



Todos por la Mar
Conservación de Cetáceos y Tortugas en Murcia y Andalucía

LIFE02NAT/E/8610

***PROCOLOS DE TOMA DE
MUESTRAS DE CETÁCEOS MUERTOS
durante el proyecto LIFE***

Documento redactado por:

Josep M^a Alonso Farré

*Coordinador del Grupo de Trabajo de Centros de Recuperación, S.E.C.
Coordinador de las acciones de Centros de Recuperación y Redes de Varamiento del
proyecto LIFENAT02/E/8610*

Revisión del original, enero de 2005

Históricamente frente a un animal marino varado se han recogido, casi con exclusividad, datos para estudios de historia natural (morfometrías, edad, reproducción, dieta...). Como consecuencia de la inclusión de gran parte de las especies de mamíferos y tortugas marinas en las diferentes normativas proteccionistas nacionales e internacionales, así como la catalogación de muchas de ellas como especies en regresión, e incluso en peligro de extinción, se ha establecido la necesidad de *conocer* al máximo todo tipo de parámetros para cada una de las especies.

Los animales varados se han convertido de esta manera en fuentes de muestras y de datos de todo tipo, que, en muchas ocasiones, se consideran muy valiosos para establecer programas de conservación de las especies estudiadas. De esta manera, la necropsia y el muestreo de un animal varado ha pasado a ser el primer paso de un gran número de estudios post-mortem de enorme diversidad.

Hoy en día, durante el examen de un animal muerto, a parte de seguir tomando datos de historia natural, se muestrea para averiguar las causas de la muerte o enfermedad, para evaluar la presencia de efectos de la contaminación química y acústica, para detectar la presencia de nuevos patógenos, para realizar estudios anatómicos y fisiológicos, y en general para aportar datos que ayuden a establecer el estado de salud de la población. Esto implica que cada Red de Varamientos debe tener sus propios protocolos de muestreo, conjugando los intereses de todos los investigadores que deseen realizar estudios post-mortem con las muestras obtenidas de un animal varado.

A continuación detallamos la metodología para llevar a cabo los muestreos establecidos para el desarrollo de las investigaciones enmarcadas dentro del proyecto LIFENAT02/E/8610 “Conservación de Cetáceos y Tortugas en Murcia y Andalucía”. Este documento es una herramienta de trabajo y de consulta rápida. Durante el transcurso del proyecto se editará un manual de necropsia y toma de muestras de tortugas y mamíferos marinos, que supondrá una extensa revisión de los protocolos tanto de necropsia como de extracción de datos y muestras.

Asimismo debemos destacar la importancia de realizar necropsias y muestrear todos los animales que sea posible, pero que debido a que el proyecto LIFE focaliza sus esfuerzos en el delfín mular (*Tursiops truncatus*) y en la marsopa (*Phocoena phocoena*), resulta imprescindible poner el máximo interés en realizar estas operaciones de una manera correcta cuando trabajemos con individuos de estas especies.

INDICE

1. ***Código del estado de Descomposición (CD)***
 - i. ***Cuadro con los códigos de estado de descomposición***
 - ii. ***Cuadro de muestreo en función del estado de descomposición***
2. ***Identificación de la especie***
3. ***Morfometrías, peso y medición del panículo adiposo***
4. ***Estudios de dieta***
5. ***Estudios de edad***
6. ***Estudios sobre parámetros reproductivos***
7. ***Estudios genéticos***
8. ***Patología macroscópica e histopatología***
9. ***Enfermedades infecciosas (Bacteriología, virología y parasitología)***
10. ***Patologías no infecciosas (Traumatismos, desnutrición, toxicología y patología acústica)***
 - i. ***Cuadro con los códigos de estado nutricional***
11. ***Base de datos para cetáceos y tortugas marinas varados o capturados accidentalmente en Murcia y Andalucía***
12. ***Fichas de muestreo mínimo a recoger en un cetáceo***
13. ***Cuadro resumen de los muestreos a realizar en cetáceos***
14. ***Listado de datos y muestras IMPRESCINDIBLES a recoger en todos los animales, durante el transcurso del proyecto LIFE***

Código del estado de Descomposición (CD)

Parece evidente que no todos los ejemplares que lleguen a nuestras manos serán aptos para realizar un estudio post-mortem del cual extraer datos útiles. Podemos establecer un criterio general del estado de conservación de los animales marinos varados, definiendo unos Códigos de Descomposición (CD), tal y como se presenta en la siguiente tabla:

Código de Descomposición	Características externas e internas
M1. Recién muerto	Muy frescos. Animales que han muerto durante el rescate o en el centro de recuperación. Aspecto externo sin alteraciones. Puede mostrar signos de rigor mortis (<24h). Órganos internos intactos. Todavía puede separarse el suero centrifugando la sangre (24-48h).
M2. Frescos	Ligero mal olor. Aspecto externo sin alteraciones, aunque se observa un cierto aspecto reseco. Olor apenas perceptible. Órganos internos todavía intactos. Ya no puede separarse el suero centrifugando la sangre.
M3. Descomposición moderada	Primeros síntomas de autólisis; se observa un aspecto reseco con zonas de piel cuarteada y un cambio de color (enrojecimiento) de la piel (sobretudo visible en la zona ventral). Las mucosas pueden aparecer picadas por gaviotas o otros depredadores. Mal olor evidente. Los órganos conservan su estructura normal, aunque el hígado aparece friable y sin consistencia.
M4. Descomposición avanzada	Autólisis muy avanzada; pérdida de piel en amplias zonas, timpanización de la zona abdominal, protusión del pene en machos y mal olor muy evidente. Órganos han perdido su consistencia. Puede faltar alguna porción del cuerpo.
M5. Restos	Puede observarse alguna parte del esqueleto u órganos internos que han perdido totalmente su consistencia, o simplemente, sólo se observan restos óseos o momificados del animal.

El proceso de descomposición está determinado por diversos factores que pueden hacer variar sustancialmente el tiempo entre un CD y otro. Una temperatura ambiental elevada en el lugar del varamiento acelerará el paso de un animal a los CD posteriores. Así mismo, los cetáceos de grandes dimensiones se descomponen mucho más rápidamente que los pequeños, debido a la enorme cantidad de calor corporal que mantienen en su interior (por la imposibilidad de eliminarlo debido a la presencia de la gran capa de grasa), en las primeras 24-48 horas después de morir.

La necropsia siempre debe hacerse inmediatamente después de la recogida del cadáver para evitar la instauración o el avance de los procesos autolíticos, que en general, empezarán entre las 6 y las 12 horas después de la muerte. Si esto no fuese posible debemos refrigerar el cuerpo, pero no congelarlo, ya que la congelación introduce numerosos artefactos como el enrojecimiento de los órganos y alteraciones en la estructura tisular debido a los cristales de hielo. Si resulta imposible la realización de la necropsia, en última instancia pueden congelarse animales enteros para la realización posterior de su estudio completo. En estos casos, el muestreo será parcial, y por tanto, podrá extraerse menor información de los estudios post-mortem, e incluso en ocasiones quedarán totalmente imposibilitados.

Los muestreos y estudios post-mortem que pueden llevarse a cabo, en función del Código de Descomposición del animal, se detallan a continuación:

	M1	M2	M3	M4	M5
Necropsia/inspección	x	x	x	x	(x)
Morfometrías	x	x	x	x	(x)
Genética	x	x	x	x	(x)
Edad	x	x	x	x	(x)
Reproducción	x	x	x	(x)	
Dieta	x	x	x	(x)	
Toxicología	x	x	x	(x)	
Bacteriología	x	(x)	(x)		
Virología	x	x	(x)		
Histopatología	x	x	x	(x)	
Parasitología	x	x	x	x	(x)

x = recoger, (x) = recoger si es posible

Identificación de la especie

La primera labor que debe plantearse frente a un cetáceo varado en una playa es la identificación de su especie. Repasando cualquier guía de identificación de cetáceos, parece que la diferenciación entre especies debe ser tarea relativamente fácil, pero una vez delante del animal, existen muchos factores que en ocasiones no la facilitan, sino todo lo contrario.

Las guías de identificación de especies existentes suelen describir los patrones de coloración de los animales adultos. Las crías o los juveniles de la mayoría de especies de cetáceos, presentan modificaciones en los patrones descritos para los adultos, sobre todo a nivel de definición de líneas o marcas, y por tanto, resultarán más complicados de identificar.

Pero sin duda, el factor que nos va a producir mayores problemas en la identificación mediante el patrón de coloración, es el grado de descomposición del animal. Animales en CD 4 ó 5 con pérdidas de extensas áreas de piel, y por tanto de su coloración, no permitirán basarnos en este parámetro para una identificación definitiva. Para ello, deberemos recurrir a las morfometrías típicas de cada especie, y sobre todo, a la osteología.

En los cetáceos, las características anatómicas de ciertos huesos como los pélvicos, las escápulas, el esternón, ó el cráneo, aportarán información definitiva para la identificación de una especie concreta. Asimismo, en el caso de las focas, la fórmula dentaria y el grado de desgaste de los dientes nos aportarán información sobre la especie, así como sobre la edad de los animales. Para la conservación de huesos existen diversas metodologías. Entre las utilizadas deben mencionarse el enterramiento y la maceración en agua caliente con sustancias degradantes de proteínas y soluciones antigrasas. Todos estos procedimientos eliminan en gran medida los restos orgánicos adheridos a los huesos, pero para su conservación definitiva estos deben someterse a una posterior limpieza con agua oxigenada, que además tiene un efecto blanqueante.

El simple dato del conocimiento de la especie nos permitirá relacionar todos nuestros hallazgos posteriores con ella, pero por sí solo, la identificación de la especie nos aporta información de

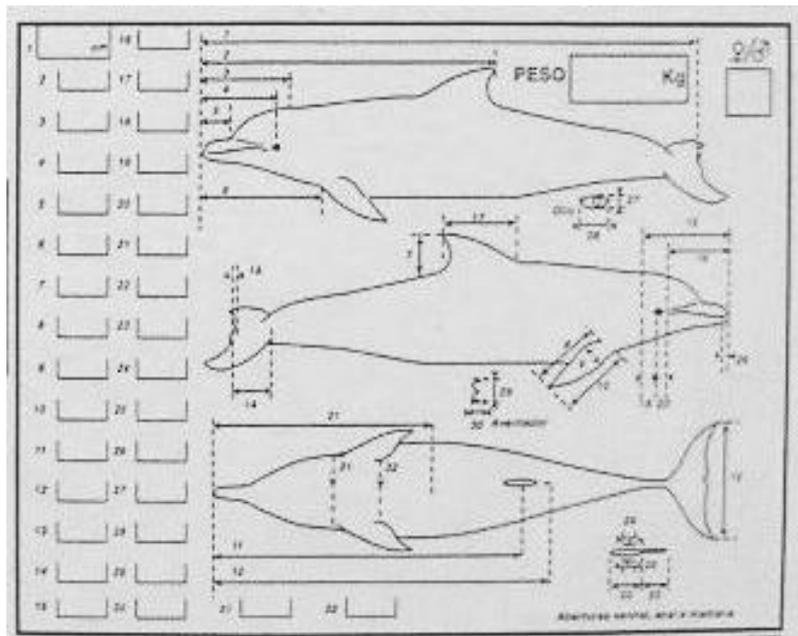
interés sobre la distribución geográfica de la misma. Muchas especies se consideran como presentes en ciertas áreas geográficas, tan sólo gracias a datos de varamientos en esa zona. Asimismo, en diversas especies de cetáceos de hábitos oceánicos y/o de comportamientos discretos, de enorme dificultad de identificación y estudio en el mar, sólo llegan a conocerse datos exactos sobre patrones de coloración y rasgos anatómicos externos definitorios de la propia especie, gracias a la oportunidad que brindan los varamientos y los estudios post-mortem.

Por todo ello, resulta muy recomendable realizar fotografías completas de ambos lados de los animales, de las aletas dorsal y caudal (también por ambos lados), de los dientes, así como de marcas concretas o particularidades de la coloración, para adjuntarlas a la hoja de morfometrías, y almacenarlas para futuras referencias.

Morfometrías, peso y medición del panículo adiposo

Las medidas morfométricas que deben incluirse en toda ficha de necropsia han sido, son y, probablemente serán, objeto de controversia entre los responsables de los estudios post-mortem a realizar con un animal varado. Hay Redes de Varamiento que toman apenas diez medidas externas, y en cambio otras que pueden llegar a tomar más de cincuenta. Decidir las medidas que se incluirán en el protocolo y las que no, no es un trabajo fácil. La opinión de los autores es

que cada Red de Varamiento debe definir las medidas morfométricas que necesita tomar en cada animal, en función de los estudios en curso, o bien en previsión de futuros trabajos. Se remite a cualquier persona que deba decidir sobre el respecto en cetáceos, al trabajo de Keneth Norris, publicado en el *Journal of Mammology* en 1961 (*J. Mamm.* 42: 471-476), y titulado: “Standardized methods for measuring and recording data on the smaller cetaceans”.



El ejemplo de ficha de recogida de biometrías externas de la CEMMA, en Galicia, ilustra el gran nº de medidas que pueden tomarse.

Con todo ello, las medidas morfométricas tienen diferentes utilidades, y por tanto algunas de ellas resultan imprescindibles en las hojas de necropsia y recogida de datos. **Las medidas consideradas imprescindibles a recoger en el proyecto LIFE serían: la longitud total y los perímetros torácicos por delante de las aletas pectorales y dorsal.**

Con un número significativo de animales examinados de varias especies, pueden llegarse a plantear estudios comparativos que ofrezcan criterios taxonómicos diferenciales. Lo mismo

ocurre analizando comparativamente a machos y hembras de una misma especie y clase de edad, lo que permite establecer criterios de dimorfismo sexual. Asimismo, las morfometrías recogidas de los perímetros torácicos aportan información sobre el estatus nutricional del animal.

En cuanto a la metodología de toma de morfometrías, es importante destacar que debe definirse bien si las longitudes a tomar son rectas o curvas. En el caso de los cetáceos es importante destacar que la mayoría serán rectas y por tanto no deberemos doblar la cinta métrica adaptándola al cuerpo del animal, excepto en la medición de los perímetros corporales.

Siempre que sea posible, debe tomarse el peso de los animales en estados de descomposición M1, M2 y M3. La longitud total del animal y el peso total resultan parámetros de gran importancia para relacionarlos con otros datos extraídos y establecer conclusiones en aspectos reproductivos, de edad, de estado nutricional, etc. Para el pesado de carcasas enteras pueden utilizarse básculas de suelo, y si se pueden levantar los animales con poleas o grúas, utilizaremos básculas colgantes o básculas romanas.

Asimismo, resulta importante para según qué tipo de estudios, el pesado y medición de órganos internos (especialmente importantes resultan para los del estatus reproductivo). Al igual que con las morfometrías externas, el pesado y medición de los órganos internos queda a criterio de los responsables de los estudios post-mortem en función de las investigaciones en curso, o bien de las planteadas para el futuro. Para el pesado de órganos internos se recurrirá a básculas de sobremesa y, a ser posible, de precisión.

Finalmente, otra medida importante a tener en cuenta son los espesores de la capa de grasa de los cetáceos. Estas medidas están relacionadas con el estatus nutricional del animal y en general, pueden dar una idea del estado de degradación metabólica de un animal enfermo. Estas medidas sólo son válidas en animales muy frescos (M1) y frescos (M2), ya que la propia composición de lípidos de la capa de grasa, hace que muchos de ellos se degraden rápidamente por efecto del calor y la autólisis.

Para tomar los espesores de la capa de grasa utilizaremos un pie de rey o calibrador de precisión. Debe tomarse la medida, una vez se ha separado la porción de piel y grasa del tejido muscular subcutáneo, midiendo exclusivamente la capa de grasa sin incluir la piel que lo recubre. En todas las necropsias se tomará el espesor de la capa de grasa en las mismas regiones anatómicas. El lugar de elección se sitúa a nivel de la línea media del animal, a la altura del extremo posterior de la aleta pectoral. De manera ideal, se toman tres medidas de la capa de grasa: (1) en la zona descrita, (2) a la misma altura, pero a nivel dorsal (en la zona del lomo del animal), y (3) a la misma altura, pero a nivel ventral, cerca de la línea media ventral.

Estudios de dieta

Los estudios de dieta se realizan básicamente para conocer los componentes de la alimentación en el mar de las diferentes especies de mamíferos marinos que habitan en una zona determinada. Pero con estos estudios pueden extraerse otros datos de interés relacionados con la alimentación. Una vez identificados los otolitos de peces, o bien los picos de calamar en cefalópodos, podemos realizar estimaciones muy aproximadas del peso y longitudes de estos, utilizando fórmulas de regresión descritas para cada especie. Con esa información podremos estimar datos como los requerimientos energéticos diarios, la ingesta total en un período de

tiempo de un animal, e incluso de una manada concreta. Si queremos aplicar algunos de estos datos a los planes de gestión y de conservación, podremos conocer, por ejemplo, una estimación de la competencia real de los mamíferos marinos de un ecosistema, con la explotación pesquera que se realice en esa misma zona sobre las mismas especies de las que se alimentan ellos.

Durante la necropsia, ***las tres cámaras del estómago pueden congelarse directamente***, aunque lo ideal es abrirlos, procesar su contenido y recoger las muestras pertinentes para el estudio histopatológico, así como la extracción y recuento de los parásitos presentes. Para la extracción de los estómagos se realizan dos ligaduras dobles, una a nivel del esófago distal y la segunda, una vez iniciado el duodeno. Si los estómagos no van a procesarse en fresco, se procederá a colocarlos en bolsas herméticas, a etiquetarlos correctamente y a la congelación a -20°C para su conservación y estudio posterior.

El procesado de los estómagos incluye en primer lugar el pesado del alimento y de los tres estómagos. Si se llevan a cabo estudios específicos pueden tomarse varias medidas morfométricas y de volúmenes del interior de cada una de las cámaras. En función de la especie que estemos necropsiando, el contenido estomacal podrá incluir restos de pescado fresco en diferentes grados de maceración, restos del esqueleto de peces, otolitos y picos de cefalópodos. En el estómago también podremos encontrar (y describir y conservar en caso necesario), parásitos, arena, algas, y objetos extraños.

Para el estudio del contenido estomacal se hace pasar el contenido fresco o descongelado por tamices de 1 mm, 0'5 mm y 0'35 mm, y se fija a continuación en un bote con alcohol 70% hasta su procesado posterior. A continuación se separan y limpian los parásitos y picos de cefalópodos, que se conservan de nuevo en alcohol 70%. Los restos de peces, de esqueletos y los otolitos se secan en estufas a temperaturas entre los 40 y 50 $^{\circ}\text{C}$, y una vez secados se guardan en bolsas de plástico debidamente etiquetados. Para la diferenciación de picos, otolitos y restos óseos de los peces, se utilizarán diferentes guías de identificación de estas estructuras, como las de CLARKE, (1986). *A handbook for the identification of cephalopods beaks*. Clarendon Press, Oxford. 273pp, ó CLARKE (1986). *Cephalopods in the diet of odontocetes*. In Bryden M.M. and Harrison (eds.) Research in dolphins. 281-322.

A pesar de la precisión del estudio de contenidos estomacales, estos datos sólo ofrecen información sobre lo que comió el animal en las últimas horas o últimos días antes de morir, que además en el caso de que sea un animal enfermo (causa común de varamiento) podría reflejar una dieta anormal. Por esta razón, es de gran interés el complementar el estudio de los contenidos estomacales con estudios bioquímicos como el análisis de los perfiles de isótopos estables, que ofrecen información sobre la dieta ya que el perfil isotópico de un animal está relacionado con el de sus presas. Diferentes tejidos presentan distinta tasa de renovación de sus elementos químicos, de modo que analizando tejidos con tasa de renovación media o baja se puede obtener información de la dieta de los animales referida a un período más largo de su vida. Por otra parte, los isótopos estables también ofrecen información sobre el nivel trófico de las especies, ayudando a comprender mejor el papel de esta especie en el funcionamiento global del ecosistema.

Esta investigación, que en el proyecto LIFE desarrolla la investigadora Susana García, necesita de las siguientes ***muestras imprescindibles a recoger en los animales en grados de descomposición 1-3: una porción de 2 x 2 centímetros con todo el espesor de las capas de***

piel, grasa y músculo, a nivel del lomo, en la base anterior de la aleta dorsal. Las muestras se conservan diferenciadas de las demás, bien etiquetadas y en congelación a -20°C .

Estudios de edad

Los estudios sobre la edad de los animales varados nos aportan información para relacionarla con multitud de parámetros eco-biológicos, como la composición de las manadas (al relacionar clases de edad con longitudes totales) o la edad de maduración (al relacionar la edad con diferentes parámetros reproductivos). Pero el conocimiento de la edad de los animales varados también aporta información patológica, ya que, por ejemplo, conocer las clases de edad más afectadas por ciertos agentes infecciosos o tóxicos, o por la captura accidental en redes de pesca, pueden considerarse auténticos estudios epidemiológicos muy útiles en la definición de planes de conservación de especies.

Para la realización de estudios de edad en cetáceos odontocetos y en pinnípedos, se utilizan normalmente los recuentos de las líneas de crecimiento depositadas en los dientes. Para el estudio de la edad en ballenas se pueden estudiar estos mismos recuentos en los huesos del oído (complejo timpano-periótico), aunque la metodología resulta mucho más complicada. Finalmente, en las tortugas, puede determinarse la edad mediante estudios de las líneas de crecimiento en diferentes huesos, generalmente en huesos largos como el húmero.

La metodología de recogida y conservación de los dientes es relativamente sencilla. Normalmente ***se extraen con un cuchillo un mínimo de 5 dientes*** de la zona media de la mandíbula inferior de los cetáceos, con cuidado de no romper ni resquebrajar la estructura del diente. Para ello, en caso de no interesar la conservación del cráneo completo, puede serrarse la porción mandibular completa correspondiente a los dientes a conservar. La conservación de dientes y huesos se realiza mediante congelación a -20°C , o bien en inmersión en alcohol 70%. Existen varias técnicas de estudio tanto para preparar los dientes y huesos, como para realizar y teñir los cortes de los dientes, así como para la lectura de las líneas de crecimiento.

Estudios sobre parámetros reproductivos

Los estudios sobre los parámetros reproductivos de una población concreta siempre se han considerado como imprescindibles para poder evaluar el estado de conservación de esa población. Hay que tener en cuenta además, que los estudios realizados en una especie de cetáceo no son válidos para otras especies diferentes, y que incluso se describen diferencias intraespecíficas, en poblaciones que ocupan hábitats geográficos distintos. Estas variaciones se deben a que los distintos parámetros reproductivos dependen de numerosos factores externos y ambientales como por ejemplo la luminosidad, la dieta, la temperatura, la calidad del agua, etc. En los últimos años, el alto grado de contaminación de las aguas marinas, así como el proceso de bioacumulación que se produce en los mamíferos marinos, han sido demostrados en numerosos trabajos de investigación, que han puesto especial interés en las alteraciones de los diferentes parámetros reproductivos de algunas poblaciones como consecuencia de los contaminantes.

Los estudios de reproducción que pueden desarrollarse a partir de un animal varado son muy numerosos e incluyen, entre otros, la edad y longitud de maduración sexual de machos y hembras, período de ovulación y de partos, tamaño de los neonatos, intervalos entre partos,

duración de lactación, etc. Todos estos estudios sobre los diferentes parámetros de una misma población se realizan a partir del análisis de muchos datos obtenidos de un gran número de ejemplares estudiados de esa misma población, y por tanto suelen ser investigaciones muy prolongadas en el tiempo con objeto de recoger un tamaño de muestra adecuado. Uno de los objetivos inmediatos de estos estudios es la clasificación del estatus reproductivo de los individuos de una población, que podrán clasificarse en: machos inmaduros, pre-púberes ó maduros, y hembras inmaduras, preñadas, en lactación o en reposo.

Así pues, desde el punto de vista práctico, durante la necropsia nos centraremos en el examen macroscópico del tracto genital femenino y masculino, y **la recolección de los ovarios completos, trompas uterinas, útero y glándula mamaria en las hembras, así como de secciones enteras del centro de los testículos en los machos**. Todas las muestras irán debidamente etiquetadas en botes con soluciones de formol al 10%. Asimismo, se recogerá orina mediante punción de la vejiga urinaria con jeringuilla y aguja estéril, y se conservará congelada a -20°C en botes estériles debidamente etiquetados, para posteriores estudios hormonales.

El estudio de los ovarios en el laboratorio se inicia con el pesado y medición de longitud y anchura, y posterior recuento de cicatrices ováricas que se correspondan con cuerpos rojos, lúteos ó blancos. La presencia de cuerpos lúteos puede ser significativa de una gestación, y por tanto habrá que buscar minuciosamente la presencia de fetos en los cuernos uterinos. El recuento se realizará externamente e internamente, realizando secciones seriadas de los ovarios en forma de libro para poder visualizar cualquier cicatriz interna en toda su extensión. Finalmente se realizarán cortes histológicos de los ovarios y de las secciones de glándula mamaria, cuernos y útero. Con los testículos, se realizan medidas y pesado, y cortes histológicos para observar el diámetro de los conductos seminíferos.

Estudios genéticos

En los últimos años, los estudios de genética en poblaciones de mamíferos marinos nos han acercado, entre otras aplicaciones, al conocimiento de ciertos indicadores específicos de una determinada especie, a las relaciones de parentesco entre miembros de grupos sociales, e incluso al establecimiento de relaciones filogenéticas entre diferentes poblaciones de una misma especie.

De todas formas, los estudios genéticos necesitan de cierta infraestructura no siempre accesible para los grupos de investigación. Por ello, los bancos de muestras ponen especial interés en la recogida y conservación de muestras, orientadas a la realización de estudios genéticos en el futuro. Esto se ve favorecido por el hecho de que casi de cualquier tejido es posible extraer material genético.

Las muestras que suelen recogerse para la realización de estudios genéticos son piel, células sanguíneas y hueso. En un segundo orden de prioridad pueden recogerse tejido muscular u otros órganos internos como secciones de hígado. **Para la conservación de piel, se recogen no menos de 5 pequeñas tiras de unos 3 x 1 cm de la zona dorsal del cetáceo**. Cada tira se coloca en un bote con Dimetilsulfóxido (DMSO) comercial tamponado al 10% con solución salina. Alternativamente puede utilizarse alcohol 70% y en ambos casos, se recomienda la congelación posterior de los botes. La sangre debe centrifugarse y conservarse las células y el suero por separado, congeladas a -80°C . Aunque cualquier hueso largo se considera adecuado

para los estudios genéticos, suele recogerse la porción central de unos 5 cm de cualquier costilla, que se coloca en una bolsa de plástico debidamente etiquetada y también se conserva a -80°C .

Patología macroscópica e histopatología

La descripción de los hallazgos y lesiones macroscópicas externas e internas que se observan durante la necropsia son importantes para cubrir la hoja de necropsias en sí y sacar conclusiones preliminares sobre la causa de muerte del animal. Asimismo, también resultan especialmente útiles para incluirlas en el informe que deberá remitirse al laboratorio junto con las muestras recogidas, y que orientará a los patólogos en el momento de extraer sus conclusiones después del análisis histológico. Del mismo modo, resulta altamente recomendable realizar fotografías de todas las lesiones y hallazgos, descritos en la hoja y en el informe de necropsia.

La recogida de muestras para el estudio histológico debe realizarse mediante secciones de un máximo de 1 centímetro de espesor. Esto se debe a que la perfusión del formol en los tejidos se estima en 0,5 centímetros, y por tanto, en muestras más gruesas que 1 centímetro (0,5 cm por cada lado de penetración) se producirá una autólisis del tejido más profundo, interfiriendo negativamente en el estudio histológico. Podemos considerar como un tamaño suficiente para el envío al laboratorio de secciones de 3x3 centímetros en extensión y 1 centímetro de grosor. Si la muestra a conservar es mayor en extensión y en grosor (p.e. cerebros enteros), es muy recomendable realizar secciones completas cada centímetro en toda la extensión de la muestra, con el fin de permitir la correcta penetración del formol. La solución de formol a utilizar será al 10%, y la relación idónea entre los volúmenes de muestra y formol será de 1:10.

Deben recogerse muestras de TODOS los tejidos incluidos en el protocolo de muestreo, en TODOS los animales muestreados, aunque siempre atendiendo a su estado de descomposición. Esto significa muestrear tejidos con lesiones, y también tejidos que macroscópicamente tengan una apariencia sana. La experiencia indica que hasta haber realizado el estudio histopatológico de un tejido, no podrá descartarse una patología del mismo. Las muestras de zonas lesionadas deberán incluir una porción con lesión y una porción de tejido sano. Resulta especialmente recomendable que los estudios histológicos se realicen en laboratorios especializados, y es imprescindible que los diagnósticos histopatológicos sean realizados por veterinarios patólogos, con formación específica en anatomía patológica de mamíferos marinos.

Enfermedades infecciosas (Bacteriología, virología y parasitología)

Entendemos como enfermedades infecciosas las producidas por bacterias, virus, y aunque no puedan considerarse estrictamente infecciosos, incluimos también las enfermedades producidas por parásitos. Las enfermedades micóticas no suelen describirse en mamíferos marinos en libertad.

El estudio bacteriológico es especialmente complicado en cetáceos varados, ya que el rápido proceso de descomposición que se produce en estos, interfiere en los posibles diagnósticos bacteriológicos, impidiendo por ejemplo la diferenciación entre una contaminación post-mortem de origen entérico de una verdadera septicemia ante-mortem. Además, las floras bacterianas “fisiológicas” para determinadas poblaciones de cetáceos no están estudiadas a

fondo, por lo que hallazgos similares en la misma especie pero en poblaciones aisladas geográficamente, no pueden considerarse comparables. Esto supone que cada Red de Varamientos debería realizar un estudio epidemiológico sobre las bacterias que cabe esperar como fisiológicas y como patológicas en la población de cetáceos de su área de trabajo. En caso de no disponer de este tipo de estudio, los análisis bacteriológicos nos podrán servir únicamente para aportar información sobre lesiones o patologías diagnosticadas con otras metodologías (analíticas sanguíneas, diagnóstico macroscópico, histopatología, etc.), y completar de esta manera, los diagnósticos realizados.

Para la recogida de muestras bacteriológicas es de enorme importancia la asepsia para evitar las contaminaciones externas. En función de las preferencias del laboratorio con el que trabajemos y de los medios de cultivo a utilizar, ***se pueden recoger secciones de tejido lesionado, o bien realizar la recogida mediante hisopos, de lesiones o abscesos, así como la recogida mediante jeringuillas, de fluidos en cavidades corporales o sangre para estudios serológicos.*** Resulta especialmente interesante recoger ***secciones de bazo***, ya que al tratarse de un órgano linfóide que se encuentra en el torrente circulatorio, los aislamientos de ciertas bacterias en este órgano serán indicativos de infección bacteriana, y de una posible septicemia.

En todos los casos el material utilizado debe estar estéril (bisturí, agujas, jeringuillas o hisopos), y en el caso de los hisopos, deberá desinfectarse con alcohol de 70° la superficie del tejido por donde se introducirá el hisopo. Las secciones de tejido deben transportarse al laboratorio refrigeradas y en bolsas de plástico de cierre hermético, los fluidos en botes refrigerados y los hisopos refrigerados o en su propio medio de cultivo. Si es necesario conservar las muestras para estudios bacteriológicos posteriores, es conveniente congelarlas a temperaturas de -70°C .

Los estudios virológicos han tomado especial relevancia en los mamíferos marinos, debido a las graves epizootias causadas por morbillivirus que han afectado a varias especies, causando graves problemas de conservación para algunas poblaciones concretas. Las muestras se recogen de manera similar a la descrita para los estudios bacteriológicos, añadiendo en este caso secciones de ciertas estructuras donde los virus pueden identificarse con mayor facilidad. De esta manera, tomaremos muestras de lesiones en órganos, lesiones dérmicas tipo tattoo, y sangre para los estudios mediante serología. ***Cuando exista la sospecha de la presencia de Morbillivirus resulta especialmente importante la recogida, como mínimo por duplicado, de varios linfonodos de todo el organismo, varias secciones de pulmón y del cerebro completo.*** El estudio virológico debería realizarse inmediatamente a la recogida, pero si es necesario almacenar las muestras deberemos hacerlo a temperaturas de -70°C , o en formol al 10% para las muestras destinadas al estudio mediante diferentes técnicas microscópicas para la localización de sincitios virales en órganos.

Finalmente, podemos considerar a **las parasitaciones** como las alteraciones orgánicas más frecuentes en los mamíferos marinos. De todas formas, la capacidad patógena de las diferentes especies que parasitan tortugas y mamíferos marinos es muy variable, en función de la especie parásita, de su estado de desarrollo, así como de la localización en el huésped o el número de organismos parásitos presentes. En mamíferos marinos debemos poner especial interés en la exploración del tracto respiratorio completo (incluyendo espiráculo, sacos nasales, senos perióticos, tráquea y vías respiratorias pulmonares) y del sistema digestivo completo (incluyendo esófago, las tres cámaras del estómago y sus paredes, lavado del intestino y una exploración con secciones seriadas de todo el hígado).

Antes de la recolección de los parásitos conviene detallar el número, la localización y el tipo de lesiones provocadas, así como realizar fotografías de los parásitos y de las lesiones. Para la recolección, se usarán pinzas atraumáticas, y se intentará recoger el parásito entero (especialmente importante en parásitos largos de pulmón). Una vez recogido, si el parásito presenta restos de tejido o sangre, podemos rociarlo a baja presión utilizando una jeringuilla con suero fisiológico, y posteriormente colocarlo en una solución de alcohol al 70°. Las lesiones que hayan podido producir en los tejidos se conservarán en formol al 10% conjuntamente con las muestras de histopatología.

Patologías no infecciosas (Traumatismos, desnutrición, toxicología y patología acústica)

Las patologías no infecciosas que pueden provocar lesiones en mamíferos marinos son muy numerosas, y al menos deben conocerse en extensión las presentadas a continuación, por considerarse como las más frecuentes, y causantes de graves alteraciones orgánicas, e incluso como causa directa de muerte.

Los traumatismos son un grupo genérico de lesiones que incluyen multitud de etiologías diferentes. Desde mordeduras de tiburón, rozaduras peri-mortem o post-mortem contra rocas o arena, orificios por picadura de gaviota, interacciones intra o interespecíficas, golpes o heridas producidas por pescadores, hasta los traumas producidos por redes de pesca, es conveniente conocer todo el amplio abanico de lesiones producidas por cada una de ellas para realizar un diagnóstico certero.

Hoy en día, las capturas accidentales de cetáceos con artes de pesca, conocidas también por su abreviatura inglesa “by-catch” (por-captura), son reconocidas como una de las causas de muerte de estos animales más frecuentes en aguas de todo el mundo. Prácticamente en todos los mares donde coexisten artes de pesca de enmalle y mamíferos marinos, se producen interacciones mortales para estos últimos. Las proporciones anuales de capturas accidentales para ciertas especies superan en muchas ocasiones el 10% de las poblaciones de determinadas zonas, lo que las coloca fuera de los límites biológicos que aseguren una supervivencia de la población. Los criterios para el diagnóstico de una captura accidental han sido descritos ampliamente en el trabajo de Kuiken (1994) *Review of the criteria for the diagnosis of by-catch in cetaceans*, incluido en la European Cetacean Society Newsletter nº 26, special issue.

Las interacciones violentas entre ejemplares de diferentes especies de cetáceos, principalmente ataques de delfines mulares a otras especies de delfines y marsopas, han sido recientemente descritas a través de hallazgos de necropsia en diferentes zonas del mundo, incluyendo España, y corroboradas en ocasiones por la observación directa de éstas. Como la observación directa de agresiones se puede considerar un hecho fortuito, el diagnóstico de estas interacciones violentas debe basarse en una serie de indicios encontrados durante la realización de una minuciosa necropsia.

Entre los hallazgos más destacables que pueden orientar un diagnóstico de este tipo de interacciones, destacamos las siguientes: (1) marcas longitudinales de dientes de la especie agresora en la piel del agredido (aprox. 1cm de distancia interdientaria para *Tursiops truncatus*, y 0'5 cm para *Stenella coeruleoalba* y *Delphinus delphis*), (2) marcas con heridas penetrantes de dientes, (3) hemorragias subcutáneas en la zona cervical y torácica, (4) hemorragias

musculares en la zona cervical y torácica, (5) hemorragias en los músculos dorsales anteriores del lomo, (6) lesiones en la escápula, en costillas ó en vértebras cervicales o torácicas (fisuras, fracturas).

La desnutrición es un proceso que puede ser diagnosticado mediante analíticas sanguíneas, cambios histopatológicos en ciertos órganos, y durante la necropsia, realizando un diagnóstico macroscópico del estado nutricional del animal varado. En general, pueden describirse 4 categorizaciones de los distintos estados nutricionales de una tortuga o un mamífero marino.

Código de Estado Nutricional	Características externas
EN 1	Animales en muy buen estado nutricional. Aspecto rollizo, grasa abundante en el panículo adiposo y en el subcutáneo. La zona cervical y del cuello de los delfines presenta un ligera convexidad, y el resto de la musculatura dorsal forma una clara convexidad.
EN 2	Animales en estado nutricional normal: aspecto normal, grasa del panículo dentro del rango para la especie, poca grasa subcutánea. La zona cervical y del cuello de los delfines son totalmente rectos, y el resto de la musculatura dorsal forma una leve convexidad.
EN 3	Animales en mal estado nutricional. Aspecto cóncavo de la musculatura dorsal de los delfines, ligera depresión en el cuello, por detrás del cráneo, panículo adiposo ligeramente por debajo del rango normal de la especie. Las costillas se marcan externamente.
EN 4	Animales en estado nutricional extremadamente malo. Aspecto delgado muy evidente. Todas las características de EN 3 en grado extremo. La musculatura y la grasa casi han desaparecido de sus zonas normales.

Toxicología

El alto número de trabajos dedicados al estudio de la presencia de sustancias contaminantes en el medio marino ha puesto de manifiesto un preocupante aumento en los niveles de éstos en los animales que se encuentran en el escalón superior de la cadena trófica. Los mamíferos marinos cumplen este requisito, y por tanto son animales especialmente vulnerables a la acumulación de contaminantes de origen humano, aunque también influye la larga longevidad de estas especies (con la consecuente acumulación durante años de los contaminantes), así como la gran cantidad de componentes estructurales grasos de estos animales, con gran afinidad por los contaminantes lipofílicos.

Los efectos más graves de los contaminantes presentes en la cadena trófica marina en las tortugas y mamíferos marinos se producen en los sistemas digestivo, endocrino, nervioso, inmunitario y reproductor, por lo que las poblaciones afectadas reducen drásticamente sus efectivos. Esta reducción se produce por un mayor índice de mortalidad (los animales, debido a la inmunosupresión, son más vulnerables a las enfermedades) y por los problemas

reproductivos (menores tasas de fertilidad, menor número de nacimientos, mayor número de abortos...).

Los estudios toxicológicos más frecuentes en mamíferos marinos, incluyen los análisis de metales pesados y de contaminantes orgánicos. Los muestreos a realizar con cada tipo de análisis se definirán en función del laboratorio con el que se vaya a trabajar, pero rutinariamente definimos como *muestras mínimas* las siguientes:

- *columna de músculo y grasa; superficie de 5x5 cm de la zona dorsal, posteriormente a la aleta dorsal.*
- *parte central de unos 5 cm de una de las costillas (sólo para metales pesados)*
- *una porción de 5x5x2 cm de la zona central del hígado*
- *una sección entera de riñón*
- *sangre entera en tubos de plástico*

Las muestras se recogerán por duplicado y deberán conservarse individualmente en bolsas de plástico (metales pesados) y envueltas en papel de aluminio (contaminantes orgánicos). Posteriormente se congelan a -20°C , debidamente etiquetadas.

Patología acústica

El sonido se transmite mucho más rápido y con mayor nitidez bajo el agua que en el aire. Este hecho provoca que fuentes de sonidos inducidas por el hombre que producen niveles tolerables de ruido ambiental en el aire, al producirse bajo el mar se magnifiquen originando una contaminación acústica del medio marino que ocasiona desde leves molestias a los animales marinos, hasta graves lesiones incompatibles con la vida. Las colisiones de *fast-ferries* con cachalotes cuya capacidad auditiva estaba disminuida por efecto de la contaminación acústica en zonas de intenso tráfico marítimo, o bien las mortalidades masivas de algunas especies de cetáceos como los zifios, durante maniobras militares en las que se usaban sónares activos de baja frecuencia (LFAS), iniciaron hace relativamente poco tiempo el estudio de los efectos negativos de la contaminación acústica en los cetáceos.

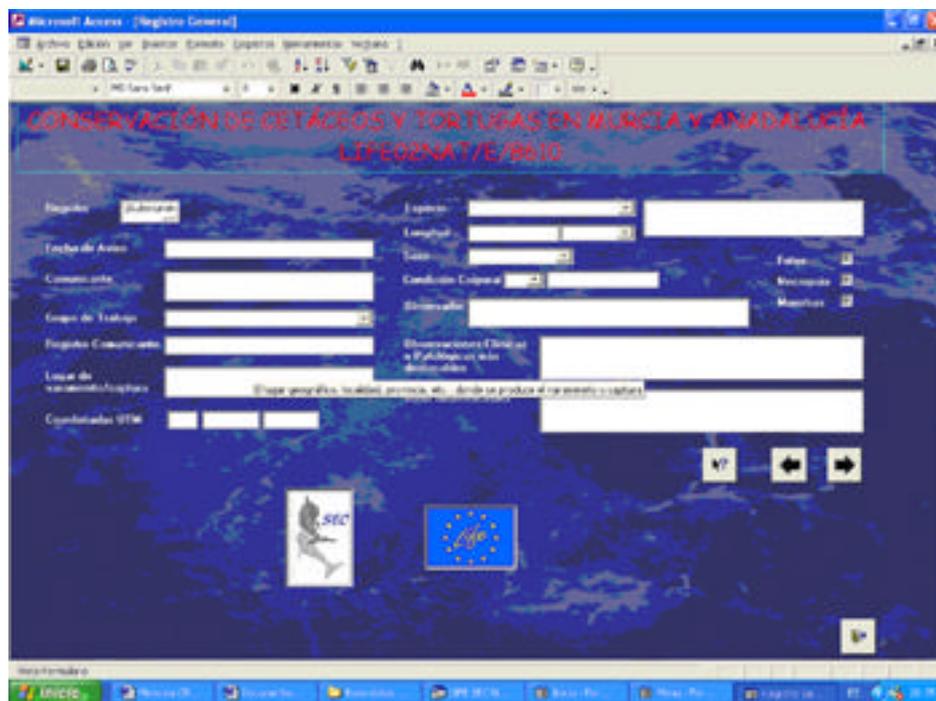
Para los estudios de patologías acústicas es necesaria la presencia de personal cualificado y con experiencia en este campo de trabajo durante la necropsia. La complicada evaluación de lesiones “in situ” asociadas a traumas acústicos, así como la dificultad en realizar una correcta recogida de muestras para su estudio en el laboratorio, hacen necesaria una alta especialización del personal involucrado.

Si no se puede realizar una exploración de la región de los oídos en el momento de la necropsia (falta de tiempo o de personal cualificado), *debe extraerse y congelarse la cabeza entera del cetáceo para su posterior estudio en el laboratorio.* Con una cabeza congelada, es posible incluso un estudio de la región de los oídos mediante tomografía computadorizada. Una vez extraídos los oídos, debe inyectarse mediante una jeringuilla, a la menor presión posible, formol al 10% a través de la ventana redonda, para permitir la fijación de los tejidos internos. Una vez realizada la operación todo el oído se sumerge igualmente en una solución de formol al 10%. Los estudios a realizar a partir de la extracción de los oídos son diversos e incluyen resonancias magnéticas en campos magnéticos de alta intensidad, y cortes histológicos de los oídos.

Base de datos para cetáceos y tortugas marinas varados o capturados accidentalmente en Murcia y Andalucía

La puesta en marcha de la base de datos (BDD) común, en la que se recojan todos los varamientos o capturas accidentales de cetáceos y tortugas en Andalucía y Murcia se considera un producto del proyecto LIFE. La estructura definitiva de la base de datos ha sido discutida entre los distintos centros y entidades responsables de la atención a varamientos, y el debate ha sido abierto a los coordinadores del GT de Varamientos, para que estudiaran el interés y las posibilidades de adoptarla para toda la costa española. Una vez completada, la BDD será la herramienta que permitirá realizar análisis exhaustivos relacionados con la dinámica de varamientos por especies, sexos, zonas de mayor número de varamientos, etc.

A continuación se adjunta el modelo definitivo del formulario de entrada de datos de la BDD propuesta, así como una breve descripción de los campos que contiene:

The image shows a screenshot of a web-based data entry form titled "CONSERVACIÓN DE CETÁCEOS Y TORTUGAS EN MURCIA Y ANADALUCÍA LIFE GENAT/E/9610". The form is displayed in a Microsoft Access window. It contains several input fields and dropdown menus for recording capture or stranding data. The fields include: "Especie" (Species), "Fecha de Aviso" (Date of report), "Comunicante" (Reporter), "Grupo de Trabajo" (Working group), "Lugar de varamiento/captura" (Stranding/capture location), "Coordenadas UTM" (UTM coordinates), "Especie" (Species), "Longitud" (Longitude), "Latitud" (Latitude), "Condición Corporal" (Body condition), "Sexo" (Sex), "Edad" (Age), "Estado de conservación" (Conservation status), "Observaciones" (Observations), "Fecha" (Date), "Recorrido" (Route), and "Muestreo" (Sampling). There are also buttons for "Nuevo" (New), "Volver" (Back), and "Avanzar" (Next). Logos for "SEC" and the European Union are visible at the bottom of the form.

Descripción de los campos a rellenar en el formulario de registros:

Registro: el programa asigna números correlativos de forma automática a cada registro.

Fecha de aviso: con el formato dd/mm/aaaa. Es la fecha en la que se produce el varamiento o la captura.

Comunicante: persona que comunica el aviso.

Grupo de trabajo: Centro o institución que atiende el varamiento, que recoge los datos del animal y los aporta a la BDD. Se escoge de un cuadro desplegable, en el que previamente han sido introducidos las entidades que trabajan en cada zona.

Registro Comunicante: código de registro en la base de datos propia de cada centro o entidad que comunica el varamiento. Este campo permitirá localizar la totalidad de los datos de cada varamiento en caso de solicitarse al centro o entidad poseedor/a de los mismos.

Lugar de varamiento/captura: el lugar geográfico, provincia, localidad, etc...

Coordenadas UTM: presenta 3 campos: el primero indica un código de 2 cifras y una letra (ej: 30S), el segundo son coordenadas X con 7 dígitos (dato proporcionado por GPS), y el tercero es la coordenada Y con 7 dígitos (dato proporcionado por GPS).

Especie: se escogerá del cuadro desplegable, en el que se almacenarán todos los nombres que se vayan introduciendo en la base de datos. Se introducirá el nombre científico en cursiva, seguido del nombre común sin cursiva.

Longitud: se indicará la longitud total de los animales (LRC en tortugas) en cifras y se escogerá las unidades del cuadro desplegable que hay a continuación.

Sexo: se indicará el sexo de los animales en caso de conocerse (M/ H/ No determinado)

Condición corporal: se escogerá del cuadro desplegable: (1-5)

Observador: Persona que realiza el examen (para las necropsias o muestreos) del animal.

Fotos, Necropsia, Muestras: se marcarán estas casillas cuando se hayan obtenido fotos o muestras o cuando la necropsia completa haya sido realizada.

Observaciones clínicas ó patológicas destacables: si se quiere indicar muy resumidamente algún hallazgo clínico ó patológico ó si el animal ha sido liberado o ha muerto en la recuperación, si el animal ha sido encontrado varado o ha sido capturado, si existen indicios de captura accidental... (hasta 250 caracteres)

Otras observaciones que se quieran hacer constar (hasta 250 caracteres).

LISTADO DE MUESTRAS MÍNIMAS A RECOGER EN UN CETÁCEO



CONSIDERACIONES GENERALES

Recoger en el bote de formol general muestras de las LESIONES con trozos adyacentes de tejido sano.

Recoger varios PARÁSITOS ENTEROS de cada tipo en botes independientes para cada tipo con alcohol de 70°

ETIQUETAS VISIBLES E INDELEBLES con los datos: ESPECIE, FECHA, SEXO y LONGITUD TOTAL, en cada paquete de muestras (formol general, formol reproductor, congelar, tubos con DMSO o alcohol, parásitos o otros)

FOTOGRAFÍAS externas de ambos lados del animal, detalles de las aletas dorsal y caudal por ambos lados, marcas y lesiones externas y de TODAS LAS LESIONES internas

<u>Tipo de análisis</u>	<u>Muestras</u>	<u>Estado de descomposición</u>	<u>Lugar y método de recogida</u>	<u>Tamaño de muestra</u>	<u>Conservación</u>
Histopatología	Cerebro, cerebelo, médula, pulmón y ln. mediastínicos, pared del ventrículo izq. cardíaco, hígado, bazo, riñón y gl. adrenales, mucosa de los tres estómagos	Sólo estado 2 Estado 3 recoger sólo lesiones.	En zonas lesionadas, recoger muestras con parte de zona sana adyacente.	Muestras de 3cm X 1cm. Consideraremos que el formol puede penetrar 0'5 cm, por lo que nunca habrá muestras más gruesas de 1 cm. Si cogemos muestras mayores, debemos realizar cortes para que el formol pueda penetrar en todo el espesor.	Formol al 10%. La proporción de formol / muestra debe ser 10:1
Genéticos	Piel Sangre Hueso	Estados 2, 3 y 4, excepto sangre (sólo 2)	Zona dorsal Corazón o grandes vasos. Con jeringuilla. Costilla, zona central	10 muestras de 3cm X 1cm 5 muestras de 5 ml Trozo de 5 cm	Botes indiv. de DMSO (5) y alcohol de 70° (5) Centrifugar, separar y congelar Congelado
Dieta Isótopos estables	Contenido estomacal Músculo y grasa	Estados 2, 3 y 4	Tres estómagos Músculo y grasa en zona dorsal por detrás de la aleta dorsal.	Contenido completo Porción de 2cm x 2cm	Congelado. Si sólo quedan picos de cefalópodo o otolitos de pescado, colocar en alcohol de 70° Empaquetar aparte y congelar
Edad	Dientes	Todos	Hemi-mandíbula izquierda, zona central.	6-8 dientes	Congelados o en alcohol de 70°
Reproducción	Gónadas Orina	Estados 2, 3 y 4	Medir y pesar gónadas y contar cicatrices ováricas. Marcar el ovario izquierdo. Orina mediante punción aséptica de la vejiga.	Ovarios enteros y testículos con epidídimo enteros. Corte sagital entero de útero y trompas. Orina 10 ml.	Formol al 10%. En botes específicos para gónadas. Orina en bote específico y congelada.
Bacteriología	Lesiones y fluidos de las cavidades	Sólo estado 2	Recogida aséptica con hisopos, bisturís flameados o jeringuillas	Hisopos de envío inmediato o botes individuales	Envío inmediato al laboratorio o congelación a -72°C (en su defecto -20°C)
Virología	Lesiones cutáneas tipo tatoo, linfonodos, suero	Sólo estado 2	Recogida aséptica con bisturí o jeringuillas	Botes individualizados. Linfonodos enteros.	Congelación a -72°C (en su defecto -20°C)
Parasitología	Propios parásitos y en su caso, lesiones producidas	Recoger 2 y 3 Documentar 4	Documentar número, localización y tipo de lesión provocada	Muestra representativa. Extremar cuidado en extraer parásitos enteros. Botes distintos para los diferentes tipos de parásitos.	Alcohol de 70°. Rociar (limpiar) los parásitos con suero fisiológico antes de su colocación en los botes con alcohol.
Toxicología (Metales pesados)	Músculo, grasa, hígado, hueso, riñón y sangre	Estados 2 y 3 Músculo, grasa y hueso en 4	Músculo y grasa en zona dorsal por detrás de la aleta dorsal. Parte central de una costilla.	Muestras de 5cm X 5cm X 5cm. Corte sagital entero de riñón. Sangre entera. Parte central costilla.	Colocados en bolsas de plástico individuales y congelados a -20°C.
Toxicología (Contaminantes orgánicos)	Músculo, grasa, hígado, riñón y sangre	Estados 2 y 3 Músculo, grasa en 4	Músculo y grasa en zona dorsal por detrás de la aleta dorsal.	Muestras de 5cm X 5cm X 5cm. Corte sagital entero de riñón. Sangre entera.	Empaquetados individualmente en papel de aluminio y congelados a -20°C.

Listado de datos y muestras IMPRESCINDIBLES a recoger en todos los animales, durante el transcurso del proyecto LIFE

Muestreo mínimo para situaciones de emergencia:			
<i>Información mínima:</i>			
Especie	Fotografías		
Longitud total	Hoja de necropsias completada		
Peso			
Sexo			
<i>Muestras mínimas:</i>			
<i>Muestra</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Para</i>	<i>Como</i>
Dientes	5	Edad	Congelado
Piel	3 x1 cm	Genética	En DMSO ó alcohol
Estomago	Congelar entero	Alimentación	Congelado ó procesado
Sangre	>10 ml	Serología	Centrifugada, separando el suero de las células y congelados por separado
Ovarios	Enteros	Reprod.	En formol
Grasa y músculo	20 g	Toxicología	Ver apart.
Columna de grasa y músculo	2 x 2 cm x espesor de toda la columna	Isótopos estables	Congelado

MUY IMPORTANTE:

Colocar ETIQUETAS VISIBLES E INDELEBLES con los datos: ESPECIE, FECHA, SEXO y LONGITUD TOTAL, en cada paquete de muestras POR SEPARADO.

FOTOGRAFÍAS externas de ambos lados del animal, detalles de las aletas dorsal y caudal por ambos lados, marcas y lesiones externas y de TODAS LAS LESIONES internas