozzi, L. Leggieri, F. Peña, y R. Ovejero. (en prensa – b). Guanaco sustainable management as a conservation strategy and socioeconomic rural development. Página Guanacos and people: a relationship of conflicts and opportunities in Patagonia.
- Carmanchahi, P. D., A. Panebianco, L. Leggieri, F. Barri, A. Marozzi, C. Flores, P. Moreno, N. Schroeder, C. Cepeda, G. Oliva, M. S. Kin, P. Gregorio, R. Ovejero, P. Acebes, C. F. Schneider, J. Pedrana, y P. Taraborelli. 2019. Lama guanicoe. Página en SAyDS–SAREM, editor. Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción. Lista Roja de los mamíferos de Argentina.
- Carmanchahi, P. D., y C. A. Marull. 2017. Protocolo de Buenas Prácticas de Manejo de Guanacos (*Lama guanicoe*) Silvestres.
- Carmanchahi, P. D., N. M. Schroeder, M. J. Bolgeri, R. S. Walker, M. Funes, J. Berg, P. Taraborelli, R. Ovejero, P. Gregorio, P. Moreno, y A. J. Novaro. 2015. Effects of live-shearing on population parameters and movement in sedentary and migratory populations of guanacos (*Lama guanicoe*). *Oryx* 49:51-59.
- Caswell, H. 2001. Matrix population models: construction, analysis and interpretation. Sinauer Sunderland, MA, USA.
- Chambert, T., B. R. Hossack, L. A. Fishback, y J. M. Davenport. 2016. Estimating abundance in the presence of species uncertainty. *Methods in Ecology and Evolution* 7:1041-1049.
- Chandler, R. 2011. Distance sampling analysis in unmarked. 1-8.
- Christensen, A., G. E. Bentley, R. Cabrera, H. H. Ortega, N. Perfito, T. J. Wu, y P. Micevych. 2012. Hormonal Regulation of Female Reproduction. *Hormone and Metabolic Research* 44:587-591.
- Clutton-Brock, T. H., y T. Coulson. 2002. Comparative ungulate dynamics: the devil is in the detail. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 357:1285-1298.
- Crawley, M. J. 2007. The R Book. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Crowe, M. A. 2011. Reproduction, Events and Management: Estrous Cycles: Characteristics. Páginas 948-953 en P. F. Fox y P. L. H. McSweeney, editores. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second Edition. Academic Press.
- Decesare, N. J., M. Hebblewhite, M. Bradley, K. G. Smith, D. Hervieux, y L. Neufeld. 2012. Estimating ungulate recruitment and growth rates using age ratios. *Journal of Wildlife Management* 76:144-153.
- De Lamo, D., J. L. Garrido, y Z. Kovacs. 1982. Población y parámetros reproductivos del guanaco. (*Lama guanicoe*, Müller Camelidae-Mammalia). Centro Nacional Patagónico-CONICET.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. González, M. Tablada, y C. W. Robledo. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Donadio, E., S. W. Buskirk, y A. J. Novaro. 2012. Juvenile and adult mortality patterns in a vicuña (*Vicugna vicugna*) population. *Journal of Mammalogy* 93:1536-1544.

- Duncan, C., A. L. M. Chauvenet, M. E. Brown, y N. Pettorelli. 2015. Energy availability, spatio-temporal variability and implications for animal ecology. *Diversity and Distributions* 21:290-301.
- Eberhardt, L. E., L. L. Eberhardt, B. L. Tiller, y L. L. Cadwell. 1996. Growth of an isolated elk population. *The Journal of Wildlife Management* 60:369-373.
- Eberhardt, L. L. 1991. Models of ungulate population dynamics. *Rangifer* 7:24.
- Edwards, D. O. N. 1996. Comment : The First Data Analysis Should be Journalistic. *Ecological Applications* 6:1090-1094.
- Ferson, S., L. Ginzburg, y A. Silvers. 1989. Extreme event risk analysis for age-structured populations. *Ecological Modelling* 47:175-187.
- Festa-Bianchet, M., y J. T. Jorgenson. 1998. Selfish mothers: Reproductive expenditure and resource availability in bighorn ewes. *Behavioral Ecology* 9:144-150.
- Festa-Bianchet, M., M. Urquhart, y K. G. Smith. 1994. Mountain goat recruitment: kid production and survival to breeding age. *Canadian Journal of Zoology* 72:22-27.
- Flacke, G. L., F. Schwarzenberger, L. M. Penfold, S. L. Walker, G. B. Martin, R. P. Millar, y M. C. J. Paris. 2017. Characterizing the reproductive biology of the female pygmy hippopotamus (*Choeropsis liberiensis*) through non-invasive endocrine monitoring. *Theriogenology* 102:126-138.
- Fowler, M. E., y P. W. Bravo. 2010. *Medicine and Surgery of Camelids*. Página Medicine and Surgery of Camelids.
- Franklin, B. 1983. Contrasting Socioecologies of South America's Wild Camelids: the Vicuña and the Guanaco. *Advances in the study of mammalian behavior* 7:563-629.
- Franklin, W. L. 1982. Biology, ecology, and relationship to man of the South American camelids. *Mammalian Biology in South America* 6:457-489.
- Franklin, W. L. 1975. Guanacos in Peru. *Oryx* 13:191-202.
- Franklin, W. L., B. M. Fernando, C. F. Bonacic, C. P. Claudio, V. Nicolas, F. B. M, C. C. P, y N. S. V. 1997. Striving to manage patagonia guanacos for sustained use in the grazing agroecosystems of southern Chile. *Wildlife Society Bulletin* 25:65-73.
- Fritz, M. A. 1985. Population dynamics and preliminary estimates of the harvestability of the Patagonian guanaco. Iowa State University.
- Fryxell, J. M., y A. R. E. Sinclair. 1988. Causes and consequences of migration by large herbivores. *Trends in Ecology and Evolution* 3:237-241.
- Gaillard, J.-M. M., R. Andersen, D. Delorme, y J. D. C. C. Linnell. 1998. Family effects on growth and survival of juvenile roe deer. *Ecology* 79:2878-2889.
- Gaillard, J. M., T. Coulson, y M. Festa-Bianchet. 2008. Recruitment. Páginas 2982-2986 *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*. Elsevier Inc.
- Gaillard, J., N. G. Yoccoz, A. Loison, C. Toïgo, M. Festa-Bianchet, N. G. Yoccoz, A. Loison, y C. Toigo. 2000. Temporal variation in fitness components and population dynamics of large herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31:367-393.

- Gandiwa, E., I. M. A. Heitkönig, P. H. C. Eilers, y H. H. T. Prins. 2016. Rainfall variability and its impact on large mammal populations in a complex of semi-arid African savanna protected areas. *Tropical Ecology* 57:163-180.
- Garcés-Restrepo, M. F., y C. A. Saavedra-Rodríguez. 2013. Densidad de ardilla roja (*sciurus granatensis*) en hábitats con diferentes coberturas vegetales en los andes de Colombia. *Mastozoología Neotropical* 20:381–386.
- Garrott, R. A., S. L. Monfort, P. J. White, K. L. Mashburn, y J. G. Cook. 1998. One-sample pregnancy diagnosis in elk using fecal steroid metabolites. *Journal of Wildlife Diseases* 34:126-131.
- Ginzburg, L. R., S. Ferson, y R. Akçakaya. 1990. Reconstructibility of density dependence and the conservative assessment of extinction risks. *Annual Review of ecology and Systematics* 4:63-70.
- Gittleman, J. L., y S. D. Thompson. 1988. Energy allocation in mammalian reproduction. *American zoologist* 28:863-875.
- Gregorio, F. P. 2018. La calidad de la dieta de guanacos silvestres y su influencia sobre mediadores fisiológicos indicadores de la demanda energética. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Gregorio, P. F., A. Panebianco, R. Ovejero Aguilar, P. A. Taraborelli, P. G. Moreno, N. M. Schroeder, L. R. Leggieri, A. A. Marozzi, y P. D. Carmanchahi. 2019. Linking diet quality and energy demand in free-living guanacos: an eco-physiological innovative approach. *Journal of Zoology* 308:243-252.
- Gregorio, P. F., A. Panebianco, A. Rey, y I. Roesler. 2021. Registro de un evento de mortalidad masiva de guanacos silvestres (*Lama guanicoe*) en el noroeste de Santa Cruz, Patagonia Argentina. Página 64 e-jam-21.
- Gelman, A., y J. Hill. 2006. Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models. Cambridge University Press, UK.
- Gonzalez-Polo, M., G. Caballé, y M. J. Mazzarino. 2015. Biomasa y actividad microbiana del suelo en un sistema silvopastoril con pinos en la Patagonia Andina. Páginas 532-536 VII Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles: VII Congreso Internacional Sistemas Agroforestales. INTA, Misiones.
- Graham, L., F. Schwarzenberger, E. Möstl, W. Galama, y A. Savage. 2001. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. *Zoo Biology* 20:227-236.
- Hadfield, J. 2021. MCMC Generalised Linear Mixed Models.
- Halsey, L. G., J. A. Green, S. D. Twiss, W. Arnold, S. J. Burthe, P. J. Butler, S. J. Cooke, D. Grémillet, T. Ruf, O. Hicks, K. J. Minta, T. S. Prystay, C. A. F. Wascher, y V. Careau. 2019. Flexibility, variability and constraint in energy management patterns across vertebrate taxa revealed by long-term heart rate measurements. *Functional Ecology* 33:260-272.
- Halsey, L. G., J. A. Green, S. D. Twiss, W. Arnold, S. J. Burthe, P. J. Butler, S. J. Cooke, D. Grémillet, T. Ruf, O. Hicks, K. J. Minta, T. S. Prystay, C. A. F. Wascher, y V. Careau. 2019. Flexibility, variability and constraint in energy management patterns across vertebrate taxa revealed by long-term heart rate measurements. *Functional Ecology* 33:260-272.

Ecology 33:260-272.

- Hamel, S., S. D. Côté, y M. Festa-bianchet. 2010. Maternal characteristics and environment affect the costs of reproduction in female mountain goats. *Ecology* 91:2034-2043.
- Hatter, I. W., y W. A. Bergerud. 1991. Moose recruitment, adult mortality and rate of change. *Alces* 27:65-73.
- Hebblewhite, M., y E. H. Merrill. 2011. Demographic balancing of migrant and resident elk in a partially migratory population through forage–predation tradeoffs. *Oikos* 120:1860-1870.
- Hodges, J. K., J. L. Brown, y M. Heistermann. 2010. Endocrine monitoring of reproduction and stress. Páginas 447-467 en D. Kleiman, K. V. Thompson, y C. Baer, editores. *Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Hone, J., R. P. Duncan, y D. M. Forsyth. 2010. Estimates of maximum annual population growth rates (rm) of mammals and their application in wildlife management. *Journal of Applied Ecology* 47:507-514.
- Huete, A., K. Didan, T. Miura, E. P. Rodriguez, X. Gao, y L. G. Ferreira. 2002. Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices. *Remote sensing of environment* 83:195-213.
- Hurley, M. A., M. Hebblewhite, y J. Gaillard. 2020. Competition for safe real estate, not food, drives density-dependent juvenile survival in a large herbivore. *Ecology and Evolution* 10:5464-5475.
- Jetz, W., C. Carbone, J. Fulford, y J. H. Brown. 2004. The scaling of animal space use. *Science* 306:266-268.
- Jönsson, K. I. 1997. Capital and Income Breeding as Alternative Tactics of Resource Use in Reproduction. *Oikos* 78:57.
- Johnson, H. E., L. S. Mills, T. R. Stephenson, y J. D. Wehausen. 2010. Population-specific vital rate contributions influence management of an endangered ungulate. *Ecological Applications* 20:1753-1765.
- Kellner, K. F., y R. K. Swihart. 2014. Accounting for imperfect detection in ecology: A quantitative review. *PLoS ONE* 9:e111436.
- Kellner, K. 2015. jagsUI: a wrapper around rjags to streamline JAGS analyses. R package version 1:21.
- Kersey, D. C., y M. Dehnhard. 2014. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *General and Comparative Endocrinology* 203:296-306.
- Kirchner, J. 1995. *Data Analysis Toolkit #5: Uncertainty Analysis and Error Propagation*.
- Kirkpatrick, J. F., D. F. Gudermuth, R. L. Flagan, J. C. McCarthy, y B. L. Lasley. 1993. Remote monitoring of ovulation and pregnancy of yellowstone bison. *The Journal of Wildlife Management* 57:407.
- Knott, K. K., B. M. Roberts, M. A. Maly, C. K. Vance, J. DeBeauchamp, J. Majors, P. Riger, H. DeCaluwe, y A. J. Kouba. 2013. Fecal estrogen, progesterone and glucocorticoid

- metabolites during the estrous cycle and pregnancy in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*): Evidence for delayed implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 11:1.
- Krepisch, V. G., B. F. Polegato, E. S. Zanetti, y J. M. B. Duarte. 2013. Fecal progestins during pregnancy and postpartum periods of captive red brocket deer (*Mazama americana*). *Animal Reproduction Science* 137:62-68.
- Kumar, A., S. Mehrotra, S. S. Dangi, G. Singh, L. Singh, A. S. Mahla, S. Kumar, y K. Nehra. 2013. Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals. *Veterinary World* 6:59-63.
- Lande, R., B. E. Sæther, y S. Engen. 1997. Threshold harvesting for sustainability of fluctuating resources. *Ecology* 78:1341–1350.
- Lasley, B. L., y J. F. Kirkpatrick. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22:23-31.
- Laurian, C., J. P. Ouellet, R. Courtois, L. Breton, S. St-Onge, y S. St-Onge. 2000. Effects of intensive harvesting on moose reproduction. *Journal of Applied Ecology* 37:515-531.
- Lendrum, P. E., C. R. Anderson, K. L. Monteith, J. A. Jenks, y R. T. Bowyer. 2014. Relating the movement of a rapidly migrating ungulate to spatiotemporal patterns of forage quality. *Mammalian Biology* 79:369-375.
- Lubow, B. C., y B. L. Smith. 2004. Population dynamics of the Jackson Elk herd. *Journal of Wildlife Management* 68:810-829.
- Madliger, C. L., y O. P. Love. 2015. The power of physiology in changing landscapes: Considerations for the continued integration of conservation and physiology. *Integrative and Comparative Biology* 55:545-553.
- Madliger, C. L., O. P. Love, K. R. Hultine, y S. J. Cooke. 2018. The conservation physiology toolbox: Status and opportunities. *Conservation Physiology* 6:1-16.
- Mahoney, S. P., y J. A. Schaefer. 2002. Long-term changes in demography and migration of Newfoundland caribou. *Journal of Mammalogy* 83:957-963.
- Majewska, M., G. Panasiewicz, K. Klisch, L. V. M. Olivera, J. M. Mamani, M. M. Abd-Elnaeim, y B. Szafranska. 2009. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family: Transcripts and gene amplicons in camelids. *Reproductive Biology* 9:127-150.
- Månsson, L., J. Ripa, y P. Lundberg. 2007. Time series modelling and trophic interactions: Rainfall, vegetation and ungulate dynamics. *Population Ecology* 49:287-296.
- Marino, A. 2010. Costs and benefits of sociality differ between female guanacos living in contrasting ecological conditions. *Ethology* 116:999-1010.
- Marino, A., M. Pascual, y R. Baldi. 2014. Ecological drivers of guanaco recruitment: Variable carrying capacity and density dependence. *Oecologia* 175:1189-1200.
- Marino, A., V. Rodríguez, y G. Pazos. 2016. Resource-defense polygyny and self-limitation of population density in free-ranging guanacos. *Behavioral Ecology* 27:757-765.
- Marino, A., V. Rodríguez, y N. M. Schroeder. 2020. Wild guanacos as scapegoat for

- continued overgrazing by livestock across southern Patagonia. *Journal of Applied Ecology* 57:2393-2398.
- Marozzi, A., V. I. Cantarelli, F. M. Gomez, A. Panebianco, L. R. Leggieri, P. Gregorio, M. F. Ponzio, y P. D. Carmanchahi. 2020. A predictive model to diagnose pregnancy in guanacos (*Lama guanicoe*) using non-invasive methods. *Canadian Journal of Zoology* 98:13-20.
- Martínez Carretero, E. 2004. La provincia fitogeográfica de la Payunia. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 39:195-226.
- Mastromonaco, G. F., V. I. Cantarelli, M. G. Galeano, N. S. Bourguignon, C. Gilman, y M. F. Ponzio. 2015. Non-invasive endocrine monitoring of ovarian and adrenal activity in chinchilla (*Chinchilla lanigera*) females during pregnancy, parturition and early post-partum period. *General and Comparative Endocrinology* 213:81-89.
- Mcart, S. H., D. E. Spalinger, W. B. Collins, E. R. Schoen, T. Stevenson, y M. Bucho. 2009. Summer dietary nitrogen availability as a potential bottom-up constraint on moose in south-central Alaska. *Ecology* 90:1400-1411.
- McCormick, S. D., y L. M. Romero. 2017. Conservation endocrinology. *Bioscience* 67:429-442.
- McCullough, D. R. 1992. Concepts of large herbivore population dynamics. Páginas 967-984 *Wildlife 2001: populations*. Springer.
- McCullough, D. R. 1994. In *My Experience: What Do Herd Composition Counts Tell Us?* *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)* 22:295-300.
- Mengoni Goñalons, G. 1995. Importancia socio-económica del guanaco en el período precolombino. Páginas 13-25 *Técnicas para el manejo del Guanaco*. IUCN/SSC South American Camelid SpecialistGroup, *Técnicas Para el Manejo del Guanaco*.
- Millar, J. S. 1977. Adaptive features of mammalian reproduction. *Evolution* 31:370-386.
- Miller, D. L. 2019. Distance Package. <http://github.com/DistanceDevelopment/Distance/>.
- Miller, A., E. Jentz, y C. Duncan. 2021. Progesterone metabolites for use in pregnancy monitoring of 13-lined ground squirrels (*Ictidomys tridecemlineatus*). *Reproduction and Fertility* 2:81-88.
- Miragaya, M. H., M. A. Aba, E. F. Capdevielle, M. S. Ferrer, M. G. Chaves, B. Rutter, y A. Agüero. 2004. Follicular activity and hormonal secretory profile in vicuña (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology* 61:663-671.
- Mithileshwari, C., T. Srivastava, V. Kumar, A. Kumar, y G. Umopathy. 2016. Non-invasive assessment of fecal progestagens and pregnancy detection in Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*). *Theriogenology* 85:216-223.
- Morden, C. C., R. B. Weladji, E. Ropstad, E. Dahl, Ø. Holand, G. Mastromonaco, y M. Nieminen. 2011. Fecal hormones as a non-invasive population monitoring method for reindeer. *The Journal of Wildlife Management* 75:1426-1435.
- Mohr Bell, D., y A. Siebert. 2008. Monitoreo de la sequía en la Provincia de Chubut. CIEFAP, Esquel.
- Monteith, K. L., V. C. Bleich, T. R. Stephenson, B. M. Pierce, M. M. Conner, J. G. Kie, y

- R. T. Bowyer. 2014. Life-history characteristics of mule deer: Effects of nutrition in a variable environment. *Wildlife Monographs*:1-62.
- Monteith, K. L., R. W. Klaver, K. R. Hersey, A. A. Holland, T. P. Thomas, y M. J. Kauffman. 2015. Effects of climate and plant phenology on recruitment of moose at the southern extent of their range. *Oecologia* 178:1137-1148.
- Monteith, K. L., R. A. Long, T. R. Stephenson, V. C. Bleich, R. T. Bowyer, y T. N. Lasharr. 2018. Horn size and nutrition in mountain sheep: Can ewe handle the truth? *Journal of Wildlife Management* 82:67-84.
- Moore, J. E., y J. P. Barlow. 2014. Improved abundance and trend estimates for sperm whales in the eastern North Pacific from Bayesian hierarchical modeling. *Endangered Species Research* 25:141–150.
- Moorman, E. A., S. P. Mendoza, S. E. Shideler, y B. L. Lasley. 2002. Excretion and measurement of estradiol and progesterone metabolites in the feces and urine of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *American Journal of Primatology* 57:79–90.
- Morellet, N., C. Bonenfant, L. Börger, F. Ossi, F. Cagnacci, M. Heurich, P. Kjellander, J. D. C. Linnell, S. Nicoloso, P. Sustr, F. Urbano, y A. Mysterud. 2013. Seasonality, weather and climate affect home range size in roe deer across a wide latitudinal gradient within Europe. *Journal of Animal Ecology* 82:1326-1339.
- Moreno, P. G., N. M. Schroeder, P. A. Taraborelli, P. Gregorio, P. D. Carmanchahi, y P. M. Beldomenico. 2015. La comunidad de parásitos gastrointestinales de guanacos silvestres (*Lama guanicoe*) de la reserva provincial la payunia, mendoza, argentina. *Mastozoología Neotropical* 22:63-71.
- Moreno, P. G. 2014. Factores asociados a parasitismo gastrointestinal en guanacos silvestres (*Lama guanicoe*). *Mastozoología Neotropical* 21:187-188.
- Moseley, G. 1993. Intake and Digestion of Conserved and Grazed Herbage Diets by Guanaco. Páginas 135–146 *en* M. Gerken y C. Renieri, editores. European Symposium on South American Camelids. Bonn.
- Mueller, T., K. A. Olson, G. Dressler, P. Leimgruber, T. K. Fuller, C. Nicolson, A. J. Novaro, M. J. Bolgeri, D. Wattles, S. DeStefano, J. M. Calabrese, y W. F. Fagan. 2011. How landscape dynamics link individual- to population-level movement patterns: a multispecies comparison of ungulate relocation data. *Global Ecology and Biogeography* 20:683-694.
- Munro, C. J., y B. L. Lasley. 1988. Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. *Progress in clinical and biological research* 285:289-329.
- Munro, C. J., G. H. Stabenfeldt, J. R. Cragun, L. A. Addiego, J. W. Overstreet, y B. L. Lasley. 1991. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Clinical chemistry* 37:838-844.
- Nadeem, K., J. E. Moore, Y. Zhang, y H. Chipman. 2016. Integrating population dynamics models and distance sampling data: A spatial hierarchical state-space approach. *Ecology* 97:1735-1745.
- Nabte, M. J., A. I. Marino, M. V Rodríguez, A. Monjeau, y S. L. Saba. 2013. Range

- Management Affects Native Ungulate Populations in Península Valdés, a World Natural Heritage. *PLoS ONE* 8:55655.
- Nagl, A., N. Kneidinger, K. Kiik, H. Lindeberg, T. Maran, y F. Schwarzenberger. 2015. Noninvasive monitoring of female reproductive hormone metabolites in the endangered European mink (*Mustela lutreola*). *Theriogenology* 84:1472-1481.
- Náhlik, A., y G. Sándor. 2003. Birth rate and offspring survival in a free-ranging wild boar (*Sus scrofa*) population. *Wildlife Biology* 9:37-42.
- Norris, D. O., y J. A. Carr. 2013. *Vertebrate Endocrinology*. (M. Conner y M. Wickline, Eds.). Fifth edition. Elsevier.
- Ojeda, R., y M. A. Mares. 1982. Conservation of South American Mammals. Páginas 523-524 *Mammalian Biology in South America*.
- Oliva, G., J. Gaitan, y D. Ferrante. 2016. Humans cause deserts: Evidence of irreversible changes in argentinian patagonia rangelands. Páginas 363-386 *The End of Desertification?* Springer, Berlin, Heidelberg.
- Oliva, G., P. Paredes, D. Ferrante, C. Cepeda, y J. Rabinovich. 2019. Remotely sensed primary productivity shows that domestic and native herbivores combined are overgrazing Patagonia. *Journal of Applied Ecology* 56:1575-1584.
- Ortega, I. 1985. Social organization and ecology of a migratory guanaco population in southern Patagonia. Iowa State University.
- Ortega, I., y W. L. Franklin. 1995. Social organization, distribution and movements of a migratory guanaco. *Revista Chilena de Historia Natural* 68:489-500.
- Ovejero, R., A. Novillo, M. Soto-Gamboa, M. E. Mosca-Torres, P. Cuello, P. Gregório, G. Jahn, y P. Carmanchahi. 2013. Do cortisol and corticosterone play the same role in coping with stressors? Measuring glucocorticoid serum in free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 319:539-547.
- Owen-Smith, N., y D. R. Mason. 2005. Comparative changes in adult vs. juvenile survival affecting population trends of African ungulates. *Journal of Animal Ecology* 74:762-773.
- Palme, R. 2005. Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046:75-80.
- Palme, R. 2014. Measuring faecal steroid metabolites with enzyme immunoassays (EIA) on microtitre plates using biotinylated steroids as labels.
- Palme, R., S. Rettenbacher, C. Touma, S. M. El-Bahr, y E. Möstl. 2005. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040:162-171.
- Panebianco, A. 2019. Aspectos comportamentales y fisiológicos involucrados en la sociabilidad de guanacos silvestres. Universidad de Buenos Aires.
- Parker, K. L., P. S. Barboza, y M. P. Gillingham. 2009. Nutrition integrates environmental responses of ungulates. *Functional Ecology* 23:57-69.

- Paterson, T. J., K. Proffitt, J. Rotella, y R. Garrott. 2019. An improved understanding of ungulate population dynamics using count data: Insights from western Montana. *PLoS ONE* 14:1-26.
- Pauli, J. N., J. P. Whiteman, M. D. Riley, y A. D. Middleton. 2010. Defining noninvasive approaches for sampling of vertebrates. *Conservation Biology* 24:349-352.
- Pedrana, J., A. Rodríguez, J. Bustamante, A. Travaini, y J. I. Zanón Martínez. 2009. Failure to estimate reliable sex ratios of guanaco from road-survey data. *Canadian Journal of Zoology* 87:886–894.
- Pedrana, J., J. Bustamante, A. Travaini, y A. Rodríguez. 2010. Factors influencing guanaco distribution in southern Argentine Patagonia and implications for its sustainable use. *Biodiversity and Conservation* 19:3499-3512.
- Pedrana, J., A. Rodríguez, J. Bustamante, A. Travaini, y J. I. Zanón Martínez. 2009. Failure to estimate reliable sex ratios of guanaco from road-survey data. *Canadian Journal of Zoology* 87:886–894.
- Pedrana, J., A. Travaini, J. I. Zanón, S. C. Zapata, A. Rodríguez, y J. Bustamante. 2019. Environmental factors influencing guanaco distribution and abundance in central Patagonia, Argentina. *Wildlife Research* 46:1-11.
- Pereira, R. J. G., B. F. Polegato, S. De Souza, J. A. Negrão, y J. M. B. Duarte. 2006. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. *Theriogenology* 65:387-399.
- Pettorelli, N., F. Pelletier, A. Von Hardenberg, M. Festa-Bianchet, y S. D. Côté. 2007. Early onset of vegetation growth vs. rapid green-up: impacts on juvenile mountain ungulates. *Ecology* 88:381-390.
- Pfister, C. A. 1998. Patterns of variance in stage-structured populations: evolutionary predictions and ecological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:213-218.
- Pinilla, L., E. Aguilar, C. Dieguez, R. P. Millar, y M. Tena-Sempere. 2012. Kisspeptins and reproduction: Physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* 92:1235-1316.
- Pierce, B. M., V. C. Bleich, K. L. Monteith, y R. T. Bowyer. 2012. Top-down versus bottom-up forcing: evidence from mountain lions and mule deer. *Journal of Mammalogy* 93:977-988.
- Plant, T. M. 2015. 60 years of neuroendocrinology: The hypothalamo-pituitary–gonadal axis. *Journal of Endocrinology* 226:T41-T54.
- Pratt, M. S., y P. S. Hopkins. 1975. The diagnosis of pregnancy in sheep by abdominal palpation. *Australian veterinary journal* 51:378-380.
- Puig, S. 1987. Ecología poblacional del guanaco (*Lama guanicoe*, Camelidae, Artiodactyla) en la reserva provincial de la Payunia, Mendoza. Universidad de Buenos Aires.
- Puig, S., M. I. Rosi, F. Videla, y E. Mendez. 2011. Summer and winter diet of the guanaco and food availability for a High Andean migratory population (Mendoza, Argentina). *Mammalian Biology* 76:727-734.

- Puig, S., F. Videla, y M. I. Cona. 1997. Diet and abundance of the guanaco (*Lama guanicoe* Muller 1776) in four habitats of northern Patagonia, Argentina. *Journal of Arid Environments* 36:343-357.
- Purohit, G. 2010. Methods of pregnancy diagnosis in domestic animals: The current status. *Review Literature And Arts Of The Americas* 1:1-26.
- Quinn, T. J. 2013. Population. *Encyclopedia of Environmetrics*. John Wiley & Sons, Ltd.
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rabiee, A. R., D. Dalley, J. M. Borman, K. L. Macmillan, y F. Schwarzenberger. 2002. Progesterone clearance rate in lactating dairy cows with two levels of dry matter and metabolisable energy intakes. *Animal reproduction science* 72:11-25.
- Rabinovich, J. E., y M. Zubillaga. 2011a. Modelo de manejo de poblaciones de guanacos para la Provincia del Chubut. Segundo Informe de Avance. La Plata.
- Rabinovich, J. E., y M. Zubillaga. 2011b. Modelo de manejo de poblaciones de guanacos para la Provincia del Chubut. Primer informe de Avance. La Plata.
- Rabinovich, J. E., y M. Zubillaga. 2012. Modelo de manejo de poblaciones de guanacos para la Provincia del Chubut. Informe Final. La Plata.
- Raedeke, K. J. 1979. Population dynamics and socioecology of the guanaco (*Lama guanicoe*) of Magallanes, Chile. University of Washington.
- Rattenbury, K. L., J. H. Schmidt, D. K. Swanson, B. L. Borg, B. A. Mangipane, y P. J. Sousanes. 2018. Delayed spring onset drives declines in abundance and recruitment in a mountain ungulate. *Ecosphere* 9:1-15.
- Richard Morey, M. D. 2018. Package «BayesFactor» Title Computation of Bayes Factors for Common Designs.
- Rextad, E. 2020. Solving the size bias problem. <http://examples.distancesampling.org/Distance-groupsize/Remedy-size-bias-for-dolphin-surveys.html>. Consultada: septiembre 2020.
- Ricker, W. E. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. Página (P. H. D. J. C. Stevenson, Ed.). DEPARTMENT OF THE ENVIRONMENT FISHERIES AND MARINE SERVICE, Ottawa.
- Riveros, J. L., G. Schuler, C. Bonacic, B. Hoffmann, M. G. Chaves, y B. Urquieta. 2010. Ovarian follicular dynamics and hormonal secretory profiles in guanacos (*Lama guanicoe*). *Animal Reproduction Science* 119:63-67.
- Riveros, J. L., G. Schuler, B. Urquieta, B. Hoffmann, y C. Bonacic. 2015. Ovarian follicular activity during late gestation and postpartum in guanaco (*Lama guanicoe*). *Reproduction in Domestic Animals* 50:129-134.
- Riveros, J. L., B. Urquieta, C. Bonacic, B. Hoffmann, F. Bas, y G. Schuler. 2009. Endocrine changes during pregnancy, parturition and post-partum in guanacos (*Lama guanicoe*). *Animal Reproduction Science* 116:318-325.
- Rolandsen, C. M., E. J. Solberg, B. Sæther, B. Van Moorter, I. Herfindal, y K. Bjørneraas. 2017. On fitness and partial migration in a large herbivore–migratory moose have

- higher reproductive performance than residents. *Oikos* 126:547-555.
- Romero, L. M., M. J. Dickens, y N. E. Cyr. 2009. The reactive scope model - A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Hormones and Behavior* 55:375-389.
- RüfII, I., C. Gurtner, W. U. Basso, B. Vidondo, G. Hirsbrunner, y P. Zanolari. 2021. Causes of Abortions in South American Camelids in Switzerland — Cases and Questionnaire. *Animals* 11:1-12.
- Rughetti, M., M. Festa-Bianchet, S. D. Côté, y S. Hamel. 2017. Ecological and evolutionary effects of selective harvest of non-lactating female ungulates. *Journal of Applied Ecology* 54:1571-1580.
- Ruiz Blanco, M., E. Donadio, A. Panebianco, C. Gelabert, M. Zubillaga, P. Gregorio, G. Verta, A. Le Roy, Montero M., A. Castro, L. Aros, L. Quiroga, E. Soto, A. Soto, y A. J. Novaro. 2014. Supervivencia y causas de mortalidad durante el primer año de vida de guanacos en el norte de Patagonia. Página 2014 *en* SAREM, editor. XXVII Jornadas Argentinas de Mastozoología. Esquel.
- Russell, D. E., K. L. Gerhart, R. G. White, y D. Van De Wetering. 1998. Detection of early pregnancy in caribou: Evidence for embryonic mortality. *The Journal of Wildlife Management* 62:1066.
- Sæther, B.-E. E., S. Engen, y E. Matthysen. 2002. Demographic characteristics and population dynamical patterns of solitary birds. *Science* 295:2070-2073.
- Sarno, R. J., W. R. Clark, M. S. Bank, W. S. Prexl, M. J. Behl, W. E. Johnson, W. L. Franklin, W. E. Johnson, y W. L. Franklin. 1999. Juvenile guanaco survival: management and conservation implications. *Journal of Applied Ecology* 36:937-945.
- SAyDS. 2019. Plan Nacional de Manejo Sostenible de Guanacos. Buenos Aires. Resol. 243/2019.
- Schoenecker, K. A., R. O. Lyda, y J. Kirkpatrick. 2004. Comparison of three fecal steroid metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Journal of Wildlife Diseases* 40:273-281.
- Schroeder, N. M. 2013. Interacción entre el guanaco (*Lama guanicoe*) y herbívoros domésticos en el paisaje de La Payunia (sur de Mendoza, Argentina). Universidad Nacional de Cuyo.
- Schroeder, N. M., A. González, M. Wisdom, R. Nielson, M. M. Rowland, y A. J. Novaro. 2018. Roads have no effect on guanaco habitat selection at a Patagonian site with limited poaching. *Global Ecology and Conservation* 14:e00394.
- Schroeder, N. M., S. D. Matteucci, P. G. Moreno, P. Gregorio, R. Ovejero, P. Taraborelli, y P. D. Carmanchahi. 2014. Spatial and seasonal dynamic of abundance and distribution of guanaco and livestock: Insights from using density surface and null models. *PloS one* 9:e85960.
- Schroeder, N. M., R. Ovejero, P. G. Moreno, P. Gregorio, P. Taraborelli, S. D. Matteucci, y P. D. Carmanchahi. 2013. Including species interactions in resource selection of guanacos and livestock in Northern Patagonia. *Journal of Zoology* 291:213-225.
- Schoenecker, K. A., R. O. Lyda, y J. Kirkpatrick. 2004. Comparison of three fecal steroid

- metabolites for pregnancy detection used with single sampling in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Journal of Wildlife Diseases* 40:273-281.
- Schwarzenberger, F. 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook* 41:52-74.
- Schwarzenberger, F., y J. L. Brown. 2013. Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 100:209-225.
- Schwarzenberger, F., E. Most, E. Bamberg, J. Pammer, y O. SchrnehlikrL. 1991. Concentrations of progestagens and oestrogens in the faeces of pregnant Lipizzan, Trotter and Thoroughbred. *Journal of Reproduction and Fertility*.
- Schwarzenberger, F., E. Möstl, R. Palme, y E. Bamberg. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 42:515-526.
- Schwarzenberger, F., W. Rietschel, J. Vahala, D. Holeckova, P. Thomas, J. Maltzan, K. Baumgartner, y W. Schaftenaar. 2000. Fecal progesterone, estrogen, and androgen metabolites for noninvasive monitoring of reproductive function in the female Indian rhinoceros, (*Rhinoceros unicornis*). *General and Comparative Endocrinology* 119:300-307.
- Schwarzenberger, F., G. Speckbacher, E. Bamberg, G. Speckbacherl, E. Barnberg, V. Universitat, y L. Bahngasse. 1995. Plasma and fecal progestagen evaluations during and after the breeding season of the female vicuna (*Vicuna vicuna*). *Theriogenology* 43:625-634.
- Scornavacca, D., S. Lovari, A. Cotza, S. Bernardini, C. Brunetti, V. Pietrocini, y F. Ferretti. 2016. Pasture Quality Affects Juvenile Survival through Reduced Maternal Care in a Mountain-Dwelling Ungulate. *Ethology* 122:807-817.
- Scott, N. J., y R. A. Seigel. 1992. The management of amphibian and reptile populations: species priorities and methodological and theoretical constraints. Páginas 343-368 *Wildlife 2001: populations*. Springer.
- Senseman, R. 2002. ADW: *Cervus elaphus*: INFORMATION. https://animaldiversity.org/accounts/Cervus_elaphus/. Consultada: octubre 2021.
- Shaw, A. K., J. L. Galaz, y P. A. Marquet. 2012. Population dynamics of the vicuña (*Vicugna vicugna*): Density-dependence, rainfall, and spatial distribution. *Journal of Mammalogy* 93:658-666.
- Shahin, M., M. Friedrich, M. Gaulty, J. F. Beckers, y W. Holtz. 2013. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera. *Small Ruminant Research* 113:141-144.
- Shea, S. M. ., T. A. . Breault, y Morgan L . Richardson. 1992. Herd Density and Physical Condition of White-Tailed Deer in Florida Flatwoods. *The Journal of Wildlife Management* 56:262-267.
- Sibly, R. M., D. Barker, M. C. Denham, J. Hone, y M. Pagel. 2005. On the regulation of populations of mammals, birds, fish, and insects. *Science* 309:607-610.
- Sibly, R. M., J. Hone, T. H. Clutton-Brock, A. R. E. Sinclair, y C. J. Krebs. 2002. Complex

- numerical responses to top down and bottom up processes in vertebrate populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 357:1221-1231.
- Singh, N. J., L. Börger, H. Dettki, N. Bunnefeld, y G. Ericsson. 2012. From migration to nomadism: Movement variability in a northern ungulate across its latitudinal range. *Ecological Applications* 22:2007-2020.
- Sinclair, A. R. E., y C. J. Krebs. 2002. Complex numerical responses to top–down and bottom–up processes in vertebrate populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 357:1221-1231.
- Soetaert, K., y P. M. J. Herman. 2009. *A practical guide to ecological modelling*. Springer, The Netherlands.
- Sontakke, S. D. 2018. Monitoring and controlling ovarian activities in wild ungulates. *Theriogenology* 109:31-41.
- Stanton, J. M. 2017. *Reasoning with Data: An Introduction to Traditional and Bayesian Statistics Using R*. Guilford Publications.
- Stephens, P. A., I. L. Boyd, J. M. Mcnamara, y L. I. Houston. 2009. Capital breeding and income breeding: their meaning, measurement, and worth. *American Naturalist* 90:2057-2067.
- Stephens, P. A., A. I. Houston, K. C. Harding, I. L. Boyd, y J. M. McNamara. 2014. Capital and income breeding: the role of food supply. *Ecology* 95:882-896.
- Stornelli, M. A. 2007. Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. *revista Brasileira de Reproducción Animal* 31:71-76.
- Subbey, S., J. A. Devine, U. Schaarschmidt, y R. D. M. Nash. 2014. Modelling and forecasting stock–recruitment: current and future perspectives. *ICES Journal of Marine Science* 71:2307-2322.
- Sumar, J. B. 1994. Reproduction in llamas and alpacas: A review. *Theriogenology* 41:573-592.
- Tibary, A., y J. L. Vaughan. 2006. Reproduction in female South American camelids. *Small Ruminant Research* 47:167-179.
- Travaini, A., S. C. Zapata, J. Bustamante, J. Pedrana, J. I. Zanón, y A. Rodríguez. 2015. Guanaco abundance and monitoring in southern patagonia: Distance sampling reveals substantially greater numbers than previously reported. *Zoological Studies* 54.
- Tveraa, T., P. Fauchald, N. Gilles Yoccoz, R. Anker Ims, R. Aanes, y K. Arild Høgda. 2007. What regulate and limit reindeer populations in Norway? *Oikos* 116:706-715.
- Tveraa, T., A. Stien, B.-J. Bårdsen, y P. Fauchald. 2013. Population densities, vegetation green-up, and plant productivity: impacts on reproductive success and juvenile body mass in reindeer. *PloS one* 8:e56450.
- Tubbs, C. W., y C. E. McDonough. 2018. Reproductive impacts of endocrine-disrupting chemicals on wildlife species: Implications for conservation of endangered species. *Annual Review of Animal Biosciences* 6:287-304.
- Urivola García, A. P., y J. L. Riveros. 2017. Modulating factors of reproductive seasonality

- in ungulates. *Revista de Investigaciones Altoandinas* 19:319-336.
- Valenzuela-Molina, M., S. Atkinson, K. Mashburn, D. Gendron, y R. L. Brownell Jr. 2018. Fecal steroid hormones reveal reproductive state in female blue whales sampled in the Gulf of California, Mexico. *General and comparative endocrinology* 261:127-135.
- Vaughan, J. 2011. Ovarian function in South American camelids (alpacas, llamas, vicunas, guanacos). *Animal reproduction science* 124:237-243.
- Vaughan, J. L., y A. Tibary. 2006. Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research* 61:259-281.
- Venables, W. N., y D. M. Smith. 2017. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing* 3.
- Viana, D. S., J. E. Granados, P. Fandos, J. M. Pérez, F. J. Cano-Manuel, D. Burón, G. Fandos, M. Ángeles, P. Aguado, J. Figuerola, y R. C. Soriguer. 2018. Linking seasonal home range size with habitat selection and movement in a mountain ungulate. *Movement Ecology* 6:1-11.
- Vilá, B. L. 2012. *Camélidos sudamericanos*. Página (Eudeba, Ed.).
- Villamuelas, M., N. Fernández, E. Albanell, A. Gálvez-Cerón, J. Bartolomé, G. Mentaberre, J. R. López-Olvera, X. Fernández-Aguilar, A. Colom-Cadena, J. M. López-Martín, J. Pérez-Barbería, M. Garel, I. Marco, y E. Serrano. 2016. The Enhanced Vegetation Index (EVI) as a proxy for diet quality and composition in a mountain ungulate. *Ecological Indicators* 61:658-666.
- Vors, L. S., y M. S. Boyce. 2009. Global declines of caribou and reindeer. *Global change biology* 15:2626-2633.
- Wallace, C. S. A., R. H. Webb, y K. A. Thomas. 2008. Estimation of perennial vegetation cover distribution in the Mojave Desert using MODIS-EVI data. *GIScience and Remote Sensing* 45:167-187.
- White, G. C., y R. M. Bartmann. 1997. Mule deer management - what should be monitored? *Deer/Elk Workshop - Arizona*:104-118.
- White, P. J., R. A. Garrott, J. F. Kirkpatrick, y E. V. Berkeley. 1995. Diagnosing pregnancy in free-ranging elk using fecal steroid metabolites. *Journal of wildlife diseases* 31:514-522.
- Wiegand, T., J. Naves, M. F. Garbulsky, y N. Fernández. 2008. Animal habitat quality and ecosystem functioning: Exploring seasonal patterns using NDVI. *Ecological Monographs* 78:87-103.
- Wikelski, M., y S. J. Cooke. 2006. *Conservation physiology*. Elsevier Current Trends.
- Wilcox, R. R. 1977. Estimating the likelihood of false-positive and false-negative decisions in mastery testing: An empirical Bayes approach. *Journal of Educational Statistics* 2:289-307.
- Williams, C. T., M. Klaassen, B. M. Barnes, C. L. Buck, W. Arnold, S. Giroud, S. G. Vetter, y T. Ruf. 2017. Seasonal reproductive tactics: Annual timing and the capital-to-income breeder continuum. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372.

- Wittmer, H. U., R. N. M. M. Ahrens, y B. N. McLellan. 2010. Viability of mountain caribou in British Columbia, Canada: Effects of habitat change and population density. *Biological Conservation* 143:86-93.
- Wittmer, H. U., B. N. McLellan, D. R. Seip, J. A. Young, T. A. Kinley, G. S. Watts, y D. Hamilton. 2005. Population dynamics of the endangered mountain ecotype of woodland caribou (*Rangifer tarandus caribou*) in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Zoology* 83:407-418.
- Yacobaccio, H. D., y B. L. Vilá. 2013. La domesticación de los camélidos andinos como proceso de interacción humana y animal. *Intersecciones en antropología* 14:227-238.
- Young, J. K., y W. L. Franklin. 2004a. Activity budget patterns in family-group and solitary territorial male guanacos. *Revista Chilena de Historia Natural* 77:617-625.
- Young, J. K., y W. L. Franklin. 2004b. Territorial fidelity of male guanacos in the Patagonia of southern Chile. *Journal of Mammalogy* 85:72-78.
- Zapata, B., L. Correa, M. Soto-Gamboa, E. Latorre, B. A. González, y L. A. Ebensperger. 2010. Allosuckling allows growing offspring to compensate for insufficient maternal milk in farmed guanacos (*Lama guanicoe*). *Applied Animal Behaviour Science* 122:119-126.
- Zapata, B., G. Gaete, L. A. Correa, B. A. González, y L. A. Ebensperger. 2009a. A case of allosuckling in wild guanacos (*Lama guanicoe*). *Journal of Ethology* 27:295-297.
- Zapata, B., B. A. González, y L. A. Ebensperger. 2009b. Allonursing in captive guanacos, (*Lama guanicoe*): milk theft or misdirected parental care? *Ethology* 115:731-737.
- Ziegler, T. E., S. A. Sholl, G. Scheffler, M. A. Haggerty, y B. L. Lasley. 1989. Excretion of estrone, estradiol, and progesterone in the urine and feces of the female cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus oedipus*). *American Journal of Primatology* 17:185-195.
- Zubillaga, M., O. Skewes, N. Soto, y J. E. Rabinovich. 2018. How density-dependence and climate affect guanaco population dynamics. *Ecological Modelling* 385:189-196.
- Zubillaga, M., O. Skewes, N. Soto, J. E. Rabinovich, y F. Colchero. 2014. Bayesian inference on the effect of density dependence and weather on a guanaco population from Chile. *PLoS ONE* 9:1-17.

A predictive model to diagnose pregnancy in guanacos (*Lama guanicoe*) using non-invasive methods

A. Marozzi, V.I. Cantarelli, F.M. Gomez, A. Panebianco, L.R. Leggieri, P. Gregorio, M.F. Ponzio, and P.D. Carmanchahi

Abstract: Pregnancy status is usually not included in ecological studies because it is difficult to evaluate. The use of non-invasive methods to determine pregnancy, without physically restraining individuals, would enable pregnancy to be included in population studies. In this study, we evaluated sex steroid hormones in plasma and fecal samples from pregnant and non-pregnant females to develop a pregnancy predictive model for guanacos (*Lama guanicoe* (Müller, 1776)). Samples were obtained during live-shearing management (i.e., capture, shear, and release) of guanacos. Enzyme immunoassays were used to evaluate progesterone (P4) and estradiol (E2) concentrations in plasma and pregnanediol glucuronides (PdG) and conjugated estrogens (EC) in feces. Mean hormonal and fecal metabolite concentrations were significantly higher in pregnant females than in non-pregnant females. A linear relationship was found between each hormone and its fecal metabolite. Finally, hormonal data were combined with an independent source of pregnancy diagnosis such as abdominal ballottement to develop a logistic regression model to diagnose pregnancy in non-handled individuals. The use of predictive models and non-invasive methods might be suitable to incorporate pregnancy information in large-scale population studies on guanaco and other free-ranging ungulates.

Key words: fecal metabolites, logistic regression model, enzyme immunoassay, non-invasive methods, wildlife management, *Lama guanicoe*, guanaco.

Résumé : L'état de gestation n'est généralement pas inclus dans les études écologiques en raison de la difficulté que présente son évaluation. L'utilisation de méthodes non effractives pour déterminer l'état de gestation sans imposer de restriction physique aux spécimens permettrait l'intégration de l'état de gestation aux études démographiques. Nous avons évalué les hormones stéroïdiennes sexuelles dans des échantillons de plasma et de fèces de femelles gravides et non gravides afin d'élaborer un modèle pour prédire l'état de gestation chez les guanacos (*Lama guanicoe* (Müller, 1776)). Des échantillons ont été prélevés durant la gestion de la tonte (c.-à-d., capture, tonte et lâcher) de guanacos vivants. Des épreuves immunoenzymatiques ont été utilisées pour évaluer les concentrations de progestérone (P4) et d'estradiol (E2) dans le plasma et de glucuronides de prégnandiol (GdP) et d'estrogènes conjugués (EC) dans les fèces. Les concentrations moyennes de métabolites hormonaux et fécaux étaient significativement plus grandes chez les femelles gravides que chez les femelles non gravides. Une relation linéaire est relevée entre chaque hormone et ses métabolites fécaux. Enfin, les données hormonales ont été combinées à une épreuve diagnostique de l'état de gestation indépendante comme le ballottement abdominal afin de produire un modèle de régression logistique pour diagnostiquer la gestation chez des spécimens non manipulés. L'utilisation de modèles prédictifs et de méthodes non effractives pourrait se prêter à l'intégration d'information sur la gestation dans des études démographiques à grande échelle sur les guanacos et d'autres ongulés vivant en liberté. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : métabolites fécaux, modèle de régression logistique, épreuve immunoenzymatique, méthodes non effractives, gestion de la faune, *Lama guanicoe*, guanaco.

Introduction

Monitoring the reproductive status of ungulate populations is important for demographic studies and for management decisions (Kersey and Dehnhard 2014). Pregnancy assessment in free-ranging animals is key to estimate population dynamics such as birth rates, neonate survival, and population recruitment rates (Altmann et al. 2004; Burgess et al. 2012). Traditionally, the evaluation of pregnancy diagnosis requires capture and physical restraint of individuals, which makes it difficult to apply to free-ranging wildlife populations. Some of the most commonly used methods to assess pregnancy include ultrasonography, fetal echo-

cardiography, laparoscopy, and abdominal ballottement (Purohit 2010). During the last decade, non-invasive monitoring methods using fecal metabolites of sex hormones have been developed (Bamberg et al. 1991; Schwarzenberger et al. 1991), which have contributed greatly to improving the knowledge of other disciplines such as ecology and behavior. Steroid hormones are resistant to degradation, and consequently, their metabolites are stable and can be easily quantified in laboratory assays even after periods of long storage (Lasley and Kirkpatrick 1991; Kersey and Dehnhard 2014).

Measurements of blood concentrations of reproductive hormones such as estradiol (E2) and progesterone (P4) might be a

Received 5 April 2019. Accepted 24 August 2019.

A. Marozzi, A. Panebianco, L.R. Leggieri, P. Gregorio, and P.D. Carmanchahi. Grupo de Investigación de Eco-Fisiología de Fauna Silvestre (GIEFAS), INIBIOMA, CONICET, AUSMA, UNCo, Pasaje de la Paz 235, 8370 San Martín de los Andes, Neuquén, Argentina.

V.I. Cantarelli and M.F. Ponzio. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Santa Rosa 1085, X5000ESU Córdoba, Argentina.

F.M. Gomez. Universidad Nacional del Comahue (UNCo), CONICET, AUSMA, Pasaje de la Paz 235, 8370 San Martín de los Andes, Neuquén, Argentina.

Corresponding author: Antonela Marozzi (email: antomarozzi@comahue-conicet.gob.ar).

Copyright remains with the author(s) or their institution(s). Permission for reuse (free in most cases) can be obtained from [RightsLink](https://www.rightslink.com).

valuable tool to evaluate the number of reproductive individuals in a population, the age of reproductive maturation, the timing of breeding, and breeding success (Kumar et al. 2013; Kersey and Dehnhard 2014; McCormick and Romero 2017). These hormones also can be used as indicators of pregnancy state. In general, P4 and E2 levels increase during pregnancy and drop after parturition (Schwarzenberger et al. 1991, 1996; Graham et al. 2001; Kersey and Dehnhard 2014), yet their concentrations and release patterns during pregnancy are distinctive in each species. Fecal metabolites of estrogen consist mainly of estrone, estradiol-17 α , and estradiol-17 β . Progesterone is extensively metabolized prior to fecal excretion and its fecal metabolites consist of several 5 α - and 5 β -pregnanones (Bamberg et al. 1991; Schwarzenberger et al. 1991, 1996, 1997).

Most studies involving pregnancy diagnosis using non-invasive methods in wild mammals compare the mean concentrations of pregnanediol glucuronides (PdG) and conjugated estrogens (EC) in pregnant and non-pregnant females (Schwarzenberger et al. 1995; Garcia Pereira et al. 2006; Burgess et al. 2012; Krepschi et al. 2013; Kumar et al. 2013; Valenzuela-Molina et al. 2018). An alternative method to evaluate pregnancy in wild populations is to develop a predictive model under controlled conditions (Cain et al. 2012). Hence, this approach allows the inclusion of pregnancy rates in demographic studies, which would increase our understanding of population dynamics. Furthermore, estimating pregnancy rates in free-ranging ungulates is important for management strategies such as game hunting, population control, species conservation actions, and sustainable use (Morden et al. 2011; Mithileshwari et al. 2016).

In South America, the guanaco (*Lama guanicoe* (Müller, 1776)) is a widely distributed, wild ungulate that is subject to handling to obtain its high-quality wool through capture, shear, and release of wild individuals (live-shearing management; Carmanchahi et al. 2011). The guanaco is an induced ovulator; therefore, E2 concentration peaks during follicular recruitment, but P4 concentration only rises after copulation (Riveros et al. 2010; Fowler 2011; Vaughan 2011; Brown 2018). Several studies involving guanaco reproductive physiology were performed using invasive methods on captive animals (Riveros et al. 2009, 2010; Tibary 2018). However, to extend reproductive studies to wild populations, it will be necessary to apply non-invasive methods.

In this work, we determined P4 and E2 plasma concentrations in female guanacos and compared our results with reference values (Riveros et al. 2009). We then evaluated differences in mean concentrations of P4, as well as E2, between pregnant and non-pregnant females diagnosed by abdominal ballottement. Finally, we used this information to evaluate parallel fluctuations in fecal metabolite (PdG and EC) concentrations to develop a predictive model of non-invasive pregnancy diagnosis that can be used on wild populations.

Materials and methods

Ethical statement

All studies performed with animals were carried out in accordance with the “Good practices protocol of wild guanaco (*Lama guanicoe*) management” (Carmanchahi and Marull 2012), which is consistent with the “Guide to care and use of experimental animals” of the Canadian Council on Animal Care (Canadian Council on Animal Care 1993).

Study area

This study was performed in two different field sites. The first field site is La Payunia Provincial Reserve (Mendoza province, Argentina; 36°00'S, 68°34'W). Its surface area is approximately 4500 km². Mean temperatures range between 6 °C in winter and 20 °C in summer, with a mean annual precipitation of 255 mm (Martínez Carretero 2004). The area has a transition volcanic

environment between Patagonian steppe and Monte (Martínez Carretero 2004). Vegetation is flat and with mid-coverage (Candia et al. 1993). La Payunia Reserve contains one of the few remaining migratory guanaco populations in Argentina (Bolgeri 2016), which is also the biggest wild guanaco population on this region with 26 000 individuals in spring (Schroeder et al. 2014). A small portion of this population (<600 individuals) is subjected to live-shearing management for conservation purposes through sustainable use by the local community (Carmanchahi et al. 2011; Carmanchahi et al. 2015). The second field site is Los Peucos farm (Neuquén province, Argentina; 39°43'S, 71°03'W), which is located in the Patagonian steppe with a surface area of 108 km². Mean temperatures are lower than 10 °C, with a mean annual precipitation of 800 mm (León et al. 1998; Bran et al. 2002). The landscape is mainly formed by hills and the soil predominantly consists of volcanic ash. The vegetation is characterized by a gramineous steppe (Gonzalez-Polo et al. 2015) and by native forest and exotic pine (ponderosa pine, *Pinus ponderosa* Douglas ex P. Lawson & C. Lawson) plantations. The farm contains 400 guanacos in captive conditions that are annually enclosed and sheared for fiber production.

Pregnancy assessment

We evaluated the pregnancy status in 69 female guanacos during live-shearing management, using abdominal ballottement (in both study sites). A female was considered pregnant if we could detect a fetus in its abdomen by applying gentle pressure and manual palpation maneuvers (Pratt and Hopkins 1975; Purohit 2010). Live-shearing activities are usually performed during the spring season, when the fetuses have gestated probably between 9 and 10 months (Fowler 2011). At this point, the fetuses are easily detected by the abdominal ballottement method. Blood and fecal samples were collected then from individual females to measure hormonal concentrations. As live-shearing activities are performed under a strict animal welfare protocol and because handling time is required to be 12 min or less for each animal (Carmanchahi and Marull 2012), we were able to obtain fecal samples from and to assess pregnancy by abdominal ballottement of 69 individuals. From these 69 guanacos, blood samples were obtained from only 31 guanacos. The blood samples were centrifuged in the field and the plasma was separated. Plasma and fecal samples were stored in liquid nitrogen in the field, and upon return to the laboratory, the samples were kept at -20 °C until hormonal analysis.

E2 and P4 determinations in plasma

Total steroids were extracted from 1 mL of plasma using 5 mL of diethyl ether. The extraction procedure was performed twice. The organic phases were then pooled, evaporated, and resuspended in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 (Ovejero et al. 2013). E2 and P4 plasma levels were determined using commercial enzyme immunoassay (EIA) kits (EIA-1561, DRG Progesterone ELISA, DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany; EIA-2693, DRG Estradiol ELISA, DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). Cross-reactivity reported for the E2 EIA kit is 100% estradiol-17 β , 0% 11-deoxycortisol, 0% androstenedione, 0% 21-deoxycortisol, 0% androsterone, 0% dihydrotestosterone, 0% corticosterone, 0% dihydroepiandrosterone, 0% cortisone, 0% 20-dihydroprogesterone, 0% epiandrosterone, 0% 11-hydroxyprogesterone, 0% 16-epiestriol, 0% 17 α -hydroxyprogesterone; 0% estradiol-3-sulfate, 0% 17 α -pregnenolone, 0% estradiol-3-glucuronide, 0% 17 α -progesterone, 0% estradiol-17 α , 0% pregnanediol, 0.05% estriol, 0% pregnanetriol, 0% estriol-16-glucuronide, 0% pregnenolone, 0.2% estrone, 0% progesterone, 0% estrone-3-sulfate, 0% testosterone, and 0% dehydroepiandrosterone. E2 EIA kit sensitivity is 10.6 pg/mL. Cross-reactivity reported for the P4 EIA kit is 100% progesterone, 1.1% 11-deoxycorticosterone, 0.35% pregnenolone, 0.3% 17 α -hydroxyprogesterone, 0.2% corticosterone, <0.1% estriol, <0.1% estradiol-17 β , <0.1% testosterone, 0.1% desoxycortisol,

<0.1% cortisone, <0.02% DHEA-S, and <0.02% cortisol. P4 EIA sensitivity is 0.045 ng/mL. Intra-assay coefficient of variation (CV) was <7% for both hormones. As only one kit was used for plasma hormonal analysis, no inter-assay CV was calculated.

EC and PdG metabolites in feces

In the laboratory, steroid metabolites were extracted according to the protocol of [Palme \(2005\)](#) with slight modifications. Briefly, 5 mL of 80% (v/v) methanol in water was added to Falcon™ tubes containing 0.5 g (dry mass) of each fecal sample. Fecal suspensions were incubated in an orbital shaker at room temperature (21 °C) for 120 min. Afterwards, samples were vortexed for 10 s and then centrifuged at approximately 500g for 20 min to separate the debris. The supernatant containing the steroid metabolites was recovered and stored at -20 °C until hormonal dosage.

Validation of the non-invasive technique for detecting EC and PdG in fecal samples

Validation of fecal sexual hormone metabolite analysis in guanacos was demonstrated by (i) parallelism between dilutions of pooled fecal extracts and the respective standard curve to detect immunological similarities between the standard and the sample hormone; (ii) efficiency of the applied extraction protocol that was evaluated through the recovery of a known amount of exogenous EC and PdG added to a pool of wet feces before the extraction procedure (amount observed/amount expected × 100%); (iii) recovery of exogenous hormone in the range of the standard curve added to the fecal extracts to examine possible interference of components in feces or the solvent with antibody-binding (matrix interference). Parallelism data analysis was performed using InfoStat statistical software ([Di Rienzo et al. 2012](#)). A regression analysis with auxiliary (dummy) variables was used to determine if the curves obtained in the assay of serial dilutions of pooled fecal extracts and the corresponding standard curve were parallel.

EC and PdG determination in feces

EC and PdG concentrations in the fecal extracts were determined by EIA with polyclonal antibodies and their corresponding horseradish peroxidase conjugate (R522-2 (anti-EC) and R13904 (anti-PdG); C.J. Munro, Department of Population Health and Reproduction, University of California Davis, Davis, California, USA). Prior to the assay and according to parallelism results, fecal extracts were diluted in EIA buffer (0.1 mmol/L sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 9 g/L NaCl and 1 g/L BSA; final dilutions for EC are 1:20 for non-pregnant females and 1:200 for pregnant females; final dilutions for PdG are 1:20 for non-pregnant and pregnant females) and were assayed in duplicate. The EIA was performed according to [Munro and Lasley \(1988\)](#). Briefly, flat-bottom microtiter plates (Nunc MaxiSorp™; VWR International LLC, Mississauga, Ontario, Canada) were first coated with 50 µL of antibody diluted in coating buffer solution (50 mmol/L bicarbonate buffer, pH 9.6; final dilution for EC is 1:13000 and final dilution for PdG is 1:10000) covered with acetate sealers to prevent evaporation and incubated overnight at 4 °C. After 16–24 h, the plates were washed to remove unbound antibody molecules with a wash solution (0.05% Tween 20 in water, 0.15 mol/L NaCl) using an automatic microplate washer (Bio-Tek EL 40 VR; Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA). Immediately after washing, 50 µL of the fecal extracts, standards, and controls were added in duplicate, followed by 50 µL of the corresponding horseradish peroxidase conjugate diluted in EIA buffer (final dilution for EC is 1:37500 and final dilution for PdG is 1:21500). The plates were then covered and incubated at room temperature (21 °C) for 2 h in an orbital shaker. Immediately after incubation, the plates were washed and blotted dry, followed by the addition to each well of 100 µL of the substrate solution (50 mmol/L citrate, 1.6 mmol/L hydrogen peroxide, and 0.4 mmol/L 2,20-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid) diammonium salt, pH 4.0; [Munro et al. 1991](#)). Finally, absorbance

was measured at 405 nm using a microplate reader (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA).

Cross-reactivity reported for EC is 100% estrone-3-glucuronide, 66.6% estrone-3-sulfate, 23.8% estrone, 7.8% estradiol-17β, 3.8% estradiol-3-glucuronide, 3.3% estradiol-3-sulfate, 0.1% estradiol-17-sulfate, 0.1% estradiol-3-disulfate, and <0.1% with all other steroids tested. Cross-reactivity reported for PdG is 100% pregnanediol-3-glucuronide, 44.8% 20α-hydroxyprogesterone, 3.1% 20β-hydroxyprogesterone, 0.7% progesterone, 0.04% estradiol-17β, 0.2% testosterone, and 0.06% cortisol. The sensitivity of the assay for EC was 0.0078 ng/mL and for PdG was 1.954 ng/mL. The intra-assay coefficient of variation was <12% for both hormones and the inter-assay was 14.8% for EC and 11.4% for PdG.

Comparison of plasma hormones and fecal metabolites in pregnant and non-pregnant females

Plasma hormones and fecal metabolite concentrations are presented as mean ± SD. Statistical analysis was performed using R version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; available from <https://www.r-project.org/>). We compared our plasma results with reference values ([Riveros et al. 2009](#)). Furthermore, we compared plasma hormone and fecal metabolite concentrations from pregnant and non-pregnant females (diagnosed by abdominal ballottement) using a Bayesian approach for the ANOVA. This statistical analysis evaluates the probability that mean hormonal concentrations are different in pregnant and non-pregnant females ([Stanton 2017](#)). To perform this test, we used the BayesFactor package (available from <https://cran.r-project.org/web/packages/BayesFactor/index.html>), which applied the concept of Bayes factor (BF) on the statistical results. BF is an odds ratio obtained of comparing two statistical models (the null hypothesis, i.e., no differences in hormonal concentrations between pregnant and non-pregnant females, and the alternative hypothesis, i.e., differences in hormonal concentrations between pregnant and non-pregnant females). We also calculated the lower and upper bounds of the 95% highest density interval (HDI) ([Stanton 2017](#)). The relationship between plasma hormone concentrations and fecal metabolites was estimated using a Bayesian regression model with the package jagsUI ([Kellner 2015](#); available from <https://cran.r-project.org/web/packages/jagsUI/index.html>). To evaluate the adjustment of the model, we considered the HDI ranges, the Markov chain Monte Carlo convergence, and the Gelman–Rubin convergence statistics ($\hat{R} < 1.1$). We also calculated the effective sample size ($n_{\text{effective}}$) to estimate the number of independent draws from the posterior distribution of the parameter. In both analyses, we used uninformative priors to estimate the parameters because we wanted the posterior distributions to be mainly determined by our data. E2 and EC concentrations were \log_{10} -transformed for both analysis and P4 and PdG were \log_{10} -transformed for the regression analysis to obtain a better adjustment of the variables.

Pregnancy predictive model

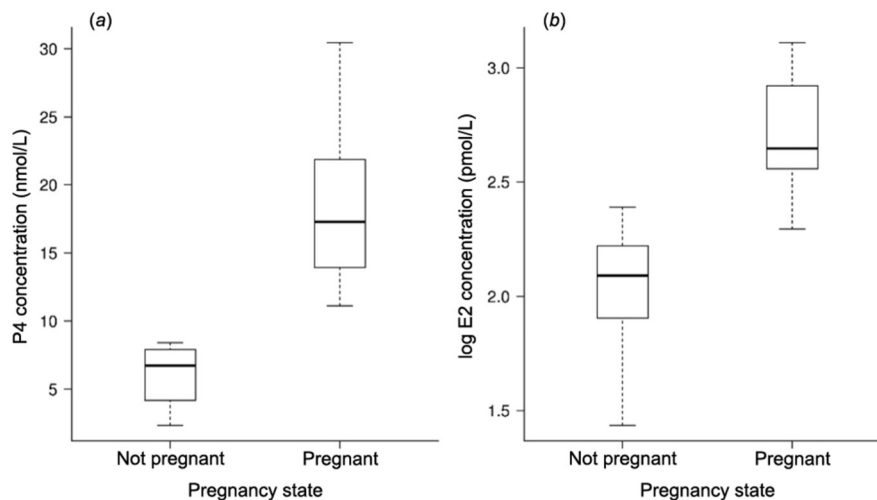
We developed a predictive model that could allow us to evaluate pregnancy in non-handled individuals using a Bayesian approach. For this, we performed a Bayesian logistic regression ([Gelman and Hill 2006](#)) using the package jagsUI ([Kellner 2015](#)). The response variable “pregnancy state” (y) has a Bernoulli distribution:

$$(1) \quad y \sim \text{Bernoulli}(p_i)$$

The probability of being pregnant (p_i) was modeled as a linear function of the PdG and EC concentrations ([Gelman and Hill 2006](#)):

$$(2) \quad \text{Logit}(p_i) = \beta_0 + \beta_1 \times \text{PdG} + \beta_2 \times \text{EC}$$

Fig. 1. Box plots showing differences in concentrations of plasma hormones (a) progesterone (P4) and (b) estradiol (E2) between pregnant and non-pregnant female guanacos (*Lama guanicoe*). Box limits indicate the 25th (lower) and 75th (upper) quartiles; whiskers indicate the last datum within 1.5 interquartile ranges of the box limits; the solid horizontal line indicates the median.



$$(3) \quad p_i = \log\left(\frac{p_i}{1 - p_i}\right)$$

The odds of being pregnant were defined as the probability of being pregnant divided by the probability of not being pregnant. To develop this model, prior distribution for the parameters were

$$(4) \quad \beta_0 \sim U(0, 1)$$

$$(5) \quad \beta_1 \sim N(0, 10000)$$

$$(6) \quad \beta_2 \sim N(0, 10000)$$

We chose a uniform prior to the intercept (β_0) because we wanted the predictions to be mainly regulated by the slopes of our model (β_1 and β_2 ; i.e., fecal metabolite concentrations). Furthermore, uninformative priors were selected for β_1 and β_2 because we wanted that our results to be explained principally by our data. The posterior distribution of each parameter was obtained. We used the mean of each parameter to estimate the logit of the probability of being pregnant and then we calculated the probability of being pregnant according to eqs. 2 and 3 (Gelman and Hill 2006). To test the model assessment to predict pregnancy, we introduced one by one the pregnant and non-pregnant female data in the model and calculated the probability of being pregnant. Finally, we compared the results obtained from the model with our field diagnosis. Our model assumed independent observations and a linear relationship between the log odds of pregnancy and the explanatory variables. Despite different sites presenting differences in productivity that could influence hormonal excretion due to variation in nutritional components, several studies have shown that fecal output of hormonal metabolites was not affected (Rabiee et al. 2002; Schwarzenberger 2007; Morden et al. 2011). Therefore, for the predictive model construction, we assumed that there were no differences in fecal metabolites among sites. To evaluate the adjustment of the model, we considered the HDI ranges, the Markov chain Monte Carlo convergence, and the Gelman–Rubin convergence statistic ($\hat{R} < 1.1$). We also calculated the effective sample size ($n_{\text{effective}}$) to estimate the number of independent draws from the posterior distribution of the estimated parameter.

Results

E2 and P4 in plasma

At approximately 300 days of gestation, plasma hormone concentrations were significantly higher in pregnant than in non-pregnant females (Figs. 1a and 1b; pregnant females — P4 = 17.3 ± 6.1 nmol/L and E2 = 580.9 ± 330.2 pmol/L; non-pregnant females — P4 = 8.1 ± 6.8 nmol/L and E2 = 193.0 ± 265.5 pmol/L). Bayes factor indicated strong evidence in favor of the alternative hypothesis (P4 concentrations — BF = 168.6% and HDI = 10.7, 15.6; E2 concentrations — BF = 39.5% and HDI = 2.1, 2.5).

Validation of the non-invasive technique for detecting EC and PdG in fecal samples

To establish the pharmacological validity of the technique in guanacos, the EIA was performed with a serially diluted pool of fecal extracts that showed parallel displacement to the EC ($R^2 = 0.96$, $P = 0.13$; Fig. 2a) and the PdG ($R^2 = 0.96$, $P = 0.47$; Fig. 2b), proving immunological similarities between the sample solution and the standard curve.

Recovery of exogenous hormone in the range of the standard curve (EC = 0.0078–2 ng/mL and PdG = 1.954–500 ng/mL) added to a pool of fecal extracts indicated a low interference of components in the feces with antibody-binding (EC — 91.43% ± 5.13%, $y = 1.0001x + 0.0077$, $R^2 = 0.99$, $P < 0.01$, Fig. 3b; PdG — 81.9% ± 2.71%, $y = 0.8186x + 12.7622$, $R^2 = 0.99$, $P < 0.01$; Fig. 3a). Efficiency of the entire fecal extraction procedure with the solvent was 85.74% ± 3.99% and 88.35% ± 4.88% for EC and PdG, respectively.

EC and PdG metabolite determinations in feces

From the females sampled for fecal analysis ($n = 69$), 35 were pregnant and 34 were not pregnant (diagnosed by abdominal ballotement). Fecal metabolite concentrations were significantly higher in pregnant than in non-pregnant females. We found differences in EC and PdG concentrations (pregnant females — EC = 485.6 ± 412.0 ng/g and PdG = 81.9 ± 58.5 µg/g; non-pregnant females — EC = 76.2 ± 47.9 ng/g and PdG = 45.4 ± 24.4 µg/g). Bayes factor indicated a strong evidence in favor of the alternative hypothesis (EC — BF = 6.2 × 10¹⁰ and HDI = 52.9, 74.5 (Fig. 4b); PdG — BF = 24.9% and HDI = 52.8, 74.6 (Fig. 4a)).

Plasma hormone concentrations and their relationship with fecal metabolites

E2 and P4 plasma concentrations showed a linear relationship with EC and PdG, respectively (Figs. 5b and 5a, respectively). The adjustment of the parameters is presented in Table 1.

Fig. 2. Displacement parallel curves of (a) conjugated estrogens (EC) and (b) pregnanediol glucuronides (PdG) in guanacos (*Lama guanicoe*).

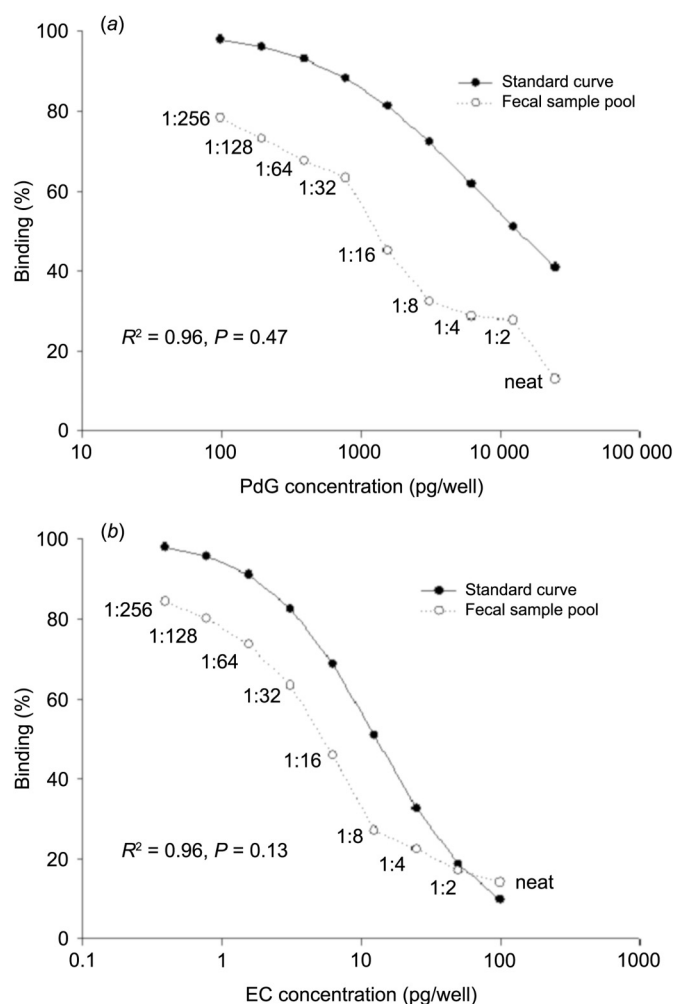


Fig. 3. Recovery of exogenous hormones (a) pregnanediol glucuronides (PdG) and (b) conjugated estrogens (EC) from fecal extract pools compared with the amount added of the corresponding hormone in guanacos (*Lama guanicoe*).

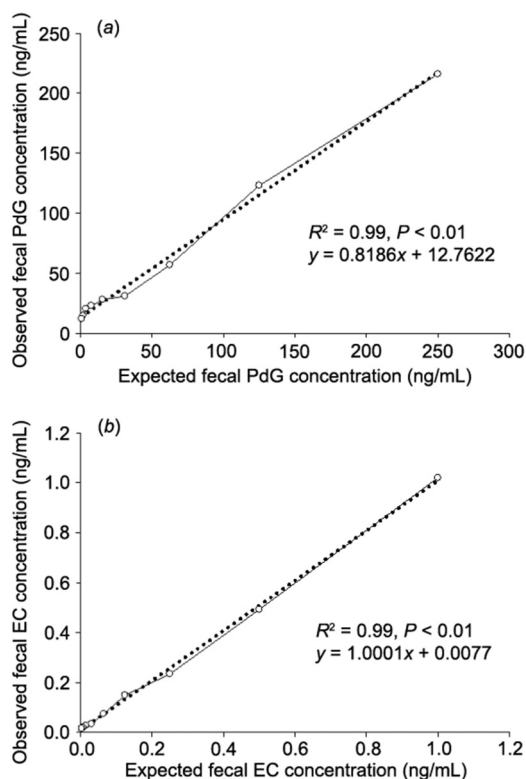
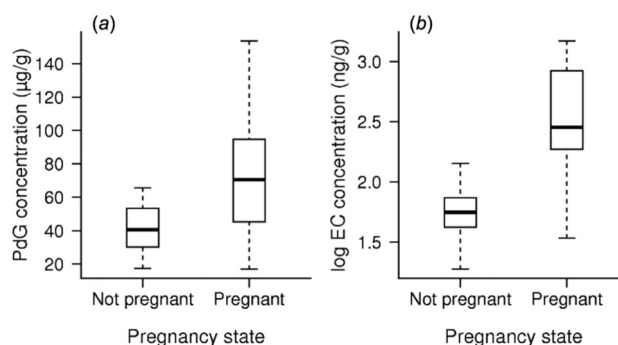


Fig. 4. Box plots showing differences in concentrations of fecal metabolites (a) pregnanediol glucuronides (PdG) and (b) conjugated estrogens (EC) between pregnant and non-pregnant female guanacos (*Lama guanicoe*). Box limits indicate the 25th (lower) and 75th (upper) quartiles; whiskers indicate the last datum within 1.5 interquartile ranges of the box limits; the solid horizontal line indicates the median.



Pregnancy predictive model

The estimated logistic regression equation for the predictive model was

$$(7) \quad \text{logit}(p_i) = 0.495 - 1.697 \times \ln(\text{PdG}_i) + 3.827 \times \ln(\text{EC}_i)$$

$$(8) \quad p_i = \frac{\exp[0.495 - 1.697 \times \ln(\text{PdG}_i) + 3.827 \times \ln(\text{EC}_i)]}{1 + \exp[0.495 - 1.697 \times \ln(\text{PdG}_i) + 3.827 \times \ln(\text{EC}_i)]}$$

Equations 7 and 8 contain the mean values of the posterior distribution of the parameters. HDI intervals, \hat{R} , and $n_{\text{effective}}$ are reported in Table 2. The threshold value for determining pregnant vs. non-pregnant status, which resulted in the best predictive success for this model, was 0.4 (Fig. 6). Our model accurately predicted 88.57% of the pregnant females and 94% the non-pregnant females. In very few cases did borderline fecal metabolite levels result in false positive or false negative prediction of pregnancy (Table 3).

Discussion

This is the first study in which a pregnancy predictive model is developed using non-invasive methods in female guanacos. To develop this model, we used hormone fecal metabolites as indicators of pregnancy status. Our results indicated that EC and PdG levels were higher in pregnant than in non-pregnant female guanacos during late gestation (i.e., 9 or 10 months of gestation).

Consequently, EC and PdG levels are good indicators of pregnancy and could be used at a population scale. Since this is the first study to use of EC and PdG in guanaco, it was necessary to corroborate the direct relationship of EC and PdG with the circulating hormones E2 and P4, respectively. Plasma hormone levels and their corresponding fecal metabolite concentrations showed a strong association that supported the use of these metabolites as indicators of hormonal fluctuations (Table 1, Figs. 5a and 5b).

Previous studies of guanaco showing variation in E2 levels during the reproductive cycle indicated that E2 levels in pregnant females were double that of unmated females (Riveros et al. 2009,

Fig. 5. Linear relationship between plasma hormones progesterone (P4) and estradiol (E2) and their fecal metabolites pregnanediol glucuronides (PdG) and conjugated estrogens (EC) in guanacos (*Lama guanicoe*): (a) PdG vs. P4 and (b) EC vs. E2.

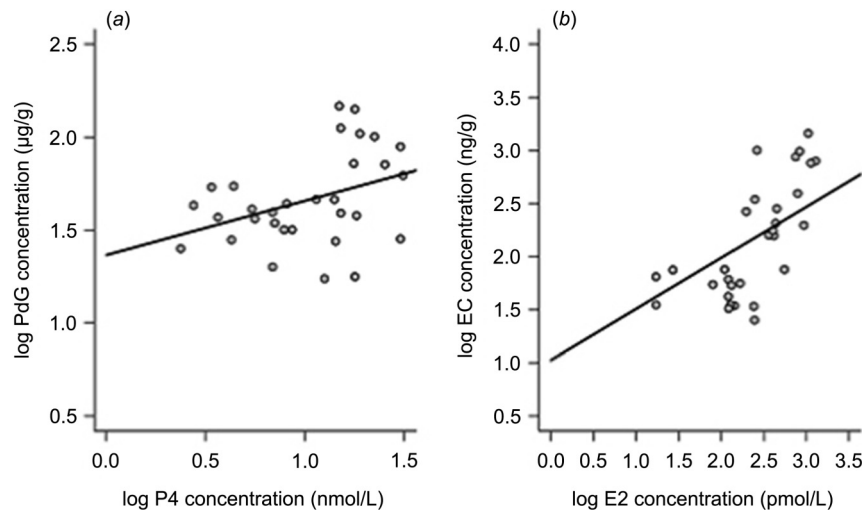


Table 1. Linear regression parameters of serum hormone concentrations and their relationship with fecal metabolites in guanacos (*Lama guanicoe*), the highest density intervals (HDI), the Gelman–Rubin convergence statistics (\hat{R}), and the effective sample size ($n_{\text{effective}}$); all the parameters showed no 0 overlap and $\hat{R} < 1.1$.

	Mean	SD	HDI			\hat{R}	$n_{\text{effective}}$
			2.5%	5%	97.5%		
$\alpha_{0;P4-PdG}^a$	1.51	0.08	1.45	1.51	1.67	1	24 259
$\alpha_{1;P4-PdG}^b$	0.30	0.13	0.03	0.30	0.56	0.986	29 563
$\delta_{0;E2-EC}^c$	1.02	0.28	0.47	1.02	1.57	1	8 508
$\delta_{1;E2-EC}^d$	0.48	0.12	0.26	0.48	0.72	1	8 083

^aIntercept of the linear relation among progesterone (P4) and pregnanediol glucuronides (PdG).

^bSlope of the linear relation among P4 and PdG.

^cIntercept of the linear relation among estradiol (E2) and conjugated estrogens (EC).

^dSlope of the linear relation among E2 and EC.

Table 2. Parameters estimated for the pregnancy predictive model of guanacos (*Lama guanicoe*), the highest density intervals (HDI), the Gelman–Rubin convergence statistics (\hat{R}), and the effective sample size ($n_{\text{effective}}$); all the parameters showed no 0 overlap and $\hat{R} < 1.1$.

	Mean	SD	HDI			\hat{R}	$n_{\text{effective}}$
			2.5%	50%	97.5%		
β_0	0.495	0.289	0.025	0.492	0.975	1.000	40 084
β_1	-1.697	0.376	-2.518	-1.667	-1.049	1.001	6 609
β_2	3.827	0.888	2.307	3.753	5.770	1.001	5 385

Note: β_0 is the intercept and β_1 is the slope for pregnanediol glucuronides (PdG); β_2 is the slope for estradiol (EC).

2010). In accordance with those results, we found that mean E2 levels were threefold higher in pregnant females than in non-pregnant females. However, we should consider that the secretory profile of E2 also reflects the follicular waves (Riveros et al. 2010); thus, the determination of E2 alone is a weak indicator of pregnancy status (Figs. 2a and 2b). On the other hand, P4 levels remain low during follicular recruitment, increase after mating, and continue to increase until parturition (Riveros et al. 2009, 2010). Hence, the use of P4 or the combination of E2 and P4 would be better indicators of pregnancy state in this species. The same patterns were also observed in several other species (Schwarzenberger et al. 1996, 1997; Morden et al. 2011; Mastromonaco et al. 2015; Nagl et al. 2015; Ahuja-Aguirre et al. 2017).

Fig. 6. Assigned probabilities to the logistic regression model. Logit p according to the model fitted vs. probability of pregnancy in guanacos (*Lama guanicoe*) predicted by the model. Cut-off probability is 0.4. Females were diagnosed as pregnant (gray circles) and not pregnant (white circles) in the field.

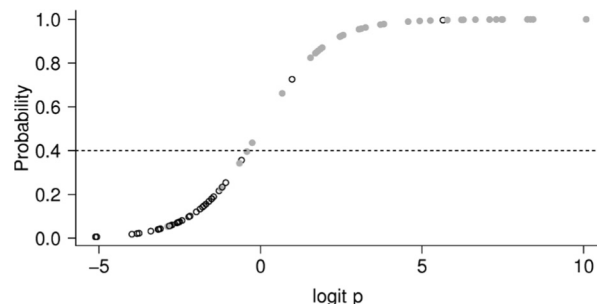


Table 3. Model predictions and field diagnosis comparison of pregnancy status of female guanacos (*Lama guanicoe*).

Field diagnosis	Model prediction	
	Pregnant	Not pregnant
Pregnant	31	4
Not pregnant	2	32

The data reported in this study clearly demonstrated that the polyclonal antisera and sexual hormone metabolite assays used here can detect variations in the metabolites excreted through feces in guanacos and can provide us with the possibility of non-invasive hormone monitoring of female reproductive status, of the variation of fecal metabolites throughout the year during gestation, and of immature females without physically restraining guanacos.

Estimating pregnancy rates is a useful parameter for the study and management of wild ungulate populations that are rarely considered in demographic models (Cain et al. 2012). Indeed, the use of capture methods to assess pregnancy could cause stress and damage to the females, as well as the fetuses (Carmanchahi et al. 2011; Carmanchahi and Marull 2012). In addition, non-invasive methods allow samples to be collected during the whole year, are easy to perform, a mean value of hormonal concentration is obtained avoiding bias caused by daytime fluctuations, and samples

can be easily stored at -20°C for a long time without degradation (Schwarzenberger and Brown 2013; Kersey and Dehnhard 2014). Thus, the non-invasive approach proposed here will be useful to assess the state of wild guanaco populations and to take management decisions in protected areas, minimizing disturbance to animals, increasing safety for both animal and researchers, and avoiding potential data bias due to animal-handling (Pauli et al. 2010; Kersey and Dehnhard 2014; Valenzuela-Molina et al. 2018).

Our pregnancy predictive model based on the measurement of two different sexual hormone metabolites will facilitate the work of wildlife managers by providing an effective and useful method for estimating pregnancy in free-ranging guanacos. Owing to the ease of computational processing of logistic regression models, a large number of samples can be evaluated instead of comparing each hormonal concentration sample with reference values. In addition, this method makes it easier to extrapolate individual datum to large ungulate populations. Although our model was directly applied to guanaco, its approach could be considered for other mammal species. This procedure will facilitate the prediction of pregnancy in large-scale and long-term studies, and it will simplify the inclusion of pregnancy status in population dynamics research.

Acknowledgements

We thank the members of Cooperativa Payún Matruí, Los Peucos farm, for allowing us to participate in the live-shearing events and to take samples. The Direction of Natural Renewable Resources of Mendoza Province provided the authorization to work at La Payunia Reserve (Resol. 1231/2016). This study was partially funded by ANPCyT (PICT-0700) and CONICET (PIP-11220100100386).

References

- Ahuja-Aguirre, C., López-deBuen, L., Rojas-Maya, S., and Hernández-Cruz, B.C. 2017. Progesterone and estradiol profiles in different reproductive stages of captive collared peccary (*Pecari tajacu*) females assessed by fecal metabolites. *Anim. Reprod. Sci.* **180**: 121–126. doi:10.1016/j.anireprosci.2017.03.008. PMID: 28336266.
- Altmann, J., Lynch, J.W., Nguyen, N., Alberts, S.C., and Geschiere, L.R. 2004. Life-history correlates of steroid concentrations in wild peripartum baboons. *Am. J. Primatol.* **64**(1): 95–106. doi:10.1002/ajp.20064. PMID: 15356861.
- Bamberg, E., Möstl, E., Patzl, M., and King, G.J. 1991. Pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of estrogens in feces from nondomestic species. *J. Zoo Wildl. Med.* **22**(1): 73–77. Available from <https://www.jstor.org/stable/20095120> [accessed 16 January 2019].
- Bolgeri, M.J. 2016. Caracterización de movimientos migratorios en guanacos (*Lama guanicoe*) y patrones de depredación por pumas (*Puma concolor*) en La Payunia, Mendoza. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Rio Negro, Argentina.
- Bran, D., Ayesa, J., and Lopez, C. 2002. Áreas ecológicas de Neuquén. Informe Laboratorio De Teledetección-SIG N°4-INTA-EEA Bariloche. Available from <https://docplayer.es/13343189-Areas-ecologicas-de-neuquen.html> [accessed 11 July 2018].
- Brown, J.L. 2018. Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered mammals. *Theriogenology*, **109**: 2–13. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.12.004. PMID:29249329.
- Burgess, E.A., Lanyon, J.M., Brown, J.L., Blyde, D., and Keeley, T. 2012. Diagnosing pregnancy in free-ranging dugongs using fecal progesterone metabolite concentrations and body morphometrics: a population application. *Gen. Comp. Endocrinol.* **177**(1): 82–92. doi:10.1016/j.ygcen.2012.02.008. PMID:22387986.
- Cain, S.L., Higgs, M.D., Roffe, T.J., Monfort, S.L., and Berger, J. 2012. Using fecal progesteragens and logistic regression to enhance pregnancy detection in wild ungulates: a bison case study. *Wildl. Soc. Bull.* **36**(4): 631–640. doi:10.1002/wsb.178.
- Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 2, 2nd ed. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ont. [Revised date March 2017.] Available from <https://www.ccac.ca/en/standards/guidelines/general-guidelines.html>.
- Candia, R., Puig, S., Dalmaso, A., Videla, F., and Martínez Carretero, E. 1993. Diseño del plan de manejo para la reserva provincial La Payunia (Malargüe, Mendoza). *Multequina*, No. 2. Available from <https://www.redalyc.org/pdf/428/42800202.pdf> [accessed 15 May 2017].
- Carmanchahi, P.D., and Marull, C. 2012. Criterios de Bienestar Animal para el Manejo de Camelidos Silvestres Sudamericanos. Protocolo de Buenas Prácticas de Manejo de Guanacos (*Lama guanicoe*) Silvestres. Edited by South American Camelid Specialist Group (GECS-IUCN). pp. 2–16. Available from http://camelid.org/wp-content/uploads/2016/04/ba_guanacos_2012.pdf [accessed 5 March 2014].
- Carmanchahi, P., Ovejero, R., Marull, C., López, G., Schroeder, N., Jahn, G., et al. 2011. Physiological response of wild guanacos to capture for live shearing. *Wildl. Res.* **38**(1): 61–68. doi:10.1071/WR10170.
- Carmanchahi, P.D., Schroeder, N.M., Bolgeri, M.J., Walker, R.S., Funes, M., Berg, J., et al. 2015. Effects of live-shearing on population parameters and movement in sedentary and migratory populations of guanacos (*Lama guanicoe*). *Oryx*, **49**(1): 51–59. doi:10.1017/S0030605314000027.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W. 2012. InfoStat. Version 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. Available from <http://www.infostat.com.ar>.
- Fowler, M. 2011. Medicine and surgery of camelids. John Wiley & Sons, Ames, Iowa.
- García Pereira, R.J., Polegato, B.F., de Souza, S., Negrao, J.A., and Duarte, J.M.B. 2006. Monitoring ovarian cycles and pregnancy in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) by measurement of fecal progesterone metabolites. *Theriogenology*, **65**(2): 387–399. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.02.019. PMID:15979135.
- Gelman, A., and Hill, J. 2006. Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Gonzalez-Polo, M., Caballé, G., and Mazzarino, M.J. 2015. Biomasa y actividad microbiana del suelo en un sistema silvopastoril con pinos en la Patagonia Andina. In 3° Congreso Nacional de Sistemas Silvopastoriles: VII Congreso Internacional Sistemas Agroforestales. INTA, Misiones, Argentina. pp. 532–536.
- Graham, L., Schwarzenberger, F., Möstl, E., Galama, W., and Savage, A. 2001. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progesterogens in feces and serum. *Zoo Biol.* **20**(3): 227–236. doi:10.1002/zoo.1022.
- Kellner, K. 2015. jagsUI: a wrapper around 'rjags' to streamline 'JAGS' analyses. R package version 1.3.7. Available from <https://cran.r-project.org/web/packages/jagsUI/index.html>.
- Kersey, D.C., and Dehnhard, M. 2014. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **203**: 296–306. doi:10.1016/j.ygcen.2014.04.022. PMID:24798579.
- Krepšič, V., Polegato, B., Zanetti, E., and Duarte, J. 2013. Fecal progesterins during pregnancy and postpartum periods of captive red brocket deer (*Mazama americana*). *Anim. Reprod. Sci.* **137**(1–2): 62–68. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.11.016. PMID:23287415.
- Kumar, A., Mehrotra, S., Dangi, S., Singh, G., Singh, L., Mahla, A., et al. 2013. Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals. *Vet. World*, **6**(1): 59–63. doi:10.5455/vetworld.2013.59-63.
- Lasley, B.L., and Kirkpatrick, J.F. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *J. Zoo Wildl. Med.* **22**(1): 23–31. Available from <https://www.jstor.org/stable/20095115> [accessed 16 January 2019].
- León, R.J., Bran, D., Collantes, M., Paruelo, J.M., and Soriano, A. 1998. Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecol. Austral*, **8**(2): 125–144. Available from <https://www.agro.uba.ar/users/staiano/jose%20paruelo/Publicaciones/1998/Leo&n%20R.J.C.,%20Bran%20D.,%20Collantes%20M.B.,%20Paruelo%20J.M.%20y%20Soriano%20A.%201998.%20Grandes%20unidades%20de%20vegetacion%20de%20la%20Patagonia%20extra-andina.%20Ecologia%20Austral%208.%20126-141.pdf> [accessed 3 February 2018].
- Martínez Carretero, E. 2004. La provincia fitogeográfica de la Payunia. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, **39**(3–4): 195–226. Available from <http://botanicaargentina.com.ar/la-provincia-fitogeografica-de-la-payunia> [accessed 6 March 2014].
- Mastromonaco, G.F., Cantarelli, V.I., Galeano, M.G., Bourguignon, N.S., Gilman, C., and Ponzio, M.F. 2015. Non-invasive endocrine monitoring of ovarian and adrenal activity in chinchilla (*Chinchilla lanigera*) females during pregnancy, parturition and early post-partum period. *Gen. Comp. Endocrinol.* **213**: 81–89. doi:10.1016/j.ygcen.2015.02.006. PMID:25712434.
- McCormick, S.D., and Romero, L.M. 2017. Conservation endocrinology. *Bioscience*, **67**(5): 429–442. doi:10.1093/biosci/bix026.
- Mithileshwari, C., Srivastava, T., Kumar, V., Kumar, A., and Umapathy, G. 2016. Non-invasive assessment of fecal progesteragens and pregnancy detection in Himalayan musk deer (*Moschus chrysogaster*). *Theriogenology*, **85**(2): 216–223. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.009. PMID:26454526.
- Morden, C.J.C., Weladji, R.B., Ropstad, E., Dahl, E., Holand, Ø., Mastromonaco, G., and Niemen, M. 2011. Fecal hormones as a non-invasive population monitoring method for reindeer. *J. Wildl. Manage.* **75**(6): 1426–1435. doi:10.1002/jwmg.185.
- Munro, C., and Lasley, B. 1988. Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. *Prog. Clin. Biol. Res.* **285**: 289–329. PMID:3068677.
- Munro, C.J., Stabenfeldt, G., Cragun, J., Addiego, L., Overstreet, J., and Lasley, B. 1991. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. *Chem. Pharm. Ther.* **37**(6): 838–844. Available from <http://clinchem.aaccjnls.org/content/37/6/838.short> [accessed 5 March 2018]. PMID:2049848.
- Nagl, A., Kneidinger, N., Kiik, K., Lindeberg, H., Maran, T., and Schwarzenberger, F. 2015. Noninvasive monitoring of female reproductive hormone metabolites in the

- endangered European mink (*Mustela lutreola*). *Theriogenology*, **84**(9): 1472–1481. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.023. PMID:26324114.
- Ovejero, R., Novillo, A., Soto-Gamboa, M., Mosca-Torres, M.E., Cuello, P., Gregório, P., et al. 2013. Do cortisol and corticosterone play the same role in coping with stressors? Measuring glucocorticoid serum in free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*). *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* **319**(10): 539–547. doi:10.1002/jez.1833. PMID:24115389.
- Palme, R. 2005. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1046**(1): 75–80. doi:10.1196/annals.1343.007. PMID:16055844.
- Pauli, J.N., Whiteman, J.P., Riley, M.D., and Middleton, A.D. 2010. Defining non-invasive approaches for sampling of vertebrates. *Conserv. Biol.* **24**(1): 349–352. doi:10.1111/j.1523-1739.2009.01298.x. PMID:19624526.
- Pratt, M., and Hopkins, P. 1975. The diagnosis of pregnancy in sheep by abdominal palpation. *Aust. Vet. J.* **51**(8): 378–380. doi:10.1111/j.1751-0813.1975.tb15600.x. PMID:1191138.
- Purohit, G. 2010. Methods of pregnancy diagnosis in domestic animals: the current status. *WebmedCentral Reproduction*, **1**(12): WMC001305. doi:10.9754/journal.wmc.2010.001305.
- Rabiee, A., Dalley, D., Borman, J., Macmillan, K., and Schwarzenberger, F. 2002. Progesterone clearance rate in lactating dairy cows with two levels of dry matter and metabolisable energy intakes. *Anim. Reprod. Sci.* **72**(1–2): 11–25. doi:10.1016/S0378-4320(02)00067-2. PMID:12106962.
- Riveros, J.L., Urquieta, B., Bonacic, C., Hoffmann, B., Bas, F., and Schuler, G. 2009. Endocrine changes during pregnancy, parturition and post-partum in guanacos (*Lama guanicoe*). *Anim. Reprod. Sci.* **116**(3–4): 318–325. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.02.005. PMID:19304413.
- Riveros, J.L., Schuler, G., Bonacic, C., Hoffmann, B., Chaves, M.G., and Urquieta, B. 2010. Ovarian follicular dynamics and hormonal secretory profiles in guanacos (*Lama guanicoe*). *Anim. Reprod. Sci.* **119**(1–2): 63–67. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.11.005. PMID:20022436.
- Schroeder, N.M., Matteucci, S.D., Moreno, P.G., Gregorio, P., Ovejero, R., Taraborelli, P., and Carmanchahi, P.D. 2014. Spatial and seasonal dynamic of abundance and distribution of guanaco and livestock: insights from using density surface and null models. *PLoS ONE*, **9**(1): e85960. doi:10.1371/journal.pone.0085960. PMID:24465812.
- Schwarzenberger, F. 2007. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *Int. Zoo Yearb.* **41**(1): 52–74. doi:10.1111/j.1748-1090.2007.00017.x.
- Schwarzenberger, F., and Brown, J. 2013. Hormone monitoring: an important tool for the breeding management of wildlife species. *Wien Tierärztl. Monat.* **100**: 209–225. Available from <http://www.rhinoresourcecenter.com/index.php?s=1&act=pdfviewer&id=1398153799&folder=139> [accessed 24 January 2019].
- Schwarzenberger, F., Möstl, E., Bamberg, E., Pammer, J., and Schmechlik, O. 1991. Concentrations of progestagens and oestrogens in the faeces of pregnant Lipizzan, trotter and thoroughbred mares. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **44**: 489–499. PMID:1795293.
- Schwarzenberger, F., Speckbacher, G., and Bamberg, E. 1995. Plasma and fecal progestagen evaluations during and after the breeding season of the female vicuna (*Vicuna vicuna*). *Theriogenology*, **43**(3): 625–634. doi:10.1016/0093-691X(94)00068-6. PMID:16727654.
- Schwarzenberger, F., Möstl, E., Palme, R., and Bamberg, E. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim. Reprod. Sci.* **42**(1–4): 515–526. doi:10.1016/0378-4320(96)01561-8.
- Schwarzenberger, F., Palme, R., Bamberg, E., and Möstl, E. 1997. A review of faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in mammals. *Int. J. Mammal. Biol.* **62**(2): 214–221.
- Stanton, J.M. 2017. Reasoning with data: an introduction to traditional and Bayesian statistics using R. Guilford Publications, New York.
- Tibary, A. 2018. Monitoring and controlling follicular activity in camelids. *Theriogenology*, **109**: 22–30. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.12.011. PMID:29249328.
- Valenzuela-Molina, M., Atkinson, S., Mashburn, K., Gendron, D., and Brownell, R.L., Jr. 2018. Fecal steroid hormones reveal reproductive state in female blue whales sampled in the Gulf of California, Mexico. *Gen. Comp. Endocrinol.* **261**: 127–135. doi:10.1016/j.yggen.2018.02.015. PMID:29476760.
- Vaughan, J. 2011. Ovarian function in South American camelids (alpaca, llamas, vicunas, guanacos). *Anim. Reprod. Sci.* **124**(3–4): 237–243. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.031. PMID:20875933.