



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PÚBLICO SOBRE EL
COMPORTAMIENTO Y LOS NIVELES DE CORTISOL
EN EL MANATÍ ANTILLANO (*Trichechus manatus manatus*)**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

CLAUDIA VILLANUEVA GARCÍA

TUTOR

MARTA C. ROMANO PARDO

COMITÉ TUTORAL

FRANCISCO GALINDO MALDONADO

DULCE MA. BROUSSET HERNÁNDEZ-JÁUREGUI



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción o intercambio bibliotecario.

Biól. Claudia Villanueva García

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, no tengo palabras para agradecer el apoyo que me han brindado siempre, y a pesar de no estar de acuerdo en todas mis decisiones, sé que cuento con ustedes. Nuevamente, muchas gracias a Villanueva's foundation, sabes que no hubiera sido posible sin tu ayuda.

A la Dra. Romano por ser más que una asesora para mí, gracias por estar siempre cuando la necesité, no sólo académica sino también personal y emocionalmente.

A todos mis profesores de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y a todo el personal de la misma por toda la asesoría y ayuda.

A CONACYT por apoyarme con una beca durante el transcurso de mi maestría.

A todo el equipo del laboratorio del CINVESTAV: Luzma, Marcela, Sra. Araceli, Ricardo, Sandra, Carolina, Don Jesús, Sra. Teresa, Toño, Pedro, "Güerito", Lorena, Rubén, Sra. Silvia, mil gracias por su asesoría, compañía y ayuda en todo momento.

Al MVZ Fabián Vanoye Lara y al Acuario de Veracruz por permitirme realizar el presente estudio y brindarme todas las facilidades e información requeridas.

Al Dr. David Olivera Gómez por confiar en mí y coleccionar muestras de suero de manatíes de vida libre en Tabasco para el presente estudio.

Al Dr. Benjamín Morales Vela por brindarme muestras de suero del estudio poblacional de manatíes en Quintana Roo.

Al MVZ Mauro Sanvicente y al MVZ Marco Benítez por coleccionar muestras de suero para mi estudio.

Al Centro de Interpretación y Convivencia con la Naturaleza Yumka', por permitirme coleccionar muestras biológicas de los manatíes.

Al Parque Chucté de la Fundación Sandoval Calderas por abrirme las puertas para la toma de muestras biológicas de Colis.

A mis amigos en la maestría, en especial a Sofía, Emilio, Alicia, Ana Luisa, Claudia y Edgar por su apoyo en momentos difíciles.

A mi prima Carmen y mi sobrino Juan-ito por apoyarme y acompañarme en esta etapa de mi vida.

A mis tíos Julio y Yoli por brindarme su casa durante mi estudio en el Acuario de Veracruz.

A mi equipo de animación, Hilda, Leticia, Kenia y Richy.

A mi incondicional Golem.

A mis preciosos, inteligentes y juguetones animales, por haberme hecho esforzar tanto y permitirme aprender un poquito de ustedes. En especial a aquéllos que ya no están: Maxi, Yumka' y Colis. Este estudio no habría sido posible sin ustedes: Jobo, Pepe, Chaca, César, Sabina, Ángel, Dominga, Marina, Silvia, Pablo, Costeña, Xaman, Sisha', Ixchel, Yumha', Ximena, Abril y a los demás manatíes de vida libre.

RESUMEN

El manatí antillano es una especie en peligro de extinción. Se sabe muy poco acerca de su fisiología y comportamiento. No hay indicadores de la especie que permitan evaluar su bienestar en cautiverio y vida libre. Para la evaluación del bienestar en cautiverio, así como técnicas de captura y manejo, se estudió el comportamiento de un grupo en cautiverio (n=8) y se analizaron las concentraciones de cortisol en suero (n=24) y saliva (n=16) de manatíes cautivos y de vida libre. En el análisis conductual se tomó como variable de respuesta el "efecto del público", por lo que se decidió comparar el comportamiento de los animales en días de alta afluencia de visitantes (condición A, n= 30 días, 4920±469 E.E.) vs. baja afluencia (condición B, n=23 días, 1249±113.7 E.E.). Se realizaron barridos durante 212 horas de observación (A, 120 horas; B, 92 horas). Los registros se realizaron durante 4h/día alternando los horarios (9:00-21:00). Primero se obtuvo un catálogo, los principales comportamientos registrados fueron locomoción, alimentación general (alimentación proporcionada, filtración o exploración y coprofagia), descanso, no visualización y cuidado corporal. El análisis no mostró diferencias significativas en la mayoría de los comportamientos de los manatíes en condición A vs. condición B, sólo el comportamiento de no visualización fue significativamente mayor durante la condición B ($p < 0.05$). El suero fue tomado mediante contención física, la saliva se obtuvo bajo consentimiento de los animales, y se determinaron por radioinmunoanálisis. El rango de cortisol sérico (n=24) fue de 5.7-19.7 nmol/l (10.1±D.E. 2.9 nmol/l) y para saliva (n=16) fue de 1.6-4 pg/ μ l (2.8±D.E. 0.6 pg/ml). Estos datos indican que una gran cantidad de público modifican el comportamiento de los manatíes y que el público podría servir como distractor por ser atractivo para los animales, haciendo que su curiosidad les permita estar más disponibles visualmente al público. Sin embargo, existen otras posibilidades como que el movimiento y ruidos del público y el flash de las cámaras pudieran tener un efecto excitante que no es necesariamente benéfico para la especie. Se reportan los primeros valores de cortisol sérico y en saliva para la subespecie *Trichechus manatus manatus*. Se encontró que los manatíes presentan ritmo circadiano en la secreción de

cortisol medido en saliva, el cual presentó mayores niveles de cortisol durante las mañanas, este hallazgo es importante, ya que hasta ahora no se han encontrado evidencias de vestigios o una glándula pineal como tal. Se encontraron diferencias en los niveles de cortisol tanto por sexo como por clase etaria y tipo de hábitat. Los niveles de cortisol sérico entre los manatíes de vida libre capturados con diferentes técnicas variaron significativamente ($U=2$, $p<0.05$). Por lo tanto, deben de establecerse medidas para el correcto mantenimiento de los animales en cautiverio, y deben de ser evaluados a detalle los diferentes procedimientos de captura y manejo de los manatíes para implementarse.

ABSTRACT

The West Indian manatee is an endangered species. The knowledge of the physiology and behaviour of these animals is scarce. There's no indicators of the species to assess their well-being in captivity and free life. For the assessment of welfare in captivity, as well as capture and handling techniques, we studied the behavior of a captive group (n=8), and analyzed the serum cortisol (n = 24) and saliva concentrations (n=16) from captive and wild manatees. The behavioral analysis was taken as a response variable "the public effect", it was decided to compare the behavior of animals in days of high visit public (A condition, n=30 days, 4920 ± 469 EE) vs. low visit public (condition B, n=23 days, 1249 ± 113.7 EE). Scans were performed during 212 observation's hours (A, 120 hours; B 92 hours). The registers were made during 4h/day alternating schedules (9:00-21:00).

First, we elaborate a catalogue, the main behaviors registered were locomotion, general feeding (proportionate food, filtration or exploring and coprophagy), resting, hiding and body care. The analysis didn't show significant differences in condition A vs. condition B in the most part of the manatee's behaviors ($p < 0.05$). The serum was collected through physical containment, the saliva was obtained under consent of the animals, and were determined by radioimmunoassay. The range of serum cortisol (n = 24) was 5.7-19.7 nmol/l (10.1 ± 2.9 nmol/l) and saliva (n = 16) was 1.6-4 pg/ μ l (2.8 ± 0.6 pg/ μ l). These results indicate that a high number of public modify the behaviour of manatees and the public could be used as a distractor for be attractive for the animals, doing that they curious let them be more visual disponible. Although, there are another possibilities that the movement and the noise of the public and the camera's flash could have an excitement effect that it isn't necessarily benefic for the species. We reported the first serum and salive cortisol concentrations for the subspecies *Trichechus manatus manatus*. We found a possible circadian rhythm in the salive cortisol secretion, which presents higher levels during the mornings, this finding is important, until now there's no evidence of vestiges of a pineal gland. We found differences in the cortisol levels between sex, age and habitat. The serum cortisol levels among wild

manatees who were caught with different techniques varied significantly ($U=2$, $p<0.05$). Therefore, measures should be established for the proper maintenance of the animals in captivity, and must be evaluated in detail the various procedures of manatee's capture and handling, to be implemented.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación actual del orden Sireniidae.....	2
1.2. Manatí Antillano, <i>Trichechus manatus manatus</i> (<i>T. manatus manatus</i> Linnaeus).....	3
1.3. Situación actual de los manatíes en cautiverio en México.....	6
1.4. Fisiología del estrés y su evaluación.....	8
1.5. Metabolismo del cortisol y su evaluación.....	9
1.6. Evaluación de cambios en el comportamiento de los animales.....	11
1.7. Comportamiento del manatí.....	11
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
5. METODOLOGÍA	19
5.1. Organismos de estudio.....	19
5.2. Descripción del encierro o hábitat de los manatíes.....	19
5.3. Origen de los manatíes mantenidos en cautiverio.....	22
5.3.1. Acuario de Veracruz (Grupo A).....	23
5.3.2. C.I.C.N. Yumka´ (Grupo B).....	24
5.3.3. Centro de Convivencia Infantil de Jonuta (Grupo C).....	25
5.4. Medición del comportamiento.....	25

5.5. Medición de la actividad adrenocortical.....	27
5.5.1. Colecta de muestras de suero y saliva.....	27
5.5.2. Determinación de cortisol.....	28
5.5.3. Cálculos y análisis estadísticos.....	29
5.5.4. Análisis estadístico.....	30
6. RESULTADOS CONDUCTUALES.....	31
6.1. Catálogo de conductas registradas en un grupo de manatíes cautivos en el Acuario de Veracruz.....	31
6.2. Determinación de temporadas de alta y baja afluencia de visitantes al Acuario de Veracruz.....	32
6.3. Evaluación del efecto del público sobre el comportamiento de 8 manatíes cautivos en el Acuario de Veracruz.....	33
7. RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE CORTISOL EN SUERO.....	49
7.1. Validación de la técnica para la medición de cortisol en suero en el Manatí Antillano.....	49
7.2. Evaluación de la obtención de muestras séricas con diferentes medios (suero y plasma) para la medición de cortisol sérico en Manatíes Antillanos....	54
7.3. Determinación del rango de cortisol sérico para la especie en cautiverio y vida libre por medio de la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).....	55
7.4. Evaluación de cortisol sérico en manatíes de vida libre y su comparación con animales mantenidos en cautiverio.....	56
7.5. Niveles de cortisol sérico: influencia del sexo, edad, tipo de hábitat y técnicas de captura.....	57
8. RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE CORTISOL EN SALIVA.....	61
8.1. Estandarización de la técnica en el laboratorio para la medición de cortisol en saliva con la prueba de tritio en el Manatí Antillano.....	61
8.2. Niveles de cortisol en saliva: Influencias en la toma de muestra por horario de colecta y sexo.....	64
9. DISCUSIÓN.....	67

9.1. Evaluación del efecto del público sobre el comportamiento del manatí antillano en cautiverio.....	67
9.2. Determinación de cortisol sérico y en saliva en el Manatí Antillano.....	69
10. CONCLUSIONES.....	71
10.1. Evaluación del efecto del público sobre el comportamiento del Manatí Antillano en cautiverio.....	71
10.2. Determinación de cortisol sérico y en saliva de manatíes antillanos en cautiverio y vida libre.....	71
11. REFERENCIAS.....	73
12. APÉNDICES.....	82
Apéndice 1. Horarios de alimentación de los manatíes del Acuario de Veracruz	92
Apéndice 2. Fórmula láctea de una cría de manatí de un año de edad.....	93
Apéndice 3. Comparación por sexo del tiempo empleado en cada categoría de comportamiento individual.....	94
Apéndice 4. Comparación por clase etaria del tiempo empleado en cada categoría de comportamiento individual.....	95
Apéndice 5. Relación de las muestras séricas obtenidas de 28 manatíes antillanos.....	96
Apéndice 6. Origen de las muestras séricas obtenidas de 28 manatíes antillanos.....	97
Apéndice 7. Relación de las muestras de saliva obtenidas de 16 manatíes antillanos en cautiverio.....	98
CUADROS	
Cuadro 1. Origen y condiciones del encierro y tipo de hábitat de 27 manatíes antillanos.....	24
Cuadro 2. Sexo y edad de 7 manatíes del Acuario de Veracruz.....	32
Cuadro 3. Listado de principales pautas de comportamiento registradas.....	32

Cuadro 4. Tiempo empleado en las principales pautas de comportamiento de siete manatíes antillanos en cautiverio.....	42
Cuadro 5. Comparaciones de las proporciones de tiempo empleadas en los comportamientos registrado en siete manatíes antillanos, en días de baja y alta afluencia de público en el Acuario de Veracruz.....	45
Cuadro 6. Comparación de la proporción del tiempo empleado en cada subcategoría de alimentación de siete manatíes antillanos, en días de baja y alta afluencia de público en el Acuario de Veracruz.....	46
Cuadro 7. Listado de muestras de suero concentradas utilizadas para la curva de dilución.....	58
Cuadro 8. Relación de los niveles de cortisol sérico de 28 manatíes antillanos en cautiverio y vida libre.....	65

FIGURAS

Fig. 1. Importancia del manatí en el ecosistema.....	8
Fig. 2. Gráfica del número de visitantes en días de alta y baja afluencia.....	33
Fig. 3. Croquis del manatario del Acuario de Veracruz.....	44
Fig. 4. Gráfica del porcentaje de tiempo empleado en locomoción de siete manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....	47
Fig. 5. Gráfica del porcentaje de tiempo empleado en descanso de siete manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....	47
Fig. 6. Gráfica del porcentaje de tiempo empleado en alimentación proporcionada de siete manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....	48
Fig. 7. Gráfica del porcentaje de tiempo empleado en filtrar de siete manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....	48
Fig. 8. Gráfica del porcentaje de tiempo empleado en coprofagia de siete manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....	49

Fig. 9. Gráfica del porcentaje de tiempo en que no fueron visualizados los siete manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**49**

Fig. 10. Gráfica del porcentaje de tiempo empleado en el cuidado corporal de siete manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**50**

Fig. 11. Gráfica de los promedios (\pm E.E.) de tiempo empleados en la locomoción de siete manatíes antillanos en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**51**

Fig. 12. Gráfica de los promedios (\pm E.E.) de tiempo empleados en el descanso de siete manatíes antillanos en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**52**

Fig. 13. Gráfica de los promedios (\pm E.E.) de tiempo en que los siete manatíes antillanos no fueron visuales en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**52**

Fig. 14. Gráfica de los promedios (\pm E.E.) de tiempo empleados en el cuidado corporal de siete manatíes antillanos en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**53**

Fig. 15. Gráfica de los promedios (\pm E.E.) de tiempo empleados en la alimentación general de siete manatíes antillanos en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**54**

Fig. 16. Gráfica de los promedios (\pm E.E.) de tiempo empleados en la alimentación proporcionada de siete manatíes antillanos en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**55**

Fig. 17. Gráfica de los promedios (\pm E.E.) de tiempo empleados en la coprofagia en siete manatíes antillanos en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**56**

Fig. 18. Gráfica de los promedios (\pm E.E.) de tiempo empleados en filtrar de siete manatíes antillanos en temporadas de alta y baja afluencia de público desde el área técnica y pública.....**56**

Fig. 19. Gráfica de regresión lineal para el análisis de la curva dosis-respuesta de una muestra de suero de una hembra juvenil (Sisha´) de manatí antillano.**59**

Fig. 20. Gráfica de regresión lineal para el análisis de la curva dosis-respuesta de una muestra de suero de una hembra adulta (Ximena) de manatí antillano.....	59
Fig. 21. Gráfica de regresión lineal para el análisis de la curva dosis-respuesta de una muestra de suero de un macho juvenil (BA10) de manatí antillano.....	60
Fig. 22. Gráfica del paralelismo del % de unión del anticuerpo con la hormona estándar; con las diluciones decrecientes del extracto de suero de una hembra juvenil (Sisha´).....	60
Fig. 23. Gráfica del paralelismo del % de unión del anticuerpo con la hormona estándar; con las diluciones decrecientes del extracto de suero de una hembra adulta (Ximena).....	61
Fig. 24. Gráfica del paralelismo del % de unión del anticuerpo con la hormona estándar; con las diluciones decrecientes del extracto de suero de un macho juvenil (BA10).....	61
Fig. 25. Comparación de la detección de cortisol sérico de 5 manatíes por diferentes medios (suero vs. plasma). Los valores representan el promedio \pm D.E.....	63
Fig. 26. Distribución de rangos de cortisol sérico por sitio de muestreo.....	64
Fig. 27. Cortisol sérico de 17 hembras de diferentes edades.....	66
Fig. 28. Cortisol sérico de 11 machos.....	67
Fig. 29. Cortisol sérico de 8 crías de manatí antillano.....	68
Fig. 30. Registro de los niveles de cortisol sérico de 2 hembras mantenidas en el Acuario de Veracruz.....	69
Fig. 31. Registro de los niveles de cortisol sérico de 2 machos resguardados en el Acuario de Veracruz.....	69
Fig. 32. Gráfica de distribución de los rangos y las medianas de cortisol sérico de organismos de vida libre (Sian Ka´an, Quintana Roo y Tabasco: Laguna de las Ilusiones, Laguna Barbona y Río San Pedro).....	70
Fig. 33. Gráfica de paralelismo del porcentaje de unión del anticuerpo con la hormona estándar.....	73
Fig. 34. Comparación de eficacia en la detección de niveles de cortisol en saliva en muestras colectadas en diferentes años.....	73

Fig. 35. Comparación de los niveles de cortisol en muestras de saliva de manatíes tomadas voluntaria e involuntariamente.....**74**

Fig. 36. Comparación de los niveles de cortisol en saliva de 5 manatíes durante la mañana y la tarde.....**75**

Fig. 37. Comparación de los niveles de cortisol en saliva entre sexos.....**76**

1. INTRODUCCIÓN

La falta de información para el establecimiento de índices que ayuden a evaluar el “bienestar animal” es una de las principales problemáticas para la correcta elaboración y ejecución de protocolos para el mantenimiento de animales cautivos. En México, por lo general los zoológicos y acuarios sólo se enfocan en tratar de satisfacer las necesidades fisiológicas básicas de los animales (como alimentación y el tipo de encierro), dejando de lado las mentales y conductuales. El analizar si los organismos presentan un repertorio conductual característico o normal para la especie, todavía es un tema muy subjetivo, debido a la falta de estudios de esta índole en fauna silvestre, tanto en vida libre como en cautiverio. Dentro de los animales de zoológico mejor estudiados, se encuentran los primates, sus estándares y prácticas proveen un modelo para otras especies exhibidas en zoológicos y acuarios. Por lo tanto, es evidente la falta de información del manejo y bienestar animal en la mayoría de los animales silvestres, que permitan establecer estándares basados en datos científicos (Agaromoorthy, 2004; Bashaw *et al.*, 2007; Brent *et al.*, 2007; Brousset, 2003).

La creciente preocupación y demanda de las personas y organizaciones de protección animal sobre el mantenimiento y bienestar de los animales silvestres en cautiverio, ha ayudado a que los acuarios y zoológicos empiecen a tomar en cuenta las necesidades fisiológicas y conductuales de los mismos. Se comenzó a cuestionar acerca de si el espacio en que eran resguardados animales de gran tamaño, como los elefantes y ballenas, era lo suficientemente grande o adecuado para el desarrollo del mismo; sin embargo los estudios en primates no-humanos sugieren que la calidad del espacio puede ser más importante que la cantidad. Así mismo se ha encontrado que otro de los factores más importantes para el desarrollo de las conductas normales de los organismos, es el entorno social, esto dependiendo de si son animales que en vida libre viven en grupos o solitarios. Las metodologías de manejo y exhibición para primates no-humanos ha progresado considerablemente en las últimas tres décadas; ése progreso

proporciona un modelo para el manejo de otros animales. Estas herramientas utilizadas en el mantenimiento de elefantes en cautiverio son muy similares a las del mantenimiento de primates en cautiverio (Agaromoorthy *et al.*, 2004; Bashaw *et al.* 2007; Brent *et al.*, 2007; Davey, 2006; Davey *et al.* 2005).

Debido a las diferentes circunstancias ambientales, sociales y del hábitat, en las que los animales cautivos viven a diferencia de los libres, existen conflictos debido a que los organismos muchas veces no pueden desarrollar todas las necesidades biológicas básicas, presentándose anomalías en el comportamiento (agresión, aburrimiento por la falta de estímulos y presentación de enfermedades físicas y psicológicas). Los zoológicos y acuarios tienen la obligación legal y ética de proveer el bienestar holístico en todos los animales bajo su cuidado (Bashaw *et al.*, 2007; Bassett *et al.*, 2003; Brent *et al.*, 2007; Brousset, 2003; Brown y Wildt, 1997; Gutiérrez, 2004).

1.1. Situación actual del orden Sireniidae

Actualmente todos los miembros del orden Sireniidae se encuentran en peligro de extinción. Este orden comprende 2 familias, la Trichechidae (manatíes) y la Dugongidae (que comprende el Dugong y la extinta Vaca Marina de Steller). Existen 3 especies de manatíes, el manatí de las Indias Occidentales (del Caribe), *Trichechus manatus*; el manatí de África, *T. senegalensis*; y el manatí del Amazonas (exclusivo de aguas dulces), *T. inunguis*. El manatí del Caribe presenta dos subespecies, los manatíes de Florida (*Trichechus manatus latirostris*) que son encontrados en el sureste de Estados Unidos, principalmente en Florida, y los manatíes Antillanos (*Trichechus manatus manatus*) que habitan en las costas y canales del Este de México, Centroamérica, las Antillas Mayores y a través de las costas del norte y del este de Sudamérica. La distribución del manatí Antillano en México está limitada al Golfo de México y mar Caribe (Campbell y Gicca, 1979; Villa y Colmenero, 1981; Colmenero, 1984, citados en Becerra, 2003). De la especie *T. manatus*, la subespecie que ha sido mejor estudiada es el manatí de Florida (*T. manatus latirostris*). En lo que se refiere a la subespecie *T. manatus manatus*, los estudios disponibles se han enfocado a su distribución y abundancia, dejando de lado los estudios acerca

de su biología. A pesar de esto, en Mesoamérica, que es el área que abarca gran parte del rango de esta sub-especie, la distribución exacta y el número de manatíes Antillanos todavía se desconoce. Dentro de las principales amenazas (que son de origen antropogénico) que se reportan para la supervivencia de la especie están: la colisión con embarcaciones debido al incremento de actividades turísticas, presión de cacería (actividad residual o de subsistencia) que redujo sus poblaciones en el pasado, pérdida de hábitat (transformación de bosques y humedales por el espacio para espacio de ganadería extensiva, agricultura, explotación maderera, extracción de hidrocarburos, sedimentación y contaminación de los canales de ríos por residuos biológicos y químicos; transformación del hábitat marino-costero para establecer resorts y otras facilidades turísticas; poblaciones aisladas por cambios en la dinámica hidrológica debido a asolvamiento de los afluentes y por obras de infraestructura hidráulica, carretera y control de inundaciones), redes de pesca y falta de infraestructura local para la rehabilitación de manatíes (Auil, 2006; Becerra, 2003; Espinoza y Jiménez, 2006; García y Machuca, 2006; Garzón *et al.*, 1998; González-Socoloske *et al.*, 2006; Guichard *et al.*, 2002; INE, Dirección General de Vida Silvestre, 2000; Iske, 2000; Mandujano, 1996; Manzanilla-Fuentes y Seijas, 2006; Morales, 2006; Quintana-Rizzo, 2006; Ramírez-Jiménez y Olivera, 2006; Requelme, 2006; Rodríguez-Ibañez y Portilla, 2006; Santos-Mariño, 2006; Valverde, 2006).

1.2. Manatí Antillano, *Trichechus manatus manatus* (*T. manatus manatus* Linnaeus)

El manatí es considerado desde 1975, como una especie en peligro de extinción por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), y como vulnerable desde 1982 por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), (SEMARNAT, 2004). En México, es protegido por la Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-1994, (INE, Dirección General de Vida Silvestre, 2000).

El manatí es un mamífero acuático que llega a medir en estado adulto hasta tres metros, siendo la máxima longitud registrada de 4.6 m con peso de entre

500 y 600 Kg en promedio. No se reporta dimorfismo entre sexos. Es de color gris parduzco, de cuerpo fusiforme, la cabeza es de forma piramidal, no tiene cuello aparente por lo que la cabeza se une directamente al tronco y los movimientos de ésta son limitados. Las extremidades anteriores están modificadas en forma de aletas, las cuales son muy flexibles y presentan de tres a cuatro uñas planas y redondas en los extremos, con ellas puede caminar por el fondo, sujetar, abrazar y tocar a otros manatíes o a sus alimentos. Tiene una aleta caudal plana con forma acorazonada. Una particularidad de la especie es que el hocico posee labios móviles que son independientes uno de otro, éstos le sirven para prensar y arrancar hojas y raíces. En el hocico presenta unas cerdas gruesas que son sensibles al tacto. Posee finos pelos, dispersos en todo el cuerpo y se cree que funcionan como la línea lateral en fiburones, para detectar corrientes y para su ubicación. El macho se distingue de la hembra por la posición de la abertura genital, el macho la tiene cercana al ombligo y la hembra cercana al pliegue anal. El macho tiene sus órganos genitales internos, exponiéndolos para el acto sexual. Alcanzan la madurez sexual entre los 5 y 10 años de edad. El apareamiento en vida libre generalmente involucra la persecución de una hembra en estro por un grupo de machos. Hasta ahora no se tiene reportada la máxima edad que puede alcanzar esta subespecie en cautiverio ni en vida libre, se estima que pudiera tener una longevidad similar al de la subespecie del manatí de Florida, la cual ha sido de 60 años en cautiverio (Iske, 2000; Mandujano, 1996; Muñoz, 2003; Self, 2003; Vanoye, 2002; Vanoye, 2006; Villanueva, 2005; Villanueva-García, 2006).

Los manatíes son animales completamente acuáticos, que pueden descansar en la superficie del agua o en el fondo saliendo a respirar cada 2 ó 3 minutos. En situaciones especiales puede mantenerse sumergido, sin salir a respirar hasta por 20 minutos. La turbidez del agua parece no tener efecto sobre el manatí, ya que se les encuentra en aguas totalmente transparentes como en aguas extremadamente turbias; por lo general nadan a una profundidad de uno y tres metros. La mayor profundidad registrada es de 10 m y la menor de 1 m. Normalmente utilizan pasadizos entre la vegetación sumergida. Al parecer,

las corrientes de hasta 6 km/hr no tienen efecto sobre los animales y los desbordamientos de los ríos en época de lluvias permiten que algunos individuos se aventuren a sitios antes inaccesibles. Los manatíes, así como los dugones, tienen un rango metabólico relativamente bajo por lo que no están adaptados a temperaturas frías. Normalmente se les encuentra en aguas tropicales, en sitios con temperaturas entre los 24 y 26°C, los manatíes en vida libre son sensibles al agua fría. En cautiverio se recomienda tenerlos en rangos de temperatura entre los 23° y 29°C, ya que cuando son mantenidos por debajo de los 20°C se han observado cambios en su comportamiento y pérdida del apetito. Temperaturas arriba de los 31°C puede resultar en una depresión y pérdida del apetito en huérfanos jóvenes. Los individuos adultos pueden adaptarse a variaciones más altas de temperatura, poco más de 32°C. Ocupan hábitats diversos, pudiendo vivir tanto en agua dulce, salobre o salada, aunque prefiere hábitats cercanos a fuentes de agua dulce, con profundidades entre 1.5 y 4.5 m, con presencia de pendientes y vegetación acuática abundante. La subespecie de Florida es la única que se reporta con marcados hábitos migratorios, durante los meses de verano permanecen al norte y durante el invierno al sur de Estados Unidos (Hartman, 1979; Iske, 2000; Villanueva, 2005; Villanueva-García, 2006; Young, 2003).

Las crías nacen en el agua, después de un período de gestación de aproximadamente 13 meses. Por lo general tienen una sola cría cada cuatro a cinco años, llegando a tener en raras ocasiones dos, lo que da como resultado que muera una, o en el peor de los casos las 2 crías. Al nacer la cría mide un metro 10 cm y pesa en promedio 30 Kg. Al momento de nacer, la cría es capaz de nadar junto a su madre, valiéndose únicamente de las aletas pectorales, posteriormente aprende a nadar con la caudal. La cría permanece al lado de su madre por casi dos años, hasta el momento de ser destetada (Self, 2003; Vanoye, 2002).

En los estudios que se han realizado en el Pacífico mexicano, se descubrió que los machos tienen hábitos migratorios y que recorren grandes distancias en comparación con las hembras (Morales en conferencia, 2006). A la vez se ha

reportado que existe conectividad entre las poblaciones del orden Trichechidae, solamente se ha observado heterogeneidad en las muestras de México, donde la población que habita en los lagos en el Golfo de México es homogénea, pero la población de las costas del Caribe es más parecida a aquéllas de Belice y de las Antillas Mayores (Vianna et al., 2006).

Los manatíes de Florida descansan por periodos de dos a doce horas diariamente, comúnmente en sesiones de dos a cuatro horas y en presencia de corrientes frías descansan durante la mayor parte del día y su comportamiento nocturno es similar al realizado durante el día (Hartman, 1979; Self, 2003; Young, 2003).

Aunque los manatíes son principalmente herbívoros, también son detritívoros y coprófagos. Además, consumen incidentalmente junto con los pastos marinos o macrófitas de agua dulce, una gran variedad de invertebrados, y gran cantidad de algas asociadas a estas plantas y muy raramente macroalgas que son de vida libre como el *Sargassum*. Se calcula que los manatíes antillanos necesitan consumir del 7 a 10 % de su peso corporal al día (Hartman, 1979; Vanoye, 2002; Morales, 2000; Morales, 2006; Ortiz y Romero, 2004).

El sistema inmunológico del manatí parece estar fuertemente desarrollado, pero aún falta mucha información acerca del estado de salud de sus poblaciones en México. Sanvicente *et al.* (2005) reporta para las poblaciones silvestres en las costas de Quintana Roo (Bahías de Chetumal y Ascensión), Campeche y Tabasco (Delta del Río Usumacinta), que 22 de 23 manatíes (87%) salieron positivos a una o más de las 12 serovariedades de *Leptospira interrogans* (*bratislava*, 65%; *grippothyphosa*, 43%; *tarassovi*, 30%; *autumnales*, 28%; *pomona*, 28%; *betavia*, 17%; *icterohaemorrhagiae*, 13%; *canicola*, 9%; *hardjo*, 9% y *pyrogenes*, 4%). Esta alta frecuencia fue similar entre sexos: 12 de 13 hembras (92%), y 10 de 11 machos (91%) fueron positivas. Tres hembras (13%) fueron positivas a *T. gondii* y solamente una hembra (4%) fue positiva a *B. abortus*. Para el manatí Antillano se han reportado los siguientes endoparásitos,

Heterocheilus heterocheilus, *Heterocheilus tunicatus*, *Chiorchis groschoffi*, *Chiorchis fabaceus*, *Cochleotrema cochleotrema* y *Moniligerum blain* No obstante, las patologías son raramente asociadas con estos parásitos. Los signos clínicos de las enfermedades o infecciones activas debido a aquéllas bacterias, protozoarios y parásitos no han sido descritos en poblaciones silvestres de los manatíes (Sanvicente *et al.*, 2005; Hernández-Olascoaga y Olivera Gómez, 2006).

En años recientes, en los manatíes de Florida (*T. manatus latirostris*) se han reportado enfermedades tales como *Mycobacterium marinum*, *Toxoplasma gondii*, *Brucella spp* y papilomavirus. Aunque se cree que el papilomavirus en éste, como enfermedad natural, no es común. El primer caso reportado de ésta última fue en 1997, en siete manatíes de Florida (*T. manatus latirostris*) mantenidos en cautiverio en el Parque de Vida Silvestre del estado de Homosassa Springs (Bossart *et al.*, 2002). Las enfermedades ambientales que podrían representar problemas emergentes para los manatíes de Florida incluyen brevetoxicosis y síndrome de estrés por frío (Bossart, 2001). Recientemente, se ha demostrado que la exposición a múltiples agentes estresores, tales como un clima frío y brotes de algas tóxicas (*Karenia brevis*), podrían tener efectos sinérgicos sobre la función inmune de los manatíes (Walsh *et al.*, 2005).

1.3. Importancia ecológica del manatí

El papel ecológico del manatí en los ecosistemas acuáticos dulceacuícolas es único, ya que interviene directamente en el ciclo de producción de las algas y el plancton, el cual está directamente relacionado con la energía solar y los nutrientes disueltos en el agua (Fig. 1). Al ser un animal exclusivamente herbívoro, puede consumir de 30 a 40 Kg. de plantas por día y devolver aproximadamente el 40% de este producto como nutrientes puros otra vez al agua, proporcionando la base de un ecosistema estable y más productivo. En su ausencia, la mayor productividad neta eventualmente llegaría a ser detritus. Además se le considera como un agente eficiente contra malezas acuáticas (jacinto de agua o lirio acuático) y como regulador biológico de plagas

acuáticas asociadas a las plantas en ciertas aguas del trópico, como es el caso de los mosquitos (Vanoye, 2002).

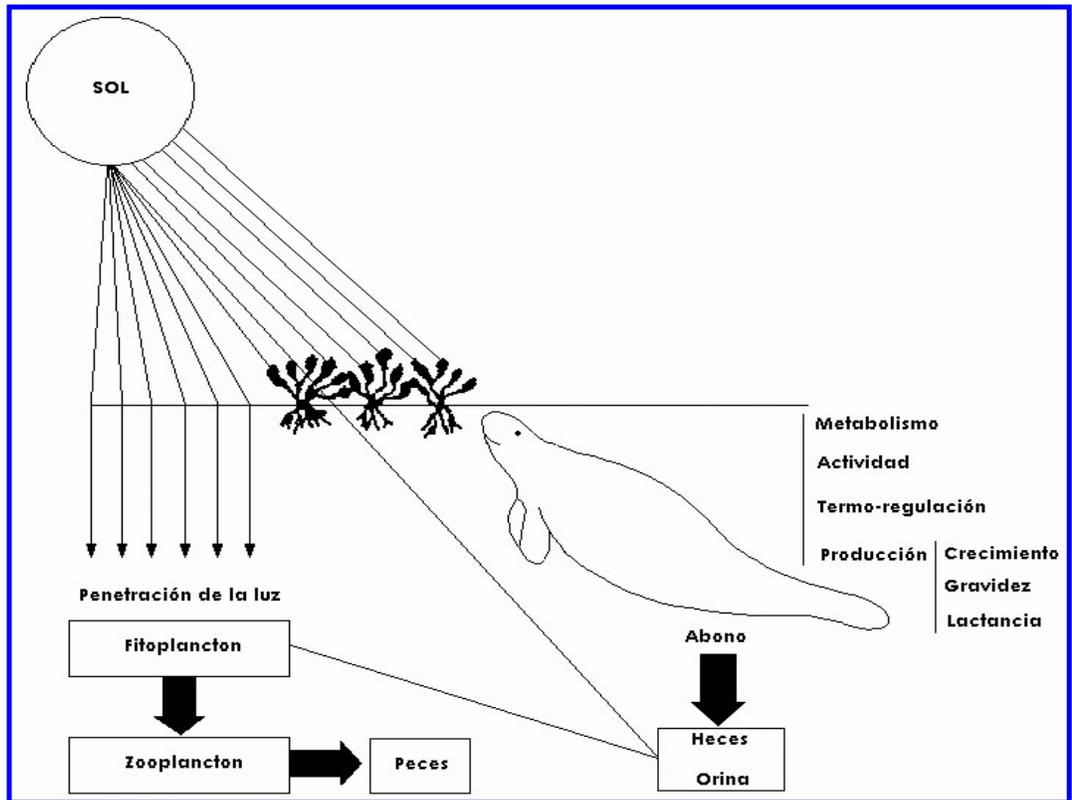


Fig. 1. Importancia del manatí en el ecosistema.

El manatí es un excelente indicador ambiental, ya que al ser un animal longevo, es susceptible a acumular contaminantes orgánicos (organoclorados, como pesticidas y bifenil policlorinados) en la grasa y otras reservas de lípidos. Además, al encontrarse ampliamente distribuido en las costas, lagunas y ríos, los contaminantes que se hayan acumulado en su cuerpo, pueden reflejar contaminación regional o local, que también puede afectar a los humanos y a otras especies. Trabajos recientes en México han documentado la presencia de contaminantes orgánicos, como bifenil policlorinados (PCB's) en la sangre de manatíes (Wetzel D.L., Reynolds J.E., Morales-Vela, B., 2006).

Se cree que el sistema inmunológico del manatí es muy resistente, y al presentar un tipo de papilomavirus no-letal (el cual sólo ocasiona tumores benignos en la piel) que hasta el momento no se ha desarrollado como

cancerígeno, se ha pensado en utilizarlo como modelo de estudio, para el desarrollo de medicamentos para tratar a la misma especie, y a varios papilomavirus presentes en otras especies, incluyendo el papilomavirus humano (el cual sí se puede desarrollar en cáncer cervical) (Woodruff R. A., 2005).

1.3. Situación actual de los manatíes en cautiverio en México

Es relativamente reciente la introducción del manatí antillano al cautiverio en México; se comenzó a realizar esta práctica a partir de los 70's con motivo de introducción en cuerpos de agua para el control de plantas-plaga, o por varamientos se empezaron a llevar a estos organismos a cautiverio (Vanoye, 2002).

A nivel nacional, a principios del siglo XXI sólo se podrían encontrar manatíes en cautiverio en 3 sitios, en Tabasco: el Centro de Convivencia Infantil de Jonuta, el Centro de Interpretación y Convivencia con la Naturaleza Yumka', y en el Acuario de Veracruz. Más recientemente, en Quintana Roo, el Delfinario de Puerto Aventuras, el Parque Xcaret y el Colegio de la Frontera Sur en Chetumal, y en el Parque Chucté de Ciudad del Carmen, Campeche han alojado manatíes. Al no poseer experiencia con la especie en los diferentes centros a los que se llevaron, se utilizaron métodos empíricos para tratar de mantener con vida a las primeras crías, juveniles y adultos que recibían. Desafortunadamente no todos los centros han podido o sabido conllevar a buen término el cuidado de estos animales en cautiverio, y algunos ni siquiera cuentan todavía con un plan de manejo adecuado para la especie. Actualmente en México existen solamente 6 sitios de cautiverio donde son resguardados y están destinados a permanecer 24 ejemplares de manatíes, ya que no existen centros de rehabilitación y reintroducción.

De estos sitios en cautiverio, se ha reportado la sobrevivencia de los manatíes a saber:

*Acuario de Veracruz, se puede decir que es 100% exitoso en la rehabilitación y manutención de los manatíes en cautiverio. Siete manatíes fueron rescatados de varamientos y rehabilitados exitosamente en cautiverio. Hasta el momento una de las hembras se ha reproducido dos veces con éxito. Sólo ha ocurrido un deceso, de una cría que se encontró en avanzadas condiciones de inanición y deshidratación, que murió al momento de llegada al Acuario. En el 2007, tres de los manatíes incluidos en este estudio de comportamiento, identificados con los nombres de Ángel, César y Sabina fueron llevados a Puerto Aventuras Grupo de Vía Delphi.

*Centro de Interpretación y Convivencia con la Naturaleza, Yumka', de los 6 manatíes que se han llevado por motivo de varamientos, sólo 3 permanecen con vida. Los decesos ocurridos han sido dos crías (un macho y una hembra) y una hembra adulta. Por lo que se registra el deceso del 50 % de los manatíes que han llevado a este centro.

*Centro de Convivencia Infantil de Jonuta (C.C.I.), se sabe que de los 14 organismos que ha albergado, sólo persisten dos. En 1995, se registraron 6 decesos. Debido a que persistieron las malas condiciones del sitio, en el 2004 se decidió trasladar 5 de los manatíes a otros encierros en Quintana Roo (3 a Vía delphi y 2 a Xcaret), 3 permanecen todavía en el centro y recientemente nació 1 cría de la hembra más antigua del centro, identificada como Ixchel y del único manatí macho, Xaman. Por lo que el éxito de este centro para albergar manatíes es muy criticable, ya que sólo 4 de los 14 manatíes que ha albergado hasta ahora permanecen con vida, lo que representa sólo el 28% de sobrevivencia.

*Parque Chucté, Fundación Sandoval Caldera, el único manatí que ha albergado murió en el 2007.

*Xcaret cuenta con 2 manatíes que recibió del C.C.I. de Jonuta y 1 cría hembra de la Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, ambos sitios localizados en el estado de Tabasco.

*Puerto Aventuras cuenta con 3 manatíes del C.C.I. de Jonuta, Tab., 3 manatíes del Acuario de Veracruz y 1 cría macho nacida en este encierro.

*El Colegio de la Frontera Sur (Ecosur), en la laguna Morelos del municipio de Chetumal, Quintana Roo, actualmente alberga a un macho juvenil de manatí, identificado como Daniel.

Viendo lo anterior, es evidente la falta de información para el establecimiento de índices que ayuden a evaluar el "bienestar animal", el cual es una de las principales problemáticas para la correcta elaboración y ejecución de protocolos del mantenimiento de animales cautivos. En México, por lo general los sitios de cautiverio sólo se enfocan en tratar de satisfacer las necesidades físicas de los animales, dejando de lado las mentales y conductuales.

1.4. Fisiología del estrés y su evaluación

El estrés es la variedad de respuestas que se desencadena frente a estímulos internos o externos que modifican la homeóstasis de un individuo. Estos estímulos se pueden deber a un trauma severo, ejercicio extremo, parasitismo, captura, cautiverio, transportación y a muchas otras situaciones. El estrés produce diversos efectos en el organismo, afecta el sistema inmunológico, se inhibe el sistema parasimpático, así como numerosas hormonas involucradas en la fisiología reproductiva y de comportamiento, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona luteinizante (LH), la hormona foliculoestimulante (FSH) y esteroides gonádicos, la secreción de insulina, el glucagón concierne con el almacenamiento de la glucosa, es típicamente inhibido, el crecimiento y el tejido de reparación son inhibidos, esto es verdaderamente dramático en organismos en crecimiento (Bassett, 2003; Becker *et al.*, 2002; Broom y Jhonson, 1993; Brousset *et al.*, 2005; Carbajal, 2001; McBride, 1982).

Sin embargo es importante destacar que el estrés no sólo tiene efectos negativos sino que es un factor decisivo en la adaptación del individuo a su ambiente y en situaciones fisiológicas como el período reproductivo. Cuando

se está sujeto a un estresor físico, es adaptativo para un organismo movilizar la energía y enviarla a las partes del cuerpo que la necesiten, por lo que se detienen los procesos fisiológicos no esenciales y no hay percepción de dolor e inflamación. Lo anterior involucra un síndrome de adaptación general, el cual se puede dividir en 3 fases:

1) *Fase de alarma*, caracterizada por una respuesta fisiológica rápida en la cual se estimula el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), esta estimulación se inicia en el cerebro en donde un estresor es detectado en el sistema nervioso central que envía una señal al sistema límbico, éste a su vez envía una señal al hipotálamo, el cual, como respuesta, secreta la hormona liberadora de corticotropina. Ésta se une a un receptor de membrana presente en las células de la hipófisis y promueve la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH). La ACTH se une a las células de la zona fasciculada de la corteza adrenal y aumenta la velocidad de síntesis de cortisol así como su secreción. El cortisol circula en la sangre unido a la transcortina o globulina fijadora de corticosteroides con una disociación limitada hacia la forma libre. El cortisol libre es captado por muchas células del cuerpo que contienen cantidades variables de receptor a corticosteroides. Una vez formado el complejo cortisol-receptor se transloca al núcleo celular en donde se une al ADN y promueve la síntesis de los productos fenotípicos necesarios para acelerar el metabolismo celular. Este proceso representa la acción celular de la hormona para inducir la adaptación al estrés (Guyton, 1996; Norris, 1997; Tresguerres, 2000).

2) *Fase de compensación o adaptación*, donde después de una exposición más o menos prolongada al agente estresante el organismo se adapta o compensa las condiciones alteradas que causan el estrés.

3) *Etapa de mala adaptación o agotamiento del eje HHA*, se produce si el estresor es de suficiente intensidad y duración, la compensación puede llegar a no ser posible y se presentaría el llamado estrés crónico.

1.5. Metabolismo del cortisol y su evaluación

Los indicadores fisiológicos que se pueden utilizar para evaluar el estado de estrés crónico incluyen la medición de niveles hormonales de ACTH (hormona adrenocorticotrópica), catecolaminas y glucocorticoides (como el cortisol y corticosterona), niveles sanguíneos de glucosa y proporción de células blancas en sangre (leucograma de estrés), entre otros. Estas determinaciones pueden hacerse mediante la obtención de las muestras directa (suero, saliva, orina y pelo) o indirectamente (heces), en general para animales silvestres se recomienda la utilización de técnicas no invasivas que permitan evaluar la condición de los animales sin alterar la evaluación de los parámetros a medir (Brousset *et al.*, 2005).

A la vez, en animales cautivos se utilizan técnicas de entrenamiento para la toma de muestras voluntariamente, esto es muy importante, sobre todo en animales silvestres, ya que el manejo para obtener este tipo de muestras de manera involuntaria, puede desencadenar una respuesta de estrés aguda y de esta manera alterar los resultados de la evaluación (Aubin, 2002; Bassett *et al.*, 2003; Tres, 2006).

La ruta de excreción y la forma metabólica de glucocorticoides difieren entre las especies. Las hormonas esteroides son metabolizadas principalmente en el hígado, el cual posee una serie de enzimas capaces de alterar los esteroides específicos convirtiéndolos en otros biológicamente inactivos y solubles en agua. El metabolismo de los esteroides típicamente involucra la reducción y retiro de cadenas laterales o grupos unidos a ambos, así como también la conjugación con ácido glucorínico o con sulfato. Los conjugados son solubles en agua y cuando se liberan dentro de la sangre ya no se unen a las proteínas transportadoras y se excretan por orina y heces. Algunos de los esteroides metabolizados son agregados o unidos a la bilis y son excretadas por la ruta intestinal ⁽¹²⁾. Los glucocorticoides se transportan en sangre libres o unidos a albúmina y globulinas específicas (transcortina) y después de circular entre 80 a 120 minutos, sufren un proceso de catabolismo principalmente en el hígado y en menor medida en riñón, tejido conectivo, fibroblastos y músculos.

Finalmente sus metabolitos son eliminados por orina y heces (Brousset *et al.*, 2005; Norris, 1997; Tresguerres, 2000).

1.6. Evaluación de cambios en el comportamiento de los animales

La respuesta al estrés puede ser medida como un cambio en el comportamiento del animal y en los sistemas autónomo y neuroendocrino. La mayoría de los científicos están de acuerdo en que la percepción de la naturaleza de una situación estresante es determinante para la intensidad de la respuesta. Uno de los principales estresores para muchos de los animales silvestres cautivos, particularmente aquéllos mantenidos en un ambiente de zoológico, es una falta de control o predictibilidad en el ambiente. Potencialmente esto puede llevar a una situación donde el animal experimenta estrés crónico. La función de la respuesta de estrés es mantener la homeostasis, y así los cambios del comportamiento y fisiológicos que permiten al animal enfrentar o adaptarse a la situación de estrés, por lo tanto no podría considerarse como un problema de salud. Los cambios significativos en el bienestar animal ocurren cuando el animal es incapaz de enfrentar al estresor o adaptarse completamente. No obstante, establecer los valores de varios parámetros fisiológicos que reflejen este punto no es fácil. Esta es un área relativamente nueva de investigación, y hay mucho que aprender acerca de las causas de estrés en los animales de zoológico y la manera en que perciben su entorno y lo enfrentan; esto varía entre especies e individualmente (dependiendo de si ha tenido experiencias previas), (Bashaw *et al.*, 2007; Barnett *et al.*, 1982; Brousset, 2003; Davey, 2004; Davey, 2006).

La mayoría de los estudios y mejoras que se han realizado para tratar de incrementar el bienestar animal en animales cautivos o de zoológico, se han enfocado a evaluar el tamaño y la calidad del encierro (imitación del hábitat natural), la calidad del manejo y dieta alimenticia, o en tratar de modificar la manera en que los animales emplean su tiempo en los encierros, ya sea mediante entrenamiento, imponiendo retos mentales, enriqueciendo su ambiente para tratar de compensar el tiempo que emplearían en vida libre en buscar alimento, refugio o aparearse. Sin embargo, en la mayoría de las

especies no se ha evaluado el efecto que el público pudiera ejercer sobre éstas (Almazan *et al.*, 2005).

Entre los estudios en los que se ha evaluado el efecto del público sobre el comportamiento de los animales de zoológico, se han encontrado ciertos indicadores conductuales de falta de bienestar animal o de alteraciones en el repertorio conductual. Pifarré (2005) encontró que la cantidad de visitantes al zoológico modificaba el comportamiento del lobo mexicano, registrándose un aumento en las interacciones agonísticas y el comportamiento de ocultarse en días de alta afluencia de público. En el lobo, las conductas de esconderse, quedarse inmóvil u otras para evitar ciertos estímulos, se consideran respuestas de miedo (Hemsworth y Barnett, 2000).

Anderson (2002) recomienda que antes de decidir exhibirlos en una colección, o que los animales (ya sean domésticos o silvestres) tengan algún tipo de interacción con el público, se debe evaluar el temperamento de dichos animales, ya que algunos se asustan mucho ante el público. En su estudio encontró que las ovejas pigmeas africanas parecen ser bastante tolerantes para su exhibición en zoológicos, mientras que las ovejas Romanov se asustan mucho ante la presencia de humanos. Sellinger y Ha (2005) hallaron que la intensidad así como la densidad de público afecta el comportamiento de una pareja de jaguares mantenidos en un zoológico, en el macho se alteró el comportamiento social y se incrementaron las agresiones. En rinocerontes negros se encontró una correlación positiva entre la cantidad de público y conductas de miedo, así mismo la tasa de mortalidad fue mayor en los albergues más accesibles a los visitantes (Carlstead *et al.*, 1999). En orangutanes se han descrito respuestas de miedo al contacto con los humanos (Hemsworth y Banett, 2000). En elefantes mantenidos en zoológicos y en circos se ha reportado una gran cantidad de estereotipias, sobre todo los que son mantenidos en circos, debido a que pasan una gran parte del tiempo encadenados. Entre las estereotipias reportadas para los elefantes se describen movimientos ondulantes, moviéndose hacia delante y hacia atrás, parpadeando, moviendo la cabeza ondulantemente, moviendo el tronco del

cuerpo (proboscis), ritmeando, elevando una pata, entre otros (Elzanowski y Sergiel, 2006).

Thompson (1976) reporta que los chimpancés incrementan su comportamiento sexual en respuesta a un alto número de visitantes, mientras que en los estudios de Glatston, Geilvoet-Soeteman, Hora-Peček y Van Hooff se registraron menos comportamientos sociales (contacto, monta y juego) entre grupos de tamarines de orejas de algodón expuestos a visitantes comparados con grupos alejados del público. Maki, Alford y Bramblett (1987) observaron en los chimpancés mayores comportamientos agresivos intragrupal en el laboratorio en contra de ellos mismos, de los estudiantes y científicos. Hosey and Druck (1987) avanzaron en la noción del "efecto del público" y dieron a conocer que la presencia de los visitantes afecta el comportamiento locomotor y de dispersión espacial, y el comportamiento de la mayoría de los primates fue más activo que pasivo con respecto a los grupos de visitantes.

1.7. Comportamiento del manatí

Los manatíes a menudo son comparados con los elefantes, ya que han evolucionado a partir de un ancestro en común, y pertenecen a los dos únicos órdenes que prevalecen de los cuatro órdenes originales (los manatíes, orden Sireniidae; los elefantes, orden Proboscidea; los hyraxes, orden Hyracoidea y los aardvark, orden Tubulidentata).

La mayoría de los estudios etológicos de manatíes se han realizado en la subespecie de Florida (*T. manatus latirostris*) tanto en cautiverio como en vida libre. Se conoce que su sistema de apareamiento es promiscuo y el estro de una hembra exhibe un comportamiento polígamo. Un grupo de apareamiento consiste en un grupo de machos persiguiendo a una hembra en estro. Este grupo es efímero, dura de una semana a un mes. Los machos intentan copular con varias hembras. Hasta el momento, se desconoce exactamente qué estimula la señal externa en los machos para congregarse alrededor de una hembra en estro, con el objeto de acceder a copular con ella. Se cree que las hembras deben producir una señal posiblemente de tipo química o acústica,

la cual estimula un mecanismo hormonal interno en los machos, que ocasiona la persecución de las hembras. A pesar de que un grupo de machos se congrega para acceder a una hembra en estro, ellos sólo realizan maniobras para conseguir una mejor posición para acceder a la hembra, y sólo exhiben un poco de comportamiento agonista. Sorprendentemente, los machos dugones parecen ser más agonistas que los manatíes durante los eventos de apareamiento (Hartman, 1979; Young, 2002).

Hartman (1979) fue el primer científico en hacer observaciones de largo plazo del comportamiento del manatí de Florida en vida libre, encontrando ciertas similitudes entre el apareamiento en grupo de los manatíes con el de elefantes. Las hembras elefantes también son polígamas y a menudo se aparean con machos en un período de varias horas. Desde una perspectiva evolutiva, el autor plantea la hipótesis de que esta similitud en el sistema de apareamiento de ambos, se desarrolló hace millones de años a partir de un ancestro en común para ambos.

Anteriormente no se había logrado determinar con certeza la edad de los manatíes, esto debido a que a diferencia de otros mamíferos, estos animales tienen un sistema único de reemplazamiento de dientes durante toda su vida (a partir de datos de manatíes de Florida cautivos, se determinó que los molares se desplazan hacia el frente aproximadamente 10 mm al mes), por lo que no se puede estimar su edad a partir de éstos. Debido a esto, se había subestimado la madurez sexual de los manatíes, y se suponía que la alcanzaban entre los 5 y 10 años de edad. Recientemente, se empleó una nueva técnica para estimar la edad de los manatíes de Florida, en la que se utilizan las capas de crecimiento de los huesos del oído, descubriéndose que las hembras alcanzan la madurez sexual entre los 3 y 4 años de edad. Algunos manatíes machos llegan a ser psicológicamente maduros a partir de los 2 años de edad y midiendo 237 cm.

En Florida, el sistema reproductivo puede variar en funcionalidad en machos maduros, dependiendo de la estación, con poca evidencia de presencia de

espermatogénesis durante los meses de invierno (diciembre a febrero). En cuanto a la sub-especie antillana, se reporta que exhibe algunos comportamientos que podrían estar asociados con espermatogénesis estacional, aunque se necesitan más estudios para determinar si la temporalidad afecta el comportamiento reproductivo de los manatíes de Belice.

En muchos mamíferos, la actividad reproductiva varía estacionalmente con el fotoperíodo o por el número de horas luz por día. La glándula pineal es el órgano que usualmente se asocia con cambios en el comportamiento debidos al fotoperíodo. No obstante, la glándula pineal no ha sido encontrada en manatíes y dugones. La literatura aún no es clara en lo que se refiere a la existencia de una glándula pineal en elefantes (Oki y Atkinson, 2004; Self, 2003).

Basándose en las observaciones registradas del comportamiento del manatí de Florida, Self (2003) postula que aquéllos manatíes machos que exhiben un comportamiento sexual adecuado y que se presenta en el tiempo propicio, son más exitosos reproductivamente que los machos que malgastan su tiempo en encuentros sexuales infructuosos (por ejemplo, los machos que todavía son sexualmente inmaduros o inhábiles para participar en la cópula). Se cree que las hembras que invierten 2 años en el cuidado de cada cría, antes de volver a quedar preñadas, son más exitosas en la crianza de sus vástagos que las hembras que no emplean esta estrategia. Existen dos teorías que intentan explicar estos hechos:

- 1) Que a las crías les toma 2 años aprenderse las rutas de migración hacia los efluentes de agua cálida y buenos pastos de forrajeo necesarios para sobrevivir durante el invierno.
- 2) Que las crías necesitan proteína extra y grasas durante los años de desarrollo.

El único vínculo de larga duración en esta especie se establece entre la madre y la cría, las que desarrollan una relación estrecha que se da por vía de la vocalización. La cría permanece aproximadamente 2 años bajo el cuidado de

la madre; aunque a partir de los 3 meses de vida las crías ya empiezan a comer por sí mismas, continúan lactando periódicamente.

Los manatíes de Florida han modificado su comportamiento evasivo para resolver sus problemas físicos de termorregulación, aceptando convivir con el humano y viajando año tras año a estas aguas cálidas. A la vez, resultados preliminares de Worthy indican que son buenos osmoreguladores, que pueden pasar de aguas dulces, a salobres o marinas, sin que esto les afecte. Existen dos hipótesis alternativas para explicar esto: la primera, es que tienen adaptaciones fisiológicas que permiten mantenerlos en balance con el agua y electrolitos; y la segunda, es que se modifican su comportamiento para mantener el balance hídrico en los diferentes tipos de hábitat, buscando fuentes de aguas frescas en ambientes marinos (Iske, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios de la especie *Trichechus manatus manatus* realizados en México se han enfocado sólo en su distribución, por lo que existe una gran carencia acerca de aspectos biológicos de la especie, como taxonomía, alimentación, conducta y fisiología, entre otros.

Se cuenta con muy pocos estudios de comportamiento realizados en México; en vida libre sólo existe el de Ortega (1997) y el de Ramírez-Jiménez (2007) y en cautiverio el de Negrete (1998) y Vilorio (2001). A la vez, es importante conocer el efecto de la interacción humano-animal, ya que podría estar alterando el comportamiento de los animales.

Debido a la falta de información, aún no se ha logrado realizar un programa adecuado de manejo en cautiverio ni de conservación y protección en vida libre para esta especie. Por lo tanto, es necesario generar información acerca del nivel de bienestar que pueden tener los manatíes en las diferentes condiciones de cautiverio. Esta información será útil para mejorar las condiciones de manejo de los manatíes cautivos así como para proporcionar bases para el desarrollo de futuras investigaciones y para la conservación y manejo de la especie.

Es importante crear más información sobre cómo perciben los animales el ambiente que les rodea, lo cual nos puede ayudar a dar pautas más precisas de cómo albergar a la especie en cuestión en espacios más adecuados, y así lograr un aumento del bienestar animal y con ello mejorar los programas de reproducción y conservación.

4. HIPÓTESIS

4.1. ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO

Los manatíes modificarán el porcentaje de tiempo empleado en su comportamiento individual y social con respecto al número de visitantes al Acuario de Veracruz:

- Presentarán mayor locomoción durante los días de alta afluencia de público.
- Presentarán menos descanso durante los días de alta afluencia de público.
- El tiempo empleado en alimentarse no se verá afectado por la cantidad de público, ya que los horarios de alimentación ya están establecidos.

4.2. ESTUDIO ENDOCRINOLÓGICO

- En los manatíes del Acuario de Veracruz, los niveles de cortisol medidos en saliva se incrementarán en días de alta afluencia de público.
- En los manatíes del Acuario de Veracruz, los niveles de cortisol presentarán un ritmo circadiano, secretándose en mayor proporción durante el día.
- Los niveles de cortisol serán más elevados en las crías de manatí.
- Los niveles de cortisol serán mayores en organismos de vida libre con respecto a los de cautiverio.
- Los machos presentarán los mayores niveles de cortisol en comparación con las hembras.

5. OBJETIVOS:

- Generales:

- Evaluar el efecto del público sobre el comportamiento y los niveles de cortisol en el Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) en cautiverio.
- Establecer rangos de cortisol en suero y saliva para la especie en vida libre y cautiverio.

- Específicos:

1. Establecer un catálogo de comportamiento para la especie en cautiverio.
2. Determinar si la presencia de público modifica el porcentaje de tiempo empleado en cada comportamiento del manatí.
3. Validación de la técnica de radioinmunoanálisis para la determinación de cortisol en suero y saliva para la especie.
4. Determinar el rango de cortisol en suero y saliva para la especie en cautiverio y vida libre por medio de la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).
5. Evaluar la influencia de variables que pudieran alterar en los niveles de cortisol sérico y en saliva (tipo de hábitat, manejo, toma de muestras, ritmo circadiano, sexo y edad).

6. METODOLOGÍA

6.1. Organismos de estudio

Se incluyeron un total de 27 manatíes* de la especie *Trichechus manatus manatus*, mantenidos en cautiverio, (13 hembras: 5 crías, 5 juveniles y 3 adultas; y 8 machos: 3 crías, 3 juveniles y 2 adultos) y vida libre (7 hembras: 1 cría, 1 juvenil y 5 adultas; y 4 machos: 3 juveniles y 1 adulto). *Se registran únicamente 27 manatíes, en lugar de 32, ya que de 5 de ellos se obtuvieron muestras biológicas en dos etapas diferentes de vida.

Cabe recalcar que los manatíes estudiados fueron clasificados por clase etaria, según como lo marca la literatura o la clasificación utilizada por el M.V.Z. Fabián Vanoye para los manatíes mantenidos en cautiverio. Entendiéndose entonces como crías a los manatíes que están siendo amamantados por la madre y que todavía depende de ella, en el caso de los manatíes del Acuario de Veracruz que han sido criados en cautiverio se les considera crías hasta el momento en que han sido ablactadas (hasta el año o año y medio de edad). Se entienden como juveniles, a aquéllos manatíes que ya son independientes de la madre (a partir de uno o dos años de edad en adelante), pero que todavía no han alcanzado la madurez sexual. Se consideraron como adultos a los manatíes que contaban como mínimo 5 años de edad, en el caso de los organismos de vida libre, se estimó la edad por la talla y peso.

Los animales pertenecen a diferentes poblaciones de manatíes: **A** de Veracruz; **B, C, D, E** y **F** de Tabasco; **G** de Campeche y **H** de Quintana Roo. Los manatíes que se encuentran bajo resguardo en cautiverio son los del grupo **A, B, C** y **G**. Los sujetos de estudio de vida libre son los del grupo **D, E, F** y **H** (Ver cuadro 1 y sección 6.2.).

Cuadro 1. Origen y condiciones del encierro y tipo de hábitat de 27 manatíes antillanos.

Lugar	Estado	Condición	*Tipo de agua	**♀			**♂		
				C	J	A	C	J	A
(A) Acuario de Veracruz	Veracruz	Cautiverio	S	3	3	2	2	2	1
(B) Yumka´	Tabasco	Cautiverio	D	1	1	-	-	-	1
(C) C.C.I. de Jonuta	Tabasco	Cautiverio	D	1	1	1	-	1	-
(D) Laguna de las Ilusiones	Tabasco	Vida libre	D	1	1	2	-	1	-
(E) Laguna Barbona	Tabasco	Vida libre	D	-	-	-	-	1	1
(F) Río San Pedro	Tabasco	Vida libre	D	-	-	1	-	-	-
(G) Ecoparque Chucté	Campeche	Cautiverio	S	-	-	-	1	-	-
(H) Sian Ka´an Roo	Quintana Roo	Vida libre	S	-	-	2	-	1	-

*Tipo de agua: (D) Dulce y (S) Salada.

**Edades: (C) Cría, (J) Juvenil y (A) Adulto.

6.2. Descripción del encierro o hábitat de los manatíes

Los manatíes del grupo A se encuentran bajo resguardo del Acuario de Veracruz, A.C., el cual se localiza en el Playón de Hornos, del Puerto de Veracruz, México, sus coordenadas son 19° 11´14.8" latitud norte, 96° 07´19.8" longitud oeste, a una elevación de 0 msnm. Los organismos están en el "Manatiario" (coordenadas 19° 11´ latitud norte, 96° 07´ longitud oeste), una piscina de superficie irregular, con capacidad de 370,000 l. de agua salada y con las siguientes dimensiones: 12 m de largo, 8m de ancho y 3m de columna de agua comunicada con una zona de cuarentena de 6m de diámetro por

2m de profundidad (Muñoz AC, 2003; Com. pers. Vanoye F, 2006; Vanoye F, 2002).

Los manatíes del grupo B están en el Centro de Interpretación y Convivencia con la Naturaleza (C.I.C.N.), Yumka', el cual se localiza entre las coordenadas 17° 45" y 18° 00" de latitud norte, 92° 45" y 93° 00" de longitud oeste, situándose en el Poblado Dos Montes, a 17 Km al este de la ciudad de Villahermosa, (por la carretera Villahermosa-Escárcega) en el municipio del Centro, Tabasco. Cuatro de los especímenes se encontraban en el manatinario, el cual era un brazo de la laguna Playa del Pozo, que fue acondicionado (drenado y cerrado) para los mismos. Éste se encuentra a 18° 00' 04.43 latitud norte, 92° 48' 16.93 longitud oeste, a una altitud de 13 msnm. Tiene una superficie de 9,235.89 m² y lineal de 407.3 m. Se hace recambio de agua de la misma laguna, la cual está conectada al Grijalva. La cría se encontraba en una piscina inflable de plástico (aproximadamente 3 m de diámetro X 1m de altura) con agua dulce. El encierro contaba con calefacción durante las noches y los días con temperaturas bajas, en sí se procuraba que la temperatura del agua no bajara de 16°C. Cada 3 ú 8 días se le hacía recambio de agua a la alberca (Villanueva C, 2005).

Los organismos del grupo C están resguardados en el Centro de Convivencia Infantil (C.C.I.) de Jonuta, Tabasco, México; se encuentra a 18° 05' latitud norte, 92° 08', a una altitud de 5 msnm. Es un cuerpo de agua natural que fue dragado, acondicionado y aislado en el año de 1995 para introducir a seis manatíes, tiene forma de bumerang y cubre una superficie de 11,065.245 m². La parte más ancha mide 75.95 m y la más angosta 13.80 m. Tiene una profundidad menor de 1.50 m y mayor de 3.50 m. La laguna es alimentada por medio de una tubería de pvc proveniente del río Usumacinta que tiene 10 cm de diámetro y 2.30 m de longitud; además, recibe el aporte de las aguas pluviales durante la temporada de lluvias. En esta laguna existe la evidencia de una contaminación de origen fecal debido a que los valores para coliformes fecales (bacterias gramnegativas que habitan en el tracto intestinal de animales de sangre caliente) excedieron los límites permisibles durante todo

un año (2000-2001), esto es muy probablemente a que recibe descargas de aguas negras y presenta escurrimientos de desechos orgánicos. Es importante recalcar que a la fecha se tienen documentados seis decesos de manatíes en este encierro; cuatro en mayo del año de 1995 y dos en febrero del año 2000. Aunque en 4 de las 6 ocasiones no se practicó la necropsia, se reportan las siguientes probables causas: posible contaminación del estanque, endotoxiosis por bacterias, leptospirosis, hepatitis viral y severo cuadro neumónico aunado a desnutrición (INEGI, 1999; Ortiz S, Romero F, 2004).

Los manatíes del grupo D pertenecen a una población aislada (se estima que son 10 organismos) (Com. pers., Olivera, L.D., 2007), ya que habitan en un sistema cerrado, sin conexión a otros afluentes de agua. La laguna de las Ilusiones se localiza en la ciudad de Villahermosa, Tabasco, Méx., a 18° 00' latitud norte, 92° 56' longitud oeste, a una elevación de 7 msnm. Ésta presenta niveles de alerta por eutroficación, en las cuales se observaron los niveles más elevados de nutrientes, además de que el fósforo total rebasó los 4.1 mg/l, que caracteriza a cuerpos de agua eutróficos e hipertróficos. (Goñi JA, Hernández O, et al., 1991).

Los manatíes del grupo E y F son de vida libre y se localizan en el municipio de Balancán, Tabasco, Méx. Al momento de su captura, el grupo E se encontraba en la Laguna Barbona, sus coordenadas son 17° 46' latitud norte, 91° 32' longitud oeste, a una elevación de 3 msnm (INEGI, 1999). El del grupo F se capturó en el Río San Pedro, las coordenadas son 17° 46' latitud norte, 19° 12' longitud oeste, a una elevación de 37 msnm. Estos animales fueron capturados en el 2007 para la toma de muestras para genética, detección de enfermedades y colocación de radiocollares para estudiar su distribución (Com. pers. Olivera LD, 2006).

El manatí del grupo G se encuentra bajo resguardo del Ecoparque Chucté, Fundación Sandoval Caldera, A.C., en Ciudad del Carmen, Campeche, México. Es localizado por la carretera Carmen-Puerto Real, en las coordenadas 18° 40' latitud norte, 91° 44' longitud oeste, a una altitud de 0

msnm. El manatí se encontraba en un manto freático de agua salada, de 5 m de ancho x 15 m de largo, una profundidad de 1 m.

El grupo H, al momento de su captura se encontraba en la Reserva Sian Ka'an, Quintana Roo, México. Sus coordenadas son 19° 48' latitud norte, 87° 28' longitud oeste, con una elevación de 0 msnm. Los manatíes fueron capturados en el 2004 por parte de un proyecto de genética, detección de enfermedades y colocación de radiocollares para estudiar su distribución (Com. pers. Morales B, 2004).

Todos los animales fueron mantenidos en las condiciones de temperatura y humedad naturales del lugar geográfico donde habitan. Todos los sitios de muestreo contaban con fotoperíodo natural, excepto el Acuario de Veracruz, ya que mantiene iluminado el manatario de 18 a 21 horas para su exhibición al público. La dieta que se les proporcionaba en cautiverio variaba bastante de un sitio a otro desde composición hasta cantidad. En el Acuario de Veracruz se les alimentaba con frutas, verduras y forraje, y a las crías con una fórmula de leche para mamíferos Multimilk Pet-Ag M.R. (Apéndice 1 y Apéndice 2), en el C.I.C.N. Yumka' con verduras, pastos y vegetación natural, en el C.C.I. de Jonuta con pasto y lechuga y en el Parque Chucté con frutas y verduras. Los manatíes de vida libre se documenta que consumen una gran variedad de plantas del fondo, semi-sumergidas o flotantes y ocasionalmente de pastos que llegan a las orillas del agua. Entre las plantas que se reportan son consumidas por estos organismos están la hierba de la tortuga (*Talassia testudinum*), y hierba del manatí (*Sysigodium filiforme*), así como más de 30 especies de algas (Vanoye F, 2002).

6.3. Origen de los manatíes mantenidos en cautiverio

De los manatíes incluidos en este estudio y que actualmente se mantienen en cautiverio, el 94% (16 de 17 animales) nació en vida libre y fueron llevados a cautiverio por motivo de varamientos, ya sea porque se encontraron siendo huérfanos, o atrapados en redes, heridos o porque no se podían valer por sí mismos en vida libre.

6.3.1. Acuario de Veracruz (Grupo A)

Los manatíes identificados como Silvia y Pablo fueron capturados incidentalmente con una red de cerco por un pescador en la Laguna de Alvarado, cerca de la comunidad de "Arbolillo", municipio de Alvarado en el estado de Veracruz, con localización geográfica de 18° 48' latitud norte y 95° 51' longitud oeste, con una elevación de 0 msnm, el 1 de marzo de 1998. Después de la captura la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) y la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) decidieron dejarlos en un pequeño corral de tela mosquitero en la misma laguna para ver si la madre o el grupo de manatíes estaba cerca y poderlos liberar. Al cabo de una semana y al no ver rastros de manatíes se decidió trasladarlos a las instalaciones del Acuario de Veracruz A.C. para su rehabilitación. El 6 de Marzo de 1998 al trasladarlos al Acuario de Veracruz siendo crías, se les calculó que tenían aproximadamente un mes y medio de edad y medían y pesaban 1.07 m con 23 Kg y 1.05 m con 22 Kg respectivamente.

La manatí "Costeña" se encontró el 12 de septiembre de 2002 con una malla enredada en la aleta pectoral derecha, en la misma laguna de Alvarado, en la comunidad de Costa de San Juan, municipio de Alvarado, Veracruz, sus coordenadas son 18° 43' latitud norte y 95° 49' longitud oeste, con una elevación de 0 msnm. Ese mismo día se decidió llevar al Acuario de Veracruz para amputar la aleta pectoral derecha debido al avanzado grado de necrosamiento y para su posterior rehabilitación. Al momento de su llegada era juvenil, se calculó que tenía una edad aproximada de 3 años, el 12 de septiembre de 2002 midió 2.35 m, se pesó posteriormente el 11 de octubre de 2002, teniendo 213.3 Kg.

El manatí "Ángel" fue hallado, siendo una cría huérfana, el 5 de marzo de 2002 en el Río Calzadas, municipio de Coatzacoalcos, Veracruz, las coordenadas son 18° 09' latitud norte, 94° 35' longitud oeste, a una elevación de 10 msnm. El día de su llegada al Acuario de Veracruz, midió 1.22 m y pesó 32.9 Kg.

El manatí "César" fue descubierto el 9 de agosto de 2002 en Arroyo Viejo, afluente del Cosapan y del río Chiquito, municipio de Cosoleacaque, Veracruz, se localiza en las coordenadas 18° 40' latitud norte, 95° 48' longitud oeste, a una elevación de 10 msnm. Al día de su arribo al Acuario de Veracruz, siendo cría, midió 1.25 m y pesó 32.95 Kg.

Dominga, una cría huérfana de manatí, se encontró el 18 de septiembre de 2002, en la laguna de Alvarado, cerca de la comunidad Los Pajarillos (Corcobado), municipio de Alvarado, Veracruz, sus coordenadas son 18° 40' latitud norte, 95° 48' longitud oeste, a una elevación de 0 msnm. Al llegar al Acuario de Veracruz midió 1.15 m y pesó 23 Kg.

La manatí "Sabina" fue hallada el 13 de marzo de 2004 en la laguna de Alvarado, en la comunidad Punta de Tía Pancha, municipio de Alvarado, Veracruz, las coordenadas del sitio son 18° 44' latitud norte, 95° 49' longitud oeste, a una elevación de 0 msnm. Se trasladó al Acuario de Veracruz, siendo una cría huérfana de aproximadamente 1 mes y 2 semanas de edad, con 1.19 m de longitud total y 28.9 Kg de peso.

Marina fue la primera cría de manatí nacida en cautiverio en México, el 26 de diciembre de 2004 nació en el Acuario de Veracruz. Sus padres son los manatíes Silvia y Pablo del mismo acuario (Com. pers. Vanoye F, 2006).

6.3.2. C.I.C.N. Yumka' (Grupo B)

En este centro, los machos nombrados Jobo y Pepe llegaron en 1998, el primero el 13 de abril de la laguna "el Venado", Ranchería el Jobal, del municipio de Emiliano Zapata, localizándose a 17° 47' latitud norte, 91° 46' longitud oeste, a una elevación de 5 msnm. Al momento de su llegada el primero era juvenil y pesaba 250 Kg y medía 2.27 m. El segundo manatí fue encontrado en el río San José, municipio de Balancán, sus coordenadas son 17° 43' latitud norte, 91° 33' longitud oeste, a una elevación de 8 msnm. A su llegada al zoológico era un juvenil que pesaba 230 Kg y medía 2.25 m. Las hembras Maxi y Chaca, eran juveniles, medían 1.54 y 1.60 m respectivamente

al momento de su llegada, el 25 de enero de 1999, cayeron en diferentes redes de pescadores, pero muy cercanas una de la otra y en la misma fecha, en el río Chacamax, municipio de Emiliano Zapata. Sus coordenadas son 17° 41' latitud norte, 91° 33' longitud oeste, con una elevación de 8 msnm. Por último una cría que fue encontrada en la comunidad La Panga Vieja, Ranchería Sánchez Magallanes, municipio de Cárdenas, sus coordenadas son 18° 07' latitud norte, 94° 06' longitud oeste, con una elevación de 12 msnm. El 30 de julio de 2002, al llegar al Yumka' se estima que tenía 2 semanas de edad y pesaba 29 Kg. Los cinco organismos son pertenecientes al estado de Tabasco (Villanueva C, 2005).

6.3.3. Centro de Convivencia Infantil de Jonuta (Grupo C)

En el C.C.I. de Jonuta se encuentran 4 organismos identificados con los microchips AVID 018887516 (Itzel, hembra adulta de presumiblemente 18 años de edad a la fecha), AVID 020339811 (Sish-ha, hembra juvenil de aproximadamente 6 años a la fecha), AVID 049082631 (Yumha'ó Dorothy, hembra cría de edad desconocida) y AVID 049035522 (Xaman, macho juvenil de edad desconocida). La primera se presume que es una de los 3 manatíes introducidos originalmente (dos hembras y un macho), en 1982 por los pescadores de la región. La segunda en orden, no se sabe con certeza si fue concebida en ese encierro o fue introducida, ya que se reporta que los manatíes originales se empezaron a reproducir en 1995. Los dos últimos son los más recientes llevados al cautiverio, el 8 de marzo y el 3 de abril de 2002 respectivamente, calculándoles una edad al momento de su llegada al C. C. I. de 6 meses y de 3 años respectivamente. Se presume que los 4 animales fueron introducidos a este cuerpo de agua artificial de los cuerpos de agua cercanos a la cabecera del municipio de Jonuta, estado de Tabasco (Ortiz S, Romero F, 2004).

6.4. Medición del comportamiento

Se decidió estudiar el comportamiento de los manatíes sólo en el Acuario de Veracruz (de Febrero a Abril de 2006), ya que éste presentaba el mayor número de organismos de la especie en cautiverio de México. Además de que

era el único encierro en el que se tenían las condiciones adecuadas para observar a los especímenes debido a la claridad del agua.

Debido a los pocos estudios etológicos que se tienen sobre la especie, y a la falta de un etograma para esta subespecie, se decidió realizar el presente catálogo conductual para un grupo de manatíes en cautiverio (Ver capítulo 7.1). Se realizaron observaciones preliminares durante 56 horas para la identificación individual de los organismos y la realización de un catálogo conductual (Cuadro 3, con más detalle en el capítulo 7.1.) de la especie utilizando el método "*ad libitum*".

Una vez identificados los manatíes y establecidas las categorías de comportamiento, se realizaron las observaciones mediante el método de barrido (Martin P, Bateson P, 1993) para obtener información sobre estados de comportamientos individuales y sociales de los manatíes. Se registró el comportamiento de los manatíes durante 53 días, cada día se realizaban observaciones de 4 horas, teniendo un total de 212 horas. En cada día de observación, se realizaron 4 muestreos de barrido por día, es decir uno cada hora. A la vez, por día se realizaron 24 registros instantáneos individuales de comportamiento, es decir, durante una hora, se realizaron 6 registros instantáneos de comportamiento (cada 10 minutos) de un solo manatí. Así sucesivamente se fueron intercalando los 7 animales hasta tener registros completos en el horario de 9:00 a 21:00 horas de cada uno (Cuadro 2). Esto se realizó para calcular la proporción del tiempo en estados de comportamiento, dividiendo el número de barridos de la conducta / total de barridos realizados.

Cuadro 2. Sexo y edad de 7 manatíes del Acuario de Veracruz que se monitorearon para evaluar el efecto del público sobre su comportamiento.

Identificación de ejemplares*	Sexo	Edad aproximada al momento del estudio (2006)
1. Pablo	♂	8 años, 2.5 meses
2. Costeña	♀	8 años
3. Ángel	♂	4 años, 3 meses
4. César	♂	3 años, 9 meses
5. Dominga	♀	3 años, 9 meses
6. Sabina	♀	2 años, 2.5 meses
7. Marina	♀	1 año, 3.5 meses

*Los números señalados en "negritas" serán los utilizados de ahora en adelante para identificar a los manatíes en las siguientes gráficas de comportamiento.

Cuadro 3. Listado de principales pautas de comportamiento registradas.

Categorías	Descripción
1. Locomoción	Desplazamiento de un lugar a otro.
2. Alimentación	Ingiriendo alimentos.
3. Descanso	Suspensión de las demás actividades. En estado inerte.
4. Ocultarse	Escondiéndose en zonas del estanque en el que no eran visibles para las personas.
5. Cuidado corporal	Acicalamiento, rascarse y frotarse.

6.4.1. Determinación de temporadas de alta y baja afluencia de visitantes al Acuario de Veracruz.

Para el análisis del efecto del público sobre el comportamiento de los manatíes del Acuario de Veracruz, primero se determinaron los días de alta y baja afluencia, tomando como base los días festivos y fines de semana y se compararon contra los días entre semana y no festivos, y mediante una t-student se determinaron que existían diferencias significativas, con un nivel de significancia de 0.05.

El ingreso del número de visitantes al Acuario de Veracruz fue proporcionado por la taquilla del mismo. Es importante mencionar que con respecto a este número registrado, la afluencia fue mayor, ya que la taquilla registra únicamente a las personas que compran el boleto de entrada al Acuario, pero no registra a los visitantes de cortesía. No se corrigió el error debido a que no hay control sobre esto, pero se asume que los visitantes de cortesía se distribuyeron de igual forma durante todos los días.

Se observó que los días de baja afluencia eran de lunes a jueves, y los de mayor afluencia eran los viernes, fines de semana y días festivos. Esta aseveración fue corroborada mediante una t-Student.

La cantidad de visitantes de viernes a domingo, así como días festivos fue significativamente más alta que la cantidad de gente registrada de lunes a jueves ($t=6.07$, $p<0.0001$, Fig. 2). En base a estos datos, se dividieron los días observados en 2 categorías: (A) Alta afluencia, de viernes a domingo y días festivos; y (B) Baja afluencia. La cantidad promedio de visitantes en un día de condición A fue de 4,920 (± 469 E.E.) y en un día de condición B fue de 1,249 (± 113.7 E.E.).

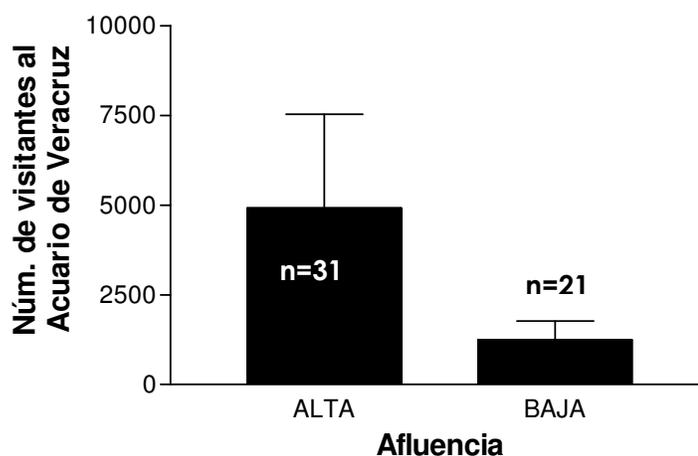


Fig. 2. Los valores representan el promedio \pm D.E de 49 días (condición A, 28 días y condición B, 21 días) de registros de visitantes al Acuario de Veracruz.

6.4.2. Análisis estadístico de comportamiento

Una vez establecidos los días de baja y alta afluencia, se realizó un análisis de correlación para determinar si el lugar desde el que fueron tomadas las observaciones influenció el registro de datos, y las comparaciones de registros tomadas desde el área pública (al que tienen acceso todos los visitantes) y del área técnica (sólo los técnicos o visitas guiadas pueden acceder) fueron significativamente diferentes ($p=0.05$).

Para el análisis del comportamiento general de los manatíes en días de alta y baja afluencia de público, en el que se realizaron las observaciones conductuales desde diferentes áreas (técnica y pública, que más adelante, en el capítulo 7.3. se explican a detalle), los datos tuvieron una distribución normal, por lo que se aplicó una t-Student para muestras pareadas ($p<0.05$). Al analizar el comportamiento de los manatíes individualmente, los valores mostraron una distribución no normal y mostraron una gran desviación estándar, por lo que estos datos se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon ($p<0.05$).

6.5. Medición de la actividad adrenocortical

6.5.1. Colecta de muestras de suero y saliva

La medición de cortisol se hizo a partir de muestras de suero (5 ml. en promedio) y saliva (100 μ l en promedio). Todas las muestras de suero se tomaron mediante el manejo de los organismos fuera del agua y conteniéndolos físicamente para la venopunción en la aleta pectoral. Las muestras de saliva fueron tomadas con un hisopo estéril, aprovechando los manejos de los animales, en el caso de los manatíes del Acuario de Veracruz y del C.I.C.N. Yumka´ se lograron tomar muestras periódicas de saliva bajo consentimiento de los animales (Apéndice 3, 4 y 5).

Las muestras de sangre fueron colectadas durante los años 2003, 2004, 2006 y 2007 de 24 manatíes (Cautiverio=13, en 3 sitios: Acuario de Veracruz, C.C.I. de Jonuta y Parque Chucté; Vida libre=11, en 4 sitios: Sian Ka´an, Laguna de las

Ilusiones, Laguna Barbona y Río San Pedro), (Ver Apéndice 4 y 5). Las muestras de saliva se midieron por radioinmunoanálisis y se utilizó ^3H -cortisol y fueron colectadas durante los años 2003, 2004 y 2006 de 25 manatíes (Cautiverio=21, en 4 lugares: Acuario de Veracruz, C.I.C.N. Yumka', C.C.I. de Jonuta y Parque Chucté; Vida libre=4, en Sian Ka'an), (Apéndice 4).

6.5.2. Determinación de cortisol

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C para obtener el suero y éste fue depositado en tubos Eppendorf y etiquetados para su identificación con el nombre del individuo, fecha y hora de muestreo. Las muestras fueron transportadas en refrigeración para su posterior congelación a -20° C en el laboratorio de la Dra. Marta Romano, del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN, hasta la determinación por radioinmunoanálisis.

Los hisopos con saliva fueron etiquetados con la identificación del organismo, fecha y hora de muestreo. Las muestras fueron transportadas en refrigeración hasta el laboratorio de la Dra. Romano donde fueron centrifugadas con unas coladeras especiales a 3000 rpm x 20 minutos a 4°C, posteriormente la saliva extraída del hisopo fue colocada en tubos eppendorf y congelada a -20°C hasta su posterior análisis.

La determinación de cortisol se realizó por medio de la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida (Reimers TJ, et. al, 1983; Ortiz RM, Worthy GAF, 2000; Möstl E, Palme R, 2002). Para el RIA de las muestras de suero y saliva se ocupó un kit de patente (Cort CT2 Bio International®, France) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Las muestras se midieron por duplicado, en tubos preparados con anticuerpos de conejo específicos de anticortisol, a los que se agregó el cortisol marcado con yodo radioactivo (I^{125}); la especificidad del sistema para detectar cortisol según el producto es de 100%. La sensibilidad del ensayo para las muestras de suero es de 4.6 nmol/l para la medida directa en suero, y de 0.8 nmol/l para la determinación a partir de saliva. La curva estándar para suero se realizó con 10 puntos: 2000, 1000,

500, 250, 125, 75, 37.5, 20, 10 y 5 nmol/l; y para saliva se utilizaron 11 puntos :125, 75, 37.5, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.15625 nmol/l. Posteriormente, las muestras fueron leídas en un contador gamma (Contador Cobra II Gama Counting System, Packard Inst. Co. ®) durante 1 minuto. El control íter-ensayo se hizo utilizando alícuotas de suero humano y el intraensayo fue uno de los estándares proporcionado por el fabricante.

Las muestras de saliva también se midieron por RIA utilizando ³H-cortisol y un anticuerpo de tipo policlonal, específico contra cortisol (AB916) desarrollado por los laboratorios CHEMICON (CHEMICON Lab., Temecula, CA 92590), levantado en conejos. El marcador utilizado fue hidrocortisona [1,2,6,7-³H(N)] 70-100 Ci/mmol, ó 1 mCi/ml etanol de NEN Life Science products, Inc. Se utilizaron 10 puntos estándares de la curva: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125 y 0.390625. Las muestras fueron leídas en un contador de centelleo Beckman LS 6000 TA®. Para el análisis de de la ecuación de la curva de regresión y de los niveles hormonales, se capturaron los resultados en CPM en el programa estadístico RIA Logit.

6.5.3. Cálculos y análisis estadístico

Por último se hizo el procedimiento de análisis de los datos obtenidos de las muestras de suero así como de saliva (Bedolla TN, et. al, 1984; Alvarez-Cervera JH, 2002). La curva estándar de cada ensayo se realizó con los resultados del porcentaje de unión y la concentración de los estándares del kit CORT-CT2 por regresión lineal. Ésta permite calcular posteriormente las concentraciones de hormona presentes en cada una de las muestras utilizando los porcentajes de unión a éstas (Zambrano AF, Díaz SV, 1996). Los datos fueron calculados mediante el uso del programa estadístico Graph pad Inplot, versión 4 (Graph Pad Software, Inc. ®, 1992).

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa de cómputo Statistica® Edición 98. Se aplicó la prueba para normalidad de Kurtosis para los datos y la distribución de los de cortisol sérico resultaron normales, por lo cual

se utilizaron pruebas de estadística paramétrica. Se determinaron intervalos de confianza al 95% para expresar diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Para determinar diferencias del cortisol en saliva y suero, se evaluaron diversas variables (sexo, edad, horarios y años de muestreo) mediante la prueba t-Student de muestras dependientes.

7. RESULTADOS DE COMPORTAMIENTO

7.1. CATÁLOGO DE CONDUCTAS REGISTRADAS EN UN GRUPO DE 8 MANATÍES CAUTIVOS EN EL ACUARIO DE VERACRUZ.

Objetivo

1. Determinar pautas de comportamiento para la especie en cautiverio.

Después de realizar observaciones durante 56 horas en los ocho manatíes mantenidos en cautiverio en el Acuario de Veracruz, mediante el método de muestreo "ad libitum", se obtuvo el siguiente catálogo de conductas individuales y sociales.

Conductas individuales

LOCOMOCIÓN

1. Nado.
 - 1.1. Nado normal: Locomoción frontal-horizontal con respecto a su cabeza, empleando aletas caudal y frontales para impulsarse hacia el frente.
 - 1.2. Nado vertical: Locomoción frontal-vertical con respecto a su cabeza, empleando aletas caudal y frontales para impulsarse hacia el frente.
 - 1.3. Nado de lado: Locomoción frontal, inclinándose en un ángulo de 90° con respecto al centro de gravedad, empleando aletas frontales y caudal para impulsarse hacia el frente.
 - 1.4. Nado de reversa: Locomoción en sentido contrario a su propio eje.
 - 1.5. Nado arqueado: Volteándose o arqueando el cuerpo para girar o cambiar de posición o rumbo.
2. Caminando: Apoyando aletas pectorales para impulsarse sobre alguna superficie, ya sea con dirección frontal o de reversa.
3. Arqueos: Flexión de cabeza y aleta caudal hacia atrás.
4. Encorvamientos: Flexión de las extremidades hacia el frente.
5. Giros: Nadando sobre el mismo cuerpo del animal.

ALIMENTACIÓN

6. Comer: Ingeriendo alimentos proporcionados.

7. Condiciones de coprofagia.

7.1. Comiendo heces.

7.2. En busca de heces: Revisando el ano de los demás manatíes, en algunas ocasiones, de ser necesario, empujándolos con el hocico o mordisqueándolos para hacer que se muevan de posición y así revisar con el hocico, mordisqueando el ano.

7.3. Autocoprofagia: Primero empujando con la aleta caudal el excremento, encorvándose, nadando en reversa y finalmente comiendo las heces.

8. Amamantando: Succionando o mordisqueando la glándula mamaria de la hembra preñada.

9. Filtrar o explorar: Mordisqueando el suelo y paredes en busca de restos de alimento, heces o algas.

10. Beber: Acercándose al tubo de agua dulce y chasqueando para tragar el agua.

DESCANSO

11.1. Descanso normal: suspensión momentánea de las actividades en que el animal reposa ventralmente sobre el substrato o sobre las extremidades quietas o en suspensión en el agua.

11.2. Descanso panza arriba: suspensión momentánea de las actividades en que el animal reposa dorsalmente sobre el substrato o en suspensión en el agua.

11.3. Descanso de lado: suspensión momentánea de las actividades en que el animal reposa lateralmente sobre el substrato o sobre las extremidades quietas o en suspensión en el agua.

ELIMINATIVA

12.1. Defecación

12.2. Gases

12.3. Exhalación: expulsando restos de comida por las narinas.

CUIDADO CORPORAL

13.1. Rascarse con aletas

13.2. Rascarse con objetos

13.3. Limpieza del hocico

13.4. No visualización: Permaneciendo en zonas del estanque en el que no eran visibles para las personas.

OTRAS ACTIVIDADES

14.1. Masturbación: Encorvándose y frotando con sus aletas pectorales el pene erecto.

14.2. Pene expuesto: donde el animal saca el pene en diferentes posturas, encorvado, en movimiento o inmóvil, ondulando el cuerpo.

14.3. Salpicando con cabeza: Agitando cabeza hacia arriba y abajo repetidamente, chapoteando, haciendo que salpique el agua.

14.4. Salpicando con aletas: Agitando una de las aletas pectorales fuera del agua para salpicar el agua.

14.5. Abdominales: Encorvándose, apoyando aleta caudal como base para levantar cabeza fuera del agua, haciendo la forma de una "c".

14.6. Chasquido: Abriendo y cerrando el hocico, produciendo un chasquido repetidamente, similar al que producen al momento de estar succionando el chupón de una mamila.

14.7. Espiando: Asomando la cabeza fuera del agua, observando hacia la entrada del lugar donde se les proporciona el alimento.

Conductas sociales

15.1. Cópula: Penetración del órgano reproductor masculino en la vagina de la hembra.

15.2. Abrazo: Sujetando y rodeando con ambas aletas pectorales a otro(s) manatí(es), persona o algún objeto.

15.3. Socializar: Acercándose y observando a los visitantes, dejándose tocar, en algunas ocasiones apoyando la(s) aleta(s) fuera del agua sobre el borde del encierro para tocar a los visitantes o invitarlos a tocarlos, en algunas ocasiones volteándose panza arriba voluntariamente para que los visitantes les frotaran la panza.

15.4. Mordisquear o "besar": Abriendo y cerrando el hocico, moviendo los labios, frotándolos en el cuerpo de otro animal .

15.5. Empujones: Desplazamiento de otro animal por presión.

15.6. Vocalización: Emitiendo sonidos agudos.

15.7. Homosexualismo: Penetración del órgano reproductor masculino en el orificio genital de otro macho, acompañado de abrazos, frotamiento del hocico en el cuerpo y rostro de otro animal.

15.8. Pidiendo leche: Vocalizando, emitiendo sonidos agudos cortos y seguidos repetidamente durante la toma de leche de una cría de manatí, permaneciendo flotando pegada a la cría y observando al alimentador.

15.9. Giros y vocalización: Nadando en un espacio reducido (aprox. 1.7 m), sobre la plataforma enfrente de una de las vitrinas de exhibición, dando vueltas y emitiendo sonidos constantemente en el mismo lugar.

7.2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS CONDUCTAS Y LAS PROPORCIONES DE TIEMPO EMPLEADAS EN CADA CATEGORÍA.

Objetivo

1. Describir las principales conductas registradas y el porcentaje de tiempo empleado en cada una.

Metodología

Para calcular la proporción del tiempo en estados de comportamiento, se dividió el número de barridos de la conducta / total de barridos realizados.

Resultados

Se presentan los promedios generales empleados en los cinco comportamientos principales registrados en siete manatíes antillanos en cautiverio (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedios generales de tiempo empleados en las principales pautas de comportamiento individuales registradas en siete manatíes antillanos del Acuario de Veracruz.

Categorías de comportamiento	Porcentaje de tiempo empleado (Promedio \pm D.E.)	Promedio de horas aproximadas empleadas
1. Locomoción	45.14 \pm 11.48	5 horas, 25 minutos
2. Alimentación General	22.24 \pm 5.46	2 horas, 40 minutos
<i>Alimentación proporcionada</i>	14.57 \pm 3.77	1 hora, 45 minutos
<i>Filtración o exploración</i>	4.57 \pm 3.52	33 minutos
<i>Coprofagia</i>	2.71 \pm 2.71	20 minutos
<i>Tomar agua</i>	0.33 \pm 0.29	2 minutos
3. Descanso	20.05 \pm 9.07	2 horas, 25 minutos
4. No visualización	11.27 \pm 4.12	1 hora, 21 minutos
5. Cuidado corporal	0.32 \pm 0.51	2 minutos

Se evaluó la proporción del tiempo empleado por sexo en cada una de las conductas individuales mediante la prueba de Mann-Whitney, y no se encontraron diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$, Apéndice 3).

Se analizó la proporción del tiempo empleado por edad en cada una de las conductas individuales mediante la prueba de Anova de 1 vía, y no se encontraron diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$, Apéndice 4).

7.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PÚBLICO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE 8 MANATÍES CAUTIVOS EN EL ACUARIO DE VERACRUZ.

Objetivo

1. Determinar si la presencia de público modifica las pautas de comportamiento del manatí.

Metodología

Se comparó la proporción del tiempo empleado en las diferentes categorías de conducta individual durante las temporadas de alta y baja afluencia de público, ambas observadas desde dos áreas, técnica y pública. Debido a que en la pecera donde son resguardados los manatíes contaban con 2 áreas de exposición al público, y por la infraestructura del lugar no se podían observar ambas al mismo tiempo, los registros fueron tomados desde el área pública (donde podían ser observados por los visitantes al Acuario) y del área técnica (a ésta sólo tienen acceso el personal del Acuario y visitas guiadas por personal del mismo; Fig. 3). Para el análisis del comportamiento en días de baja y alta afluencia de público, en el que se realizaron las observaciones desde las áreas técnica y pública, los datos tuvieron una distribución normal, por lo que se aplicó una t-Student para muestras pareadas ($p < 0.05$). Al analizar el comportamiento de los manatíes individualmente, los valores mostraron una distribución no normal y mostraron una gran desviación estándar, por lo que estos datos se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$).

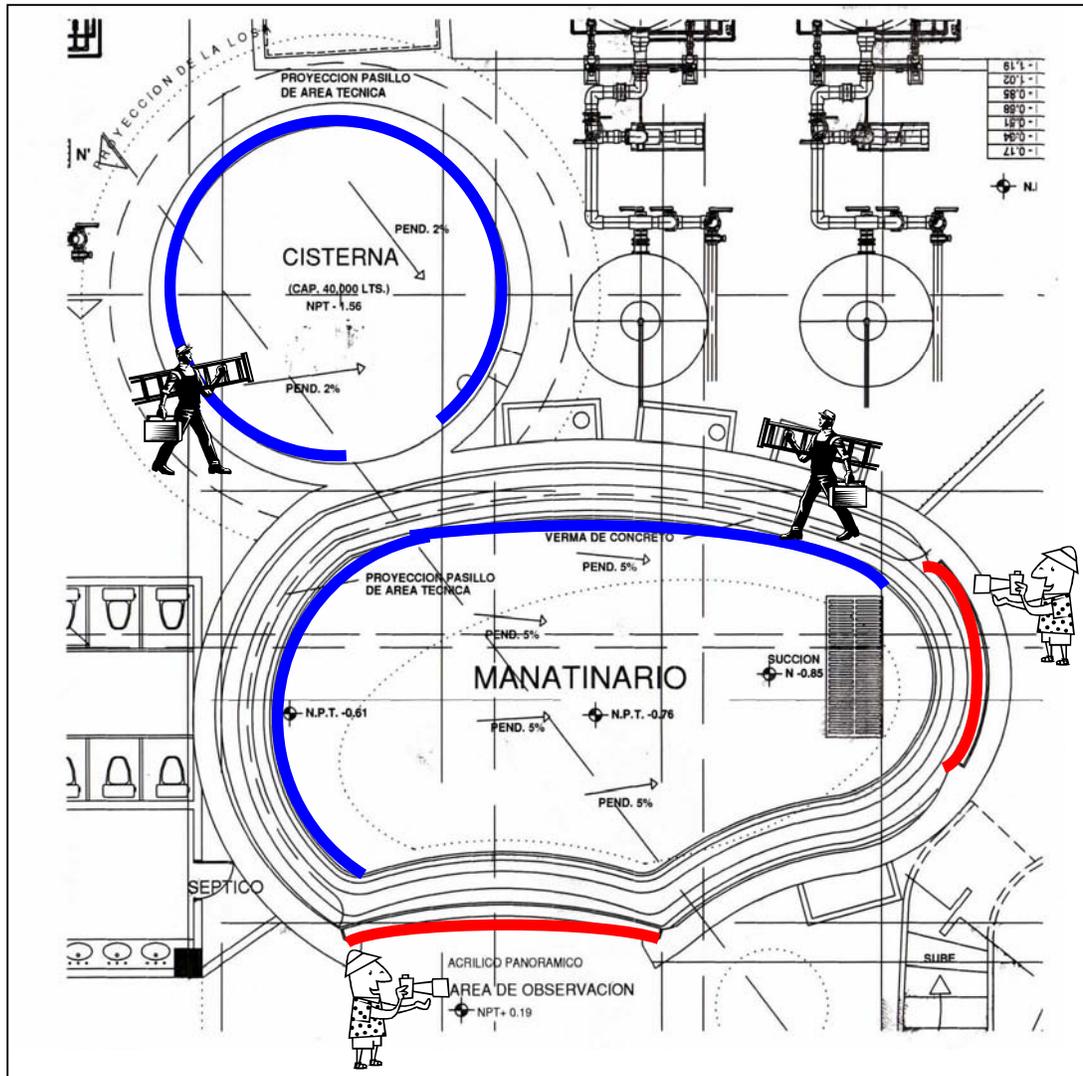


Fig. 3. Croquis del manatario del Acuario de Veracruz.

— Las líneas azules indican el área de observación desde el área técnica, donde sólo el personal del Acuario de Veracruz tiene acceso, aunque también pueden acceder visitas bajo vigilancia técnica.

— Las líneas rojas indican el área de observación desde el área pública, donde todo el público tiene acceso.

Resultados

Al evaluar el impacto de la exposición al público sobre la proporción de tiempo empleado en las diferentes conductas en los siete manatíes, se compararon los promedios generales de los siete animales en días de alta afluencia de público (A= 120 horas en total) y en días de baja afluencia de

público (B=92 horas en total). Como se observa en el cuadro 4, no existieron diferencias significativas entre comportamientos en condición A y B, excepto en el comportamiento de ocultarse, el cual se presentó más durante la temporada de baja afluencia (Cuadro 5, $p < 0.05$).

Cuadro 5. Comparación de la proporción del tiempo empleado en cada comportamiento de siete manatíes antillanos, en días de baja y alta afluencia de público en el Acuario de Veracruz (en un horario de 9:00 a 21:00 horas).

Conducta individual	Área	Baja Afluencia	Alta Afluencia	Valor de t-student	Valor de P
Locomoción	T	55.29(±17.45)	50.37(±9.14)	1.02	0.35
	P	37.29(±8.36)	37.59(±10.96)	0.11	0.92
Correlación	T y P	0.85*	0.57		
Alimentación General	T	19.59(±7.92)	22.71(±1.75)	0.99	0.36
	P	20.87(±5.66)	25.8(±6.5)	2.26	0.07
Correlación	T y P	0.96*	0.4		
Descanso	T	19.79(±9.99)	22.0(±7.87)	0.98	0.37
	P	18.52(±9.11)	19.9(±9.3)	0.58	0.58
Correlación	T y P	0.97*	0.69*		
No visualización	T	3.26(±2.66)	3.01(±1.53)	0.21	0.84
	P	22.85(±6.22)	15.94(±6.06)	2.52	0.04*
Correlación	T y P	0.54	0.08		
Cuidado corporal	T	0	0.71(±0.89)	-----	-----
	P	0.26(±0.67)	0.29(±0.49)	0.16	0.88
Correlación	T y P	-----	0.12		

T: Área técnica y **P:** Área pública.

Los valores representan los promedios (±DE) de 7 manatíes del Acuario de Veracruz.

Los valores marcados con (*) son estadísticamente diferentes, t-Student para muestras pareadas, $p < 0.05$.

En la prueba de correlación entre áreas, los valores mostrados marcados con (*) están fuertemente relacionados, $p < 0.05$.

Posteriormente se decidió separar la alimentación general en subcategorías, debido a que la subcategoría de alimentación proporcionada era controlada por los humanos y a que se tenía una hora establecida para esto, entonces no importaría realmente el efecto del público. Por tal motivo, quisimos saber si las demás subcategorías (filtración o exploración y coprofagia), que no eran controladas, sí variaban de acuerdo a la cantidad de público. Por lo que para su análisis, la alimentación se subdividió en: alimentación proporcionada, filtración o exploración, coprofagia y beber agua, y por lo tanto se analizó por separado. No se encontraron diferencias significativas en estos comportamientos, excepto en el de filtrar o explorar, el cual se registró más durante la temporada de baja afluencia (Cuadro 6, $p < 0.05$).

Cuadro 6. Comparación de la proporción del tiempo empleado en cada subcategoría de alimentación de siete manatíes antillanos, en días de baja y alta afluencia de público en el Acuario de Veracruz (en un horario de 9:00 a 21:00 horas).

Conducta individual	Área	Baja afluencia	Alta Afluencia	Valor de t-student	Valor de P
Alimentación proporcionada	T	13.18(±4.71)	16.34(±3.54)	1.12	0.3
	P	10.08(±2.5)	18.66(±4.31)	3.74	0.01*
Correlación	T y P	0.58	0.14		
Filtración o exploración	T	4.07(±3.47)	3.81(±2.54)	0.38	0.71
	P	7.24(±4.77)	3.16(±3.3)	3.8	0.009*
Correlación	T y P	0.83*	0.67		
Coprofagia	T	2.13(±2.0)	1.99(±2.18)	0.2	0.85
	P	3.05(±3.8)	3.66(±2.85)	0.5	0.63
Correlación	T y P	0.76*	0.81*		

T: Área técnica y **P:** Área pública.

Los valores representan los promedios (±DE) de 7 manatíes del Acuario de Veracruz.

Los valores marcados con (*) son estadísticamente diferentes, t-Student para muestras pareadas, $p < 0.05$.

En la prueba de correlación, los valores mostrados marcados con (*) están fuertemente relacionados, los tratamientos son significativamente efectivos, $p < 0.05$.

Debido a que se presentó una gran desviación estándar entre organismos, se decidió analizar los comportamientos por individuo, a continuación se pueden apreciar las diferencias entre individuos por comportamiento (Fig. 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

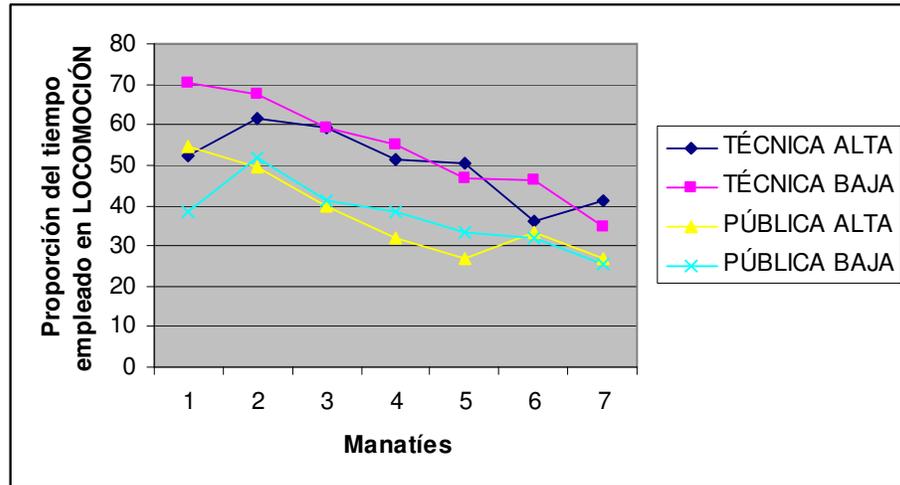


Fig. 4. Los valores representan el promedio individual en locomoción de 7 manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública.

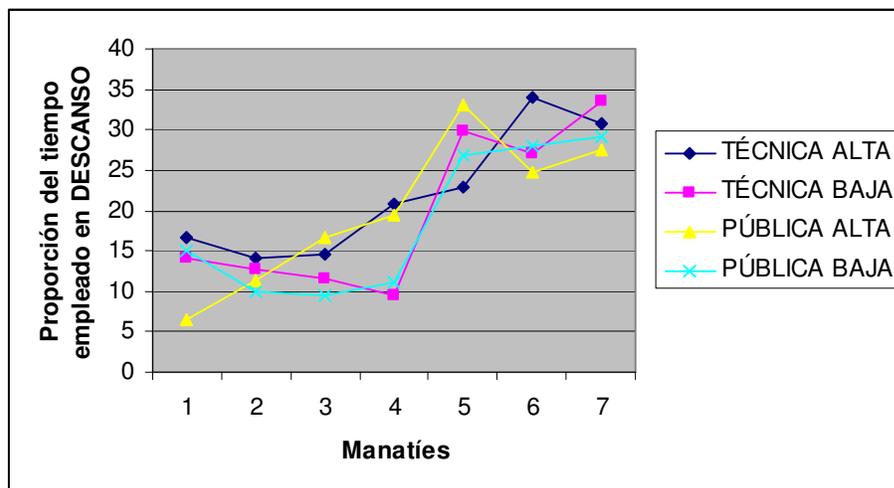


Fig. 5. Los valores representan el promedio individual en descanso de 7 manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública.

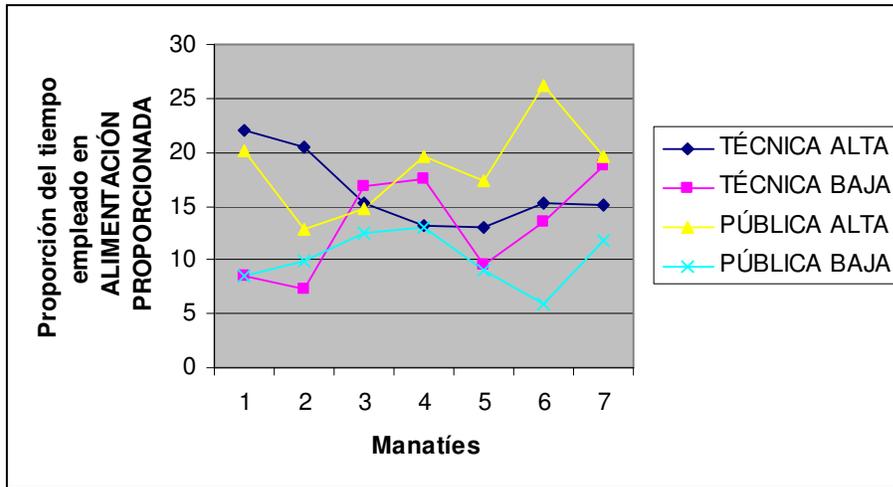


Fig. 6. Los valores representan el promedio individual en alimentación proporcionada de 7 manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública.

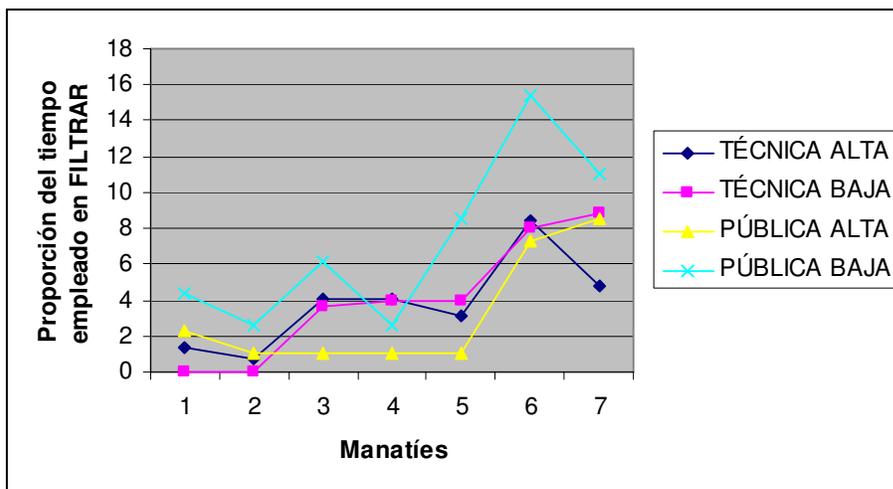


Fig. 7. Los valores representan el promedio individual en filtrar de 7 manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública.

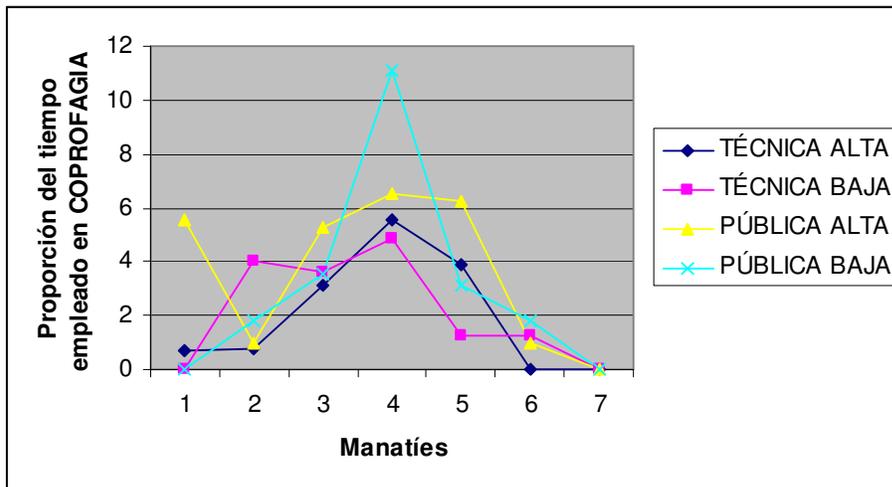


Fig. 8. Los valores representan el promedio individual en coprofagia de 7 manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública.

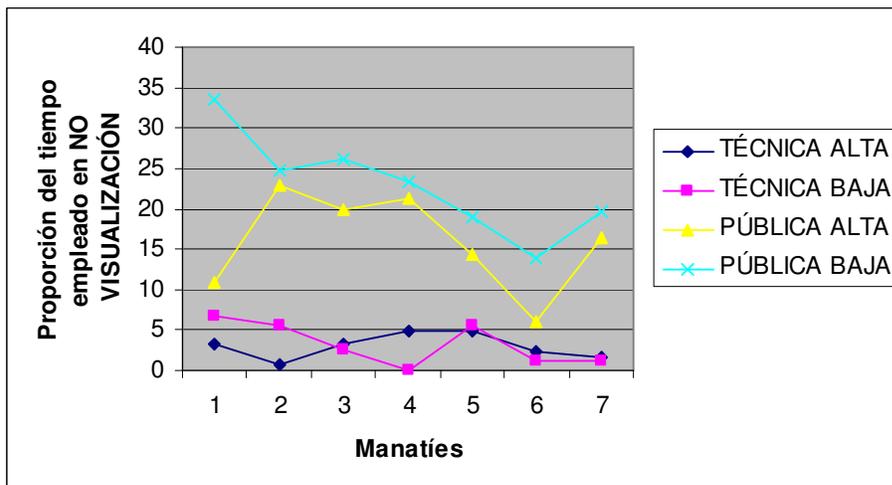


Fig. 9. Los valores representan el promedio individual en que los 7 manatíes del Acuario de Veracruz no fueron visuales para el observador (en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública).

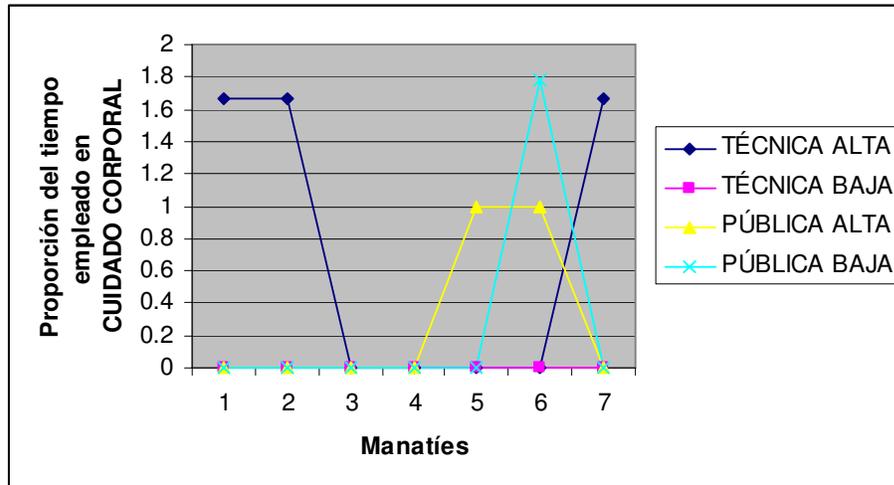


Fig. 10. Los valores representan el promedio individual en cuidado corporal de 7 manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública.

Para cerciorarnos de que realmente no existieran diferencias significativas entre temporadas de alta y baja afluencia de público para cada comportamiento, se decidió analizarlos por individuo. Para esto se utilizó la prueba de Wilcoxon, debido a que los datos no presentaron una distribución normal ($p < 0.05$).

En cuanto al comportamiento de locomoción, no existieron diferencias significativas entre temporadas de alta y baja afluencia de público ($p > 0.05$), sólo el manatí 1 (Pablo) presentó mayor locomoción ($70.45\% \pm 5.34\%$ E.E.) durante la temporada de baja afluencia observado desde el área técnica ($p < 0.05$). Esta tendencia se presentó también en los manatíes 2 (Costeña), 4 (César) y 7 (Marina) con las observaciones realizadas desde el área técnica y pública, pero sin ser estadísticamente diferentes, $p > 0.05$, (Fig. 11). En cuanto al comportamiento de coprofagia, es importante resaltar que el único que no registró esta conducta fue el manatí 7 (Marina, la única cría del estudio). A la vez, los dos únicos machos juveniles del estudio, los manatíes 3 (Ángel) y 4 (César), no registraron en ninguna ocasión el comportamiento de cuidado corporal.

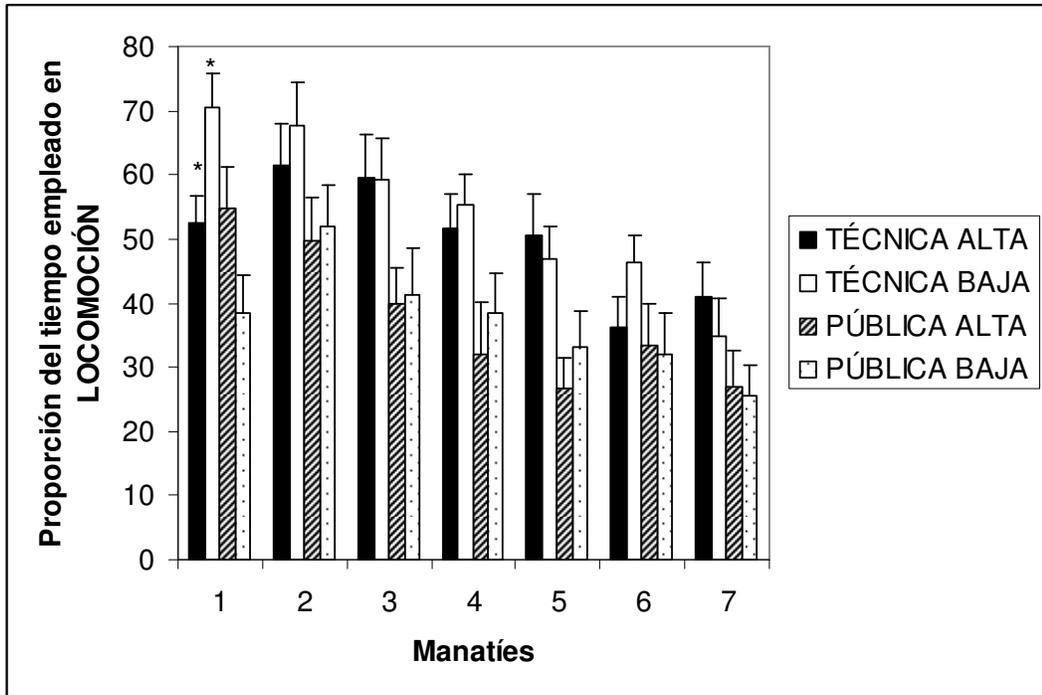


Fig. 11. Los valores representan el promedio individual (\pm EE) en locomoción de 7 manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública.

Los valores marcados con (*) son estadísticamente diferentes, Wilcoxon, $p < 0.05$.

No se presentaron diferencias significativas por individuo en del comportamiento de descanso durante las condiciones de alta y baja afluencia de público registradas desde el área técnica y pública (t-student de muestras pareadas, $p > 0.05$, Fig. 12). Pero existen tendencias por parte de los manatíes 2 (Costeña), 3 (Ángel) y 4 (César) de descansar más tiempo durante la condición de alta afluencia de público, sin embargo para la manatí 7 (Marina) esta tendencia es contraria, ya que ella descansa más tiempo durante la condición de baja afluencia de público, en observaciones realizadas desde el área técnica y pública.

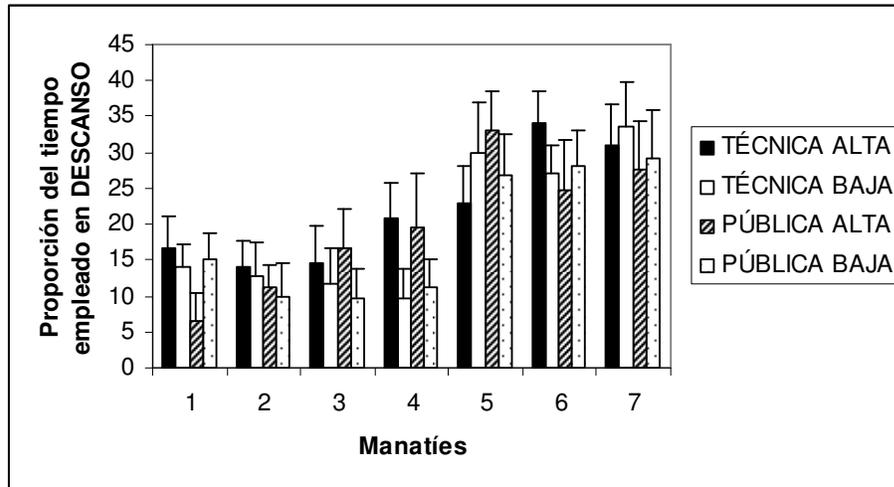


Fig. 12. Los valores representan el promedio individual (\pm EE) en descanso de 7 manatíes del Acuario de Veracruz en temporadas de alta y baja afluencia de público y observados desde dos áreas, técnica y pública.

Los manatíes antillanos estuvieron más tiempo no visibles en la condición de baja afluencia de público, observado desde el área pública ($t=2.52$, $p<0.05$, Fig. 13).

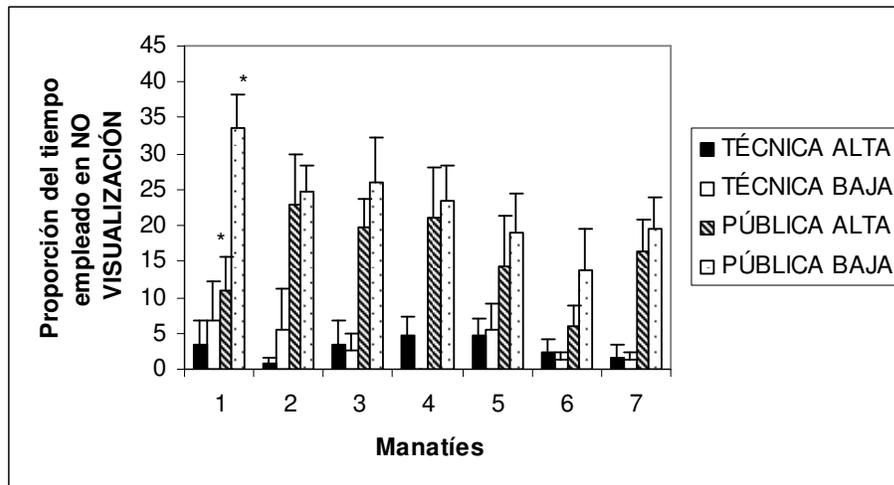


Fig 13. Porcentaje de tiempo (\pm EE) en que no fueron visuales cada uno de los manatíes antillanos ($n=7$) en las dos condiciones de público (alta ya baja afluencia) y desde dos áreas de observación (técnica y pública). Los valores marcados con (*) son estadísticamente diferentes, Wilcoxon, $p<0.05$.

Debido a que el comportamiento de cuidado corporal no se registró mucho, no se pudieron aplicar estadísticos de prueba, por lo que sólo podemos sugerir que existe una tendencia de que se presenta en mayor proporción durante la condición de alta afluencia de público en los manatíes 1 (Pablo), 2 (Costeña), 5 (Dominga) y 7 (Marina), mientras que para la manatí 6 (Sabina) se presentó más esta conducta durante la temporada de baja afluencia de público (Fig. 14).

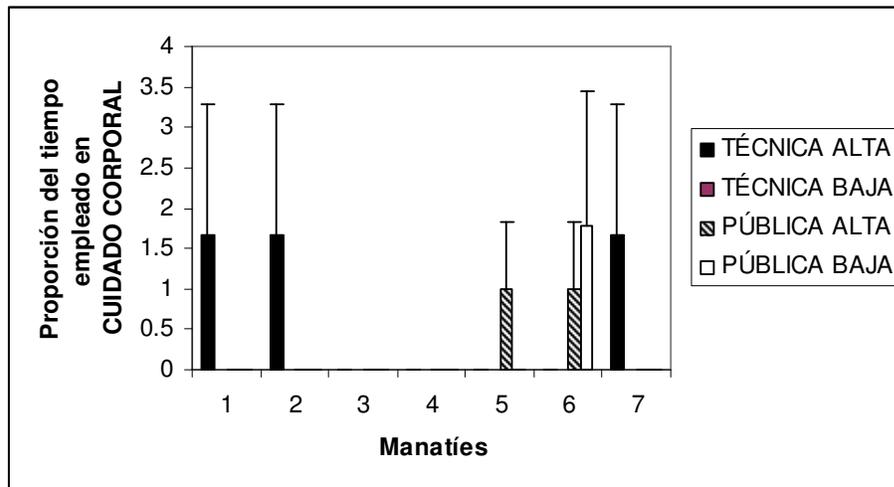


Fig 14. Porcentaje de tiempo (\pm EE) dedicado a cuidado corporal en cada uno de los manatíes antillanos ($n=7$) en las dos condiciones de público (alta ya baja afluencia) y desde dos áreas de observación (técnica y pública).

No se presentaron diferencias significativas entre condiciones de alta y baja afluencia de público individualmente ($p>0.05$). Sólo el manatí Pablo se alimentó más durante la temporada de alta afluencia de público, observado desde el área técnica y esta tendencia se registró de igual forma desde el área pública, sólo que ésta última no fue significativamente diferente (Fig. 15, Wilcoxon, $p<0.05$). Los manatíes Costeña, Dominga y Sabina presentan una tendencia de alimentarse más tiempo durante la condición de alta afluencia de público (observado desde las áreas técnica y pública), sin ser estadísticamente diferentes ($p>0.05$).

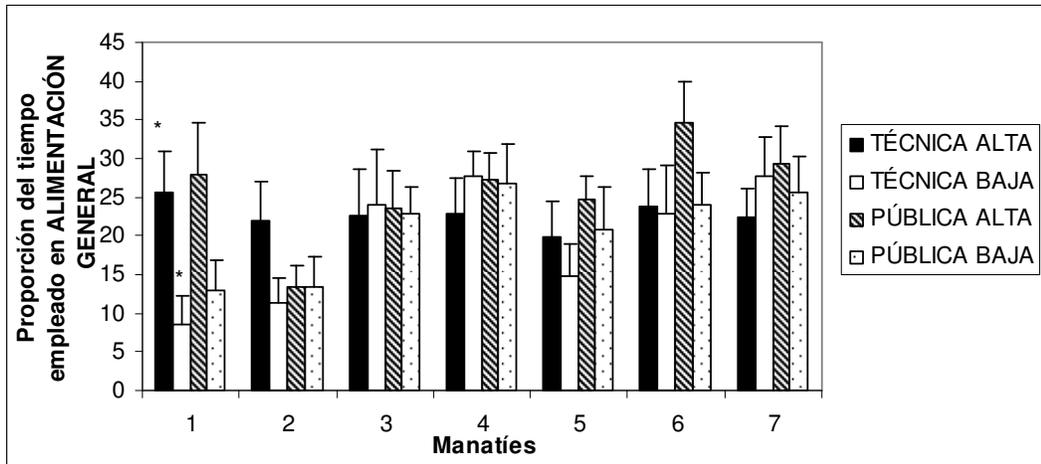


Fig 15. Porcentaje de tiempo (\pm EE) dedicado al comportamiento de alimentación en general en cada uno de los manatíes antillanos ($n=7$) en las dos condiciones de público (alta ya baja afluencia) y desde dos áreas de observación (técnica y pública). Los valores marcados con (*) son estadísticamente diferentes, Wilcoxon, $p<0.05$.

En cuanto al comportamiento de alimentación proporcionada, no se encontraron diferencias significativas entre temporadas de alta y baja afluencia de público, sólo los manatíes Pablo y Sabina comieron más el alimento proporcionado durante la temporada de alta afluencia de público ($p<0.05$). Este comportamiento se observó en Pablo desde el área técnica y en Sabina desde el área pública (t-Student, $p<0.05$) y siguieron esta tendencia (sin ser significativamente diferentes) durante la condición de alta afluencia en ambas áreas de observación (técnica y pública, Fig. 16). También las manatíes Costeña y Dominga tuvieron la tendencia de alimentarse más durante la temporada de alta afluencia de público (observadas desde las áreas técnica y pública) sin ser estadísticamente diferentes.

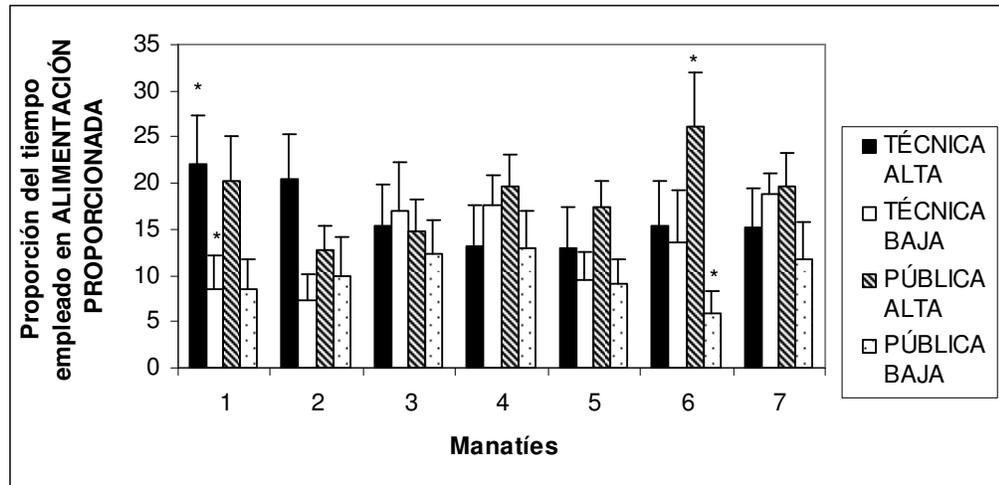


Fig 16. Porcentaje de tiempo (\pm EE) dedicado al comportamiento de alimentación proporcionada en cada uno de los manatíes antillanos ($n=7$) en las dos condiciones de público (alta ya baja afluencia) y desde dos áreas de observación (técnica y pública). Los valores marcados con (*) son estadísticamente diferentes, Wilcoxon, $p<0.05$.

El comportamiento de coprofagia se presentó en seis de los siete manatíes observados (excepto el manatí 7, Marina), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre temporadas de alta y baja afluencia de público (Wilcoxon, $p>0.05$). El manatí 4 (César) fue el que registró en mayor proporción este comportamiento (7% de proporción de tiempo). Los manatíes 1 (Pablo) y 5 (Dominga) mostraron una tendencia de presentar más este comportamiento durante la condición de alta afluencia de público, mientras que el 2 (Costeña) y el 6 (Sabina) presentaron mayores registros de coprofagia durante la condición de baja afluencia de público, en ambos casos se registró lo mismo desde las áreas técnica y pública (Fig. 17).

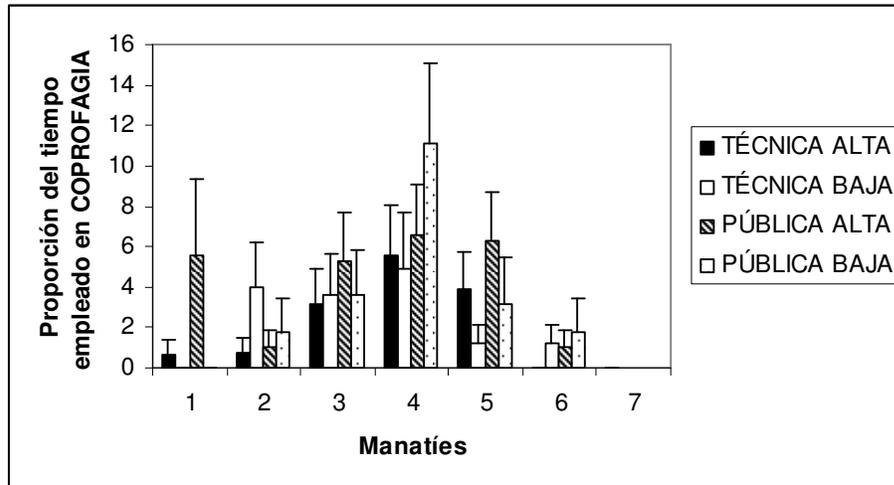


Fig 17. Porcentaje de tiempo (\pm EE) dedicado al comportamiento de coprofagia en cada uno de los manatíes antillanos ($n=7$) en las dos condiciones de público (alta ya baja afluencia) y desde dos áreas de observación (técnica y pública).

En el comportamiento de filtrar o explorar, no se encontraron diferencias significativas entre temporadas de alta y baja afluencia de público (Wilcoxon, $p>0.05$). Sin embargo, se observó una tendencia en las manatíes 5 (Dominga) y 7 (Marina) de emplear más tiempo filtrando en temporada de baja afluencia de público, observado desde las áreas técnica y pública (Fig. 18).

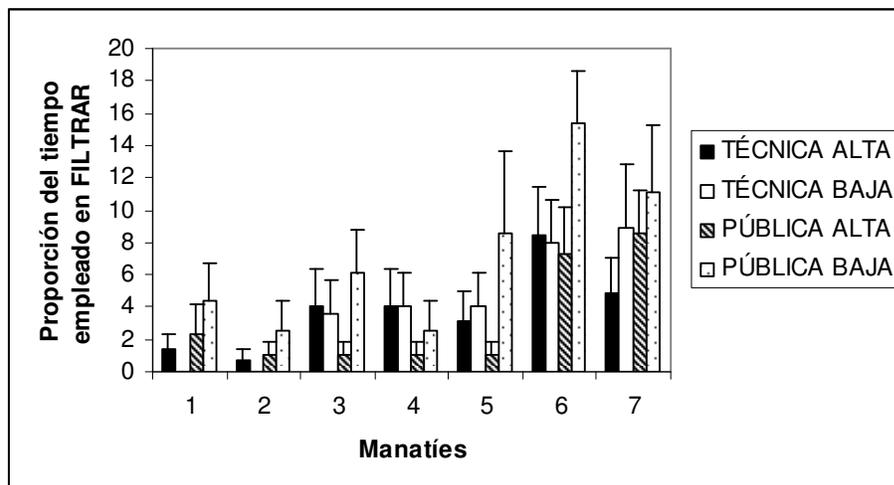


Fig 18. Porcentaje de tiempo (\pm EE) dedicado al comportamiento de filtrar en cada uno de los manatíes antillanos ($n=7$) en las dos condiciones de público (alta ya baja afluencia) y desde dos áreas de observación (técnica y pública).

8. MEDICIÓN DE CORTISOL EN SUERO

8.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA MEDICIÓN DE CORTISOL EN SUERO EN EL MANATÍ ANTILLANO

Objetivo

1. Estandarizar la técnica para la evaluación de cortisol a partir de suero de manatí antillano por medio de radioinmunoanálisis (I^{125}), utilizando un estuche comercial disponible en México.

Obtención de muestras de suero

Todas las muestras de suero se tomaron mediante el manejo de los organismos fuera del agua y conteniéndolos físicamente para la venopunción en la aleta pectoral. Se colectaron las muestras de suero de 24 manatíes (Cautiverio=13, en 3 sitios: Acuario de Veracruz, C.C.I. de Jonuta y Parque Chucté; Vida libre=11, en 4 sitios: Sian Ka'an, Laguna de las Ilusiones, Laguna Barbona y Río San Pedro, apéndice 6 y 7). Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C para obtener el suero y éste fue depositado en tubos eppendorf y etiquetados para su identificación con el nombre del individuo, fecha y hora de muestreo. Las muestras fueron transportadas en refrigeración para su posterior congelación a -20° C.

Extracción de la hormona

Para realizar la curva de dilución, se extrajo un pool de 3 muestras de suero para así poder concentrarlas y realizar diluciones seriadas y la cuantificación de las mismas (Cuadro 7). Para la extracción de suero se utilizó el método de extracción para orina que recomienda el kit de CORT-CT2®, para evitar cualquier reacción que pudiera interferir en la medición. El método se modificó quitando los lavados con NaOH 0.1 molar y agua destilada, debido a que se perdía concentración de la hormona. La extracción de suero se realizó de la siguiente manera: se agregaron 5 ml de diclorometano por cada ml de muestra (relación 5:1), se agitó en el vórtex por una hora, se dejó reposar media hora, se retiró el sobrenadante, y se secó el infranadante (fase acuosa y

clara, el diclorometano con la hormona) y se secaron con nitrógeno. Las muestras se guardaron en congelación a -20°C hasta que se realizó el RIA. Para el RIA, las muestras de suero extraídas se resuspendieron en Buffer TRIS-HCl 0.1M, pH 7.4 con 0.2% BSA.

Cuadro 7. Listado de muestras de suero concentradas utilizadas para la curva de dilución.

Núm. Muestra	Manatí	Sexo	Edad	Lugar	Medio	Cantidad concentrada (ml)
21	Sisha´	♀	Juvenil	Jonuta	Suero	8
27	Ximena BA11	♀	Adulta	Sian Ka´an	Cit Na	8
28	BA10	♂	Juvenil	Sian Ka´an	Cit Na	2.5

Radioinmunoanálisis

La determinación de cortisol se realizó como se describió más arriba por medio de la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida.

Resultados

El coeficiente de variación ínter-ensayo promedio total, fue de 1.12% ± 0.85 y el promedio total del coeficiente de variación intraensayo fue de 1.97% ± 1.42. Dentro de las pruebas de validación, se comprobó la exactitud del ensayo mediante la prueba de curva de dosis-respuesta, la cual mostró una correlación, $r^2 > 0.95$, de la relación entre la concentración de la hormona estándar añadida y la concentración del analito a evaluar. Esta prueba se realizó con 3 muestras de suero de 3 manatíes antillanos (Cuadro 7), (Fig. 19, 20 y 21).

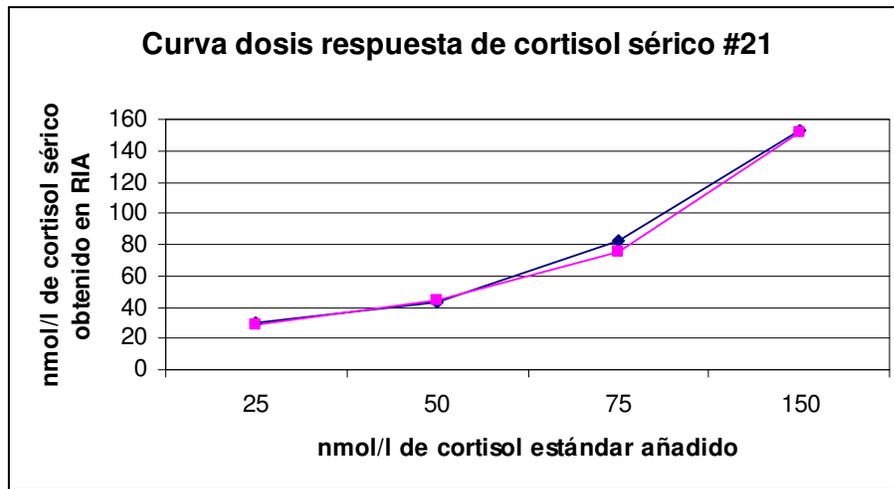


Fig. 19. Gráfica de regresión lineal para el análisis de la curva dosis-respuesta de una muestra de suero de una hembra juvenil (Sisha') de manatí antillano.

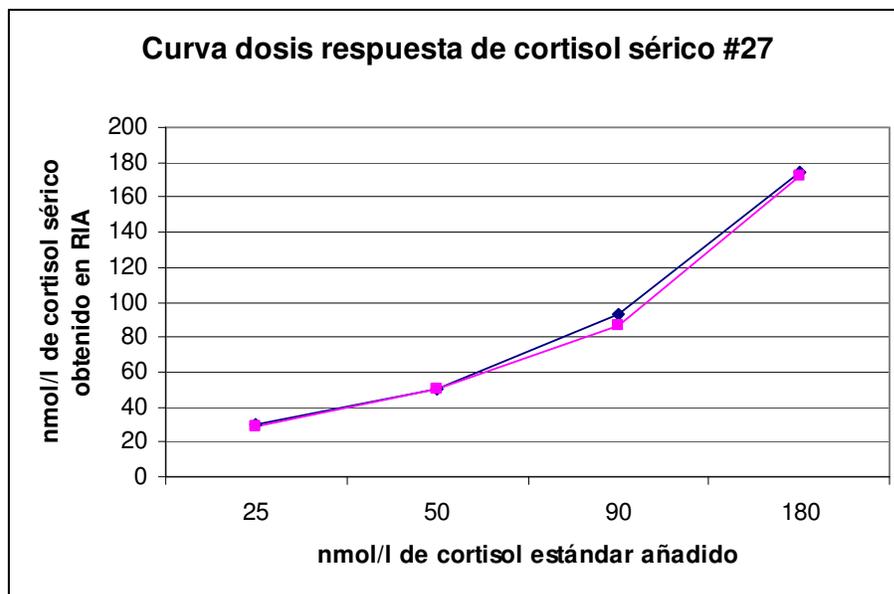


Fig. 20. Gráfica de regresión lineal para el análisis de la curva dosis-respuesta de una muestra de suero de una hembra adulta (Ximena) de manatí antillano.

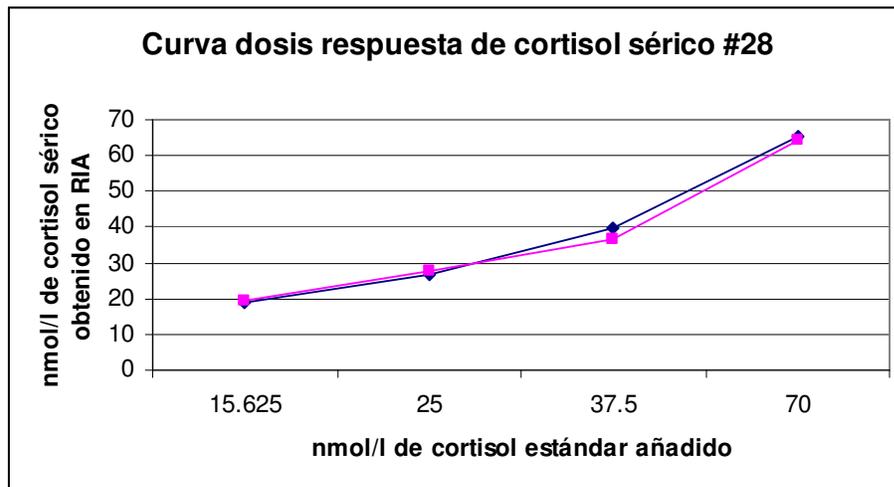


Fig. 21. Gráfica de regresión lineal para el análisis de la curva dosis-respuesta de una muestra de suero de un macho juvenil (BA10) de manatí antillano.

El paralelismo de las muestras también se comprobó con 3 muestras de suero concentradas (#21, 27 y 28), a las cuales se les realizó 5 diluciones, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 y 1:16, (Ver Fig. 22, 23 y 24).

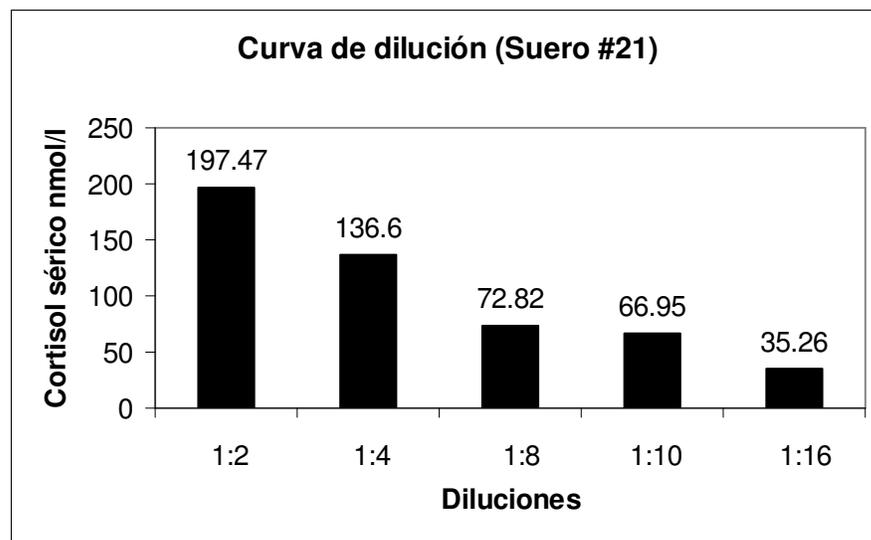


Fig. 22. Gráfica del paralelismo del % de unión del anticuerpo con la hormona estándar; con las diluciones decrecientes del extracto de suero de una hembra juvenil (Sisha').

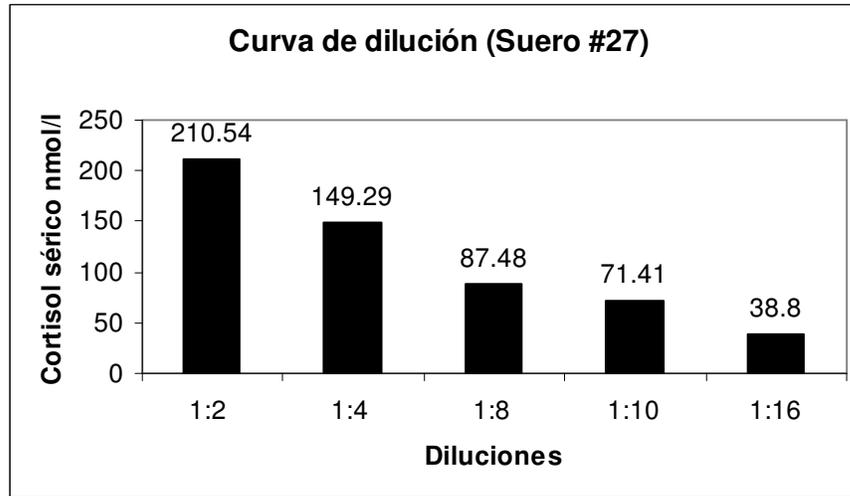


Fig. 23. Gráfica del paralelismo del % de unión del anticuerpo con la hormona estándar; con las diluciones decrecientes del extracto de suero de una hembra adulta (Ximena).

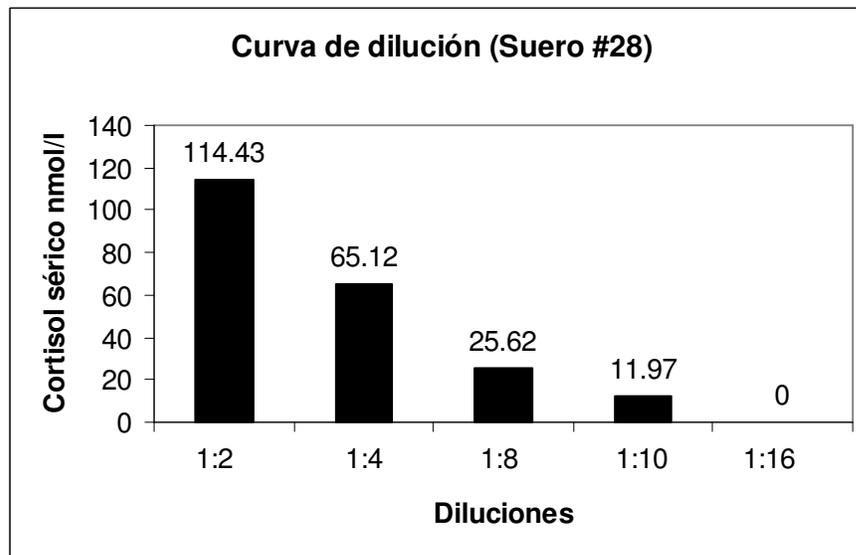


Fig. 24. Gráfica del paralelismo del % de unión del anticuerpo con la hormona estándar; con las diluciones decrecientes del extracto de suero de un macho juvenil (BA10).

8.2. COMPARACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE OBTENIDAS CON DIFERENTES MEDIOS (SUERO Y PLASMA) PARA LA MEDICIÓN DE CORTISOL SÉRICO EN MANATÍES ANTILLANOS

Objetivo

1. Evaluar si existen diferencias entre muestras pareadas de suero y plasma (EDTA y citrato de sodio) para la determinación de cortisol con el kit CORT-CT2.

Metodología

Una vez validada la prueba, los RIA's con el kit CORT-CT2 para las muestras séricas se midieron directamente, sin realizar ninguna extracción y bajo las especificaciones del proveedor, para lo cual sólo se requirió de 20 µl de suero por duplicado para su medición.

Resultados

Debido a que las muestras de sangre de los manatíes fueron proporcionadas por diferentes investigadores, se tienen muestras de suero y de plasma (en donde se utilizó como anticoagulante EDTA y citrato de sodio) de 5 manatíes, por lo que se decidió analizar si existían diferencias entre muestras por el tipo de medio con el que se colectaron. Para esto sólo se utilizaron muestras pareadas (n=5), de las que se tenían suero y plasma del mismo organismo y del mismo tiempo de colecta. No se encontraron diferencias significativas entre suero vs. plasma (promedio \pm D.E., 9.37 \pm 2.26 nmol/l; 9.06 \pm 1.95 nmol/l respectivamente; t=0.68, p<0.05) y existe una fuerte correlación entre ambos tipos de muestras (r=0.89). (Fig. 25).

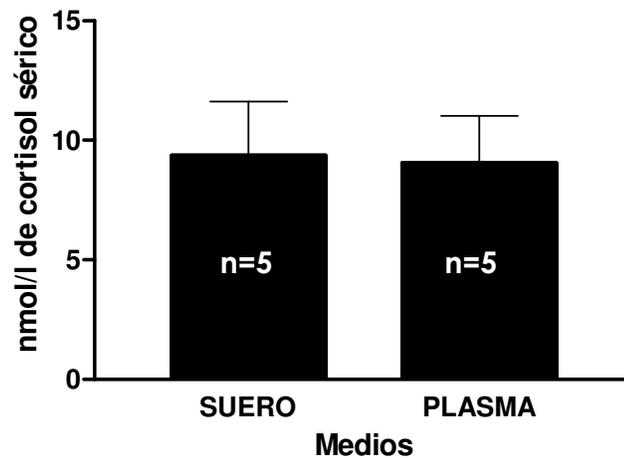


Fig. 25. Comparación de la detección de cortisol sérico de 5 manatíes por diferentes medios (suero vs. plasma). Los valores representan el promedio \pm D.E.

8.3. DETERMINACIÓN DEL RANGO DE CORTISOL SÉRICO PARA LA ESPECIE EN CAUTIVERIO Y VIDA LIBRE POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Objetivo

1. Reportar los valores promedio de cortisol sérico para la especie *T. manatus manatus* en cautiverio y vida libre.

Suero o plasma

El rango de cortisol en suero o plasma para 24 manatíes antillanos fue de 5.72-19.7 nmol/l y el promedio \pm D.E. fue de 10.1 ± 2.92 nmol/l (Cautiverio=13, en 3 sitios: Acuario de Veracruz, C.C.I. de Jonuta y Parque Chucté; Vida libre=11, en 4 sitios: Sian Ka'an, Laguna de las Ilusiones, Laguna Barbona y Río San Pedro).

8.4. EVALUACIÓN DE CORTISOL SÉRICO EN MANATÍES DE VIDA LIBRE Y SU COMPARACIÓN CON ANIMALES MANTENIDOS EN CAUTIVERIO

Objetivo

1. Evaluar la influencia del origen de los manatíes sobre los niveles de cortisol sérico.

Resultados

Se muestran los niveles de cortisol sérico (obtenidos mediante contención de los animales) por sitio de muestreo, incluyéndose todos los sitios de cautiverio (Acuario de Veracruz, C.C.I. de Jonuta y Parque Chucté) y organismos de vida libre de 4 sitios de muestreo (Sian Ka'an, Laguna de las Ilusiones, Laguna Barbona y Río San Pedro). (Fig. 26 y Cuadro 8).

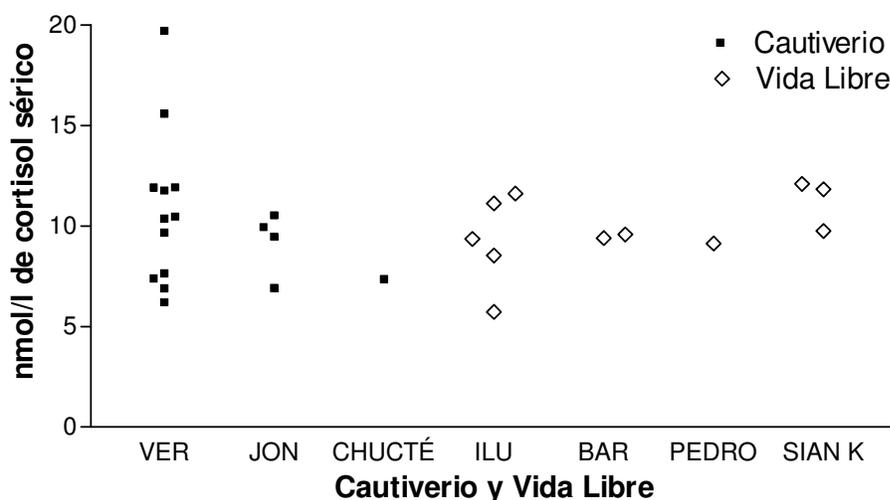


Fig. 26. Distribución de rangos de cortisol sérico por sitio de muestreo. CAUTIVERIO: Acuario de Veracruz (VER; el promedio de cortisol sérico fue de 10.79 nmol/l \pm 1.12 E.E., n=12); C.C.I. de Jonuta (JON; el promedio de cortisol sérico fue de 9.22 nmol/l \pm 0.8 E.E., n=4); Parque Chucté (CHUCTÉ; el valor fue de 7.36 nmol/l de cortisol sérico, n=1); VIDA LIBRE: en Tabasco se tomaron muestras de la Laguna de las Ilusiones (ILU; el promedio de cortisol sérico fue de 9.27 nmol/l \pm 1.05 E.E., n=5); Laguna Barbona (BAR; el promedio de cortisol sérico fue de 9.49 nmol/l \pm 0.09 E.E., n=2); Río San Pedro (PEDRO; el valor fue de 9.13 nmol/l de cortisol sérico, n=1); en Quintana Roo se tomaron muestras en la Reserva de Sian Ka'an (SIAN K; el promedio de cortisol sérico fue de 11.23 nmol/l \pm 0.74 E.E., n=3).

Cuadro 8. Relación de los niveles de cortisol sérico (nmol/l) de 28 manatíes antillanos en cautiverio y vida libre.

Condición	Lugar	# de muestras	Promedio nmol/l ± E.E.	Promedio general nmol/l ± D.E. (n)
Cautiverio	VER: Acuario de Veracruz	12	10.79 ± 1.12	10.22 ± 3.44 (n=17)
	JON: C.C.I. de Jonuta	4	9.22 ± 0.8	
	CHUCTÉ: Parque Chucté	1	7.36	
Vida libre	ILU: Laguna de las Ilusiones	5	9.27 ± 1.05	9.83 ± 1.83 (n=11)
	BAR: Laguna Barbona	2	9.49 ± 0.09	
	PEDRO: Río San Pedro	1	9.13	
	SIAN K: Reserva de Sian Ka'an	3	11.23 ± 0.74	

Se aplicó una t-student para muestras independientes y se compararon los niveles de cortisol sérico de todos los manatíes en cautiverio vs. vida libre y no se encontraron diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$).

8.5. NIVELES DE CORTISOL SÉRICO: INFLUENCIA DEL SEXO, EDAD, TIPO DE HÁBITAT Y TÉCNICAS DE CAPTURA

Objetivo

1. Evaluar la influencia del sexo, edad, tipo de hábitat y técnicas de captura en los niveles de cortisol sérico del manatí antillano.

Resultados

Influencia del sexo y edad

Se realizó un análisis para comparar los niveles de cortisol de las hembras por edades, tanto de vida libre como cautivas, encontrándose diferencias significativas entre el grupo de crías vs. juveniles o adultas. Dado que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de juveniles y adultas se decidió agruparlas para su comparación con las crías ($p > 0.05$).

Se compararon por clase etaria los niveles de cortisol sérico de las hembras tanto de vida libre como de cautiverio, y los valores se distribuyeron normalmente, por lo que se utilizó la prueba de t de student para muestras independientes. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo de crías vs. juveniles y adultas ($t = 2.94$, $p < 0.05$). (Fig. 27).

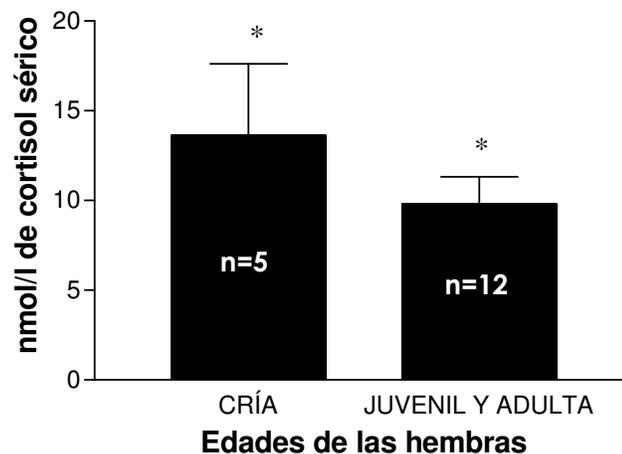


Fig. 27. Cortisol sérico de 17 hembras de diferentes edades (Crías: 4 en cautiverio y 1 de vida libre; Juveniles y Adultas: 6 en cautiverio y 6 de vida libre). Los valores representan el promedio \pm D.E., (crías, 13.62 ± 4 ; juveniles y adultas, 9.8 ± 1.53). Los valores marcados con (*) son estadísticamente diferentes, Wilcoxon, $p < 0.05$.

También se compararon los valores promedio (\pm D.E.) de los machos, tanto de cautiverio como de vida libre, divididos en categorías por edades, y no se encontraron diferencias significativas en los niveles de cortisol ($U=4$, $p>0.05$). (Fig. 28).

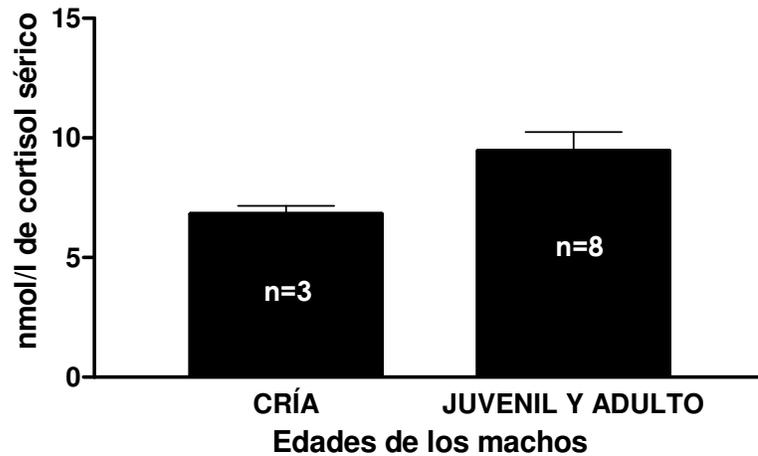


Fig. 28. Cortisol sérico de 11 machos (Crías: 3 en cautiverio; Juveniles y Adultos: 4 en cautiverio y 4 de vida libre). Los valores representan los promedios \pm E.E. de cortisol sérico en machos (crías, 6.82 ± 0.33 ; juveniles y adultos, 9.46 ± 0.78 , $p>0.05$).

Se compararon los niveles de cortisol sérico de las crías por sexo, se encontraron diferencias significativas en los niveles de cortisol que presentaron las hembras (13.62 ± 1.79 EE), siendo mayores que las de los machos (6.82 ± 0.33 E.E., $U=0$, $p>0.05$, Fig. 29).

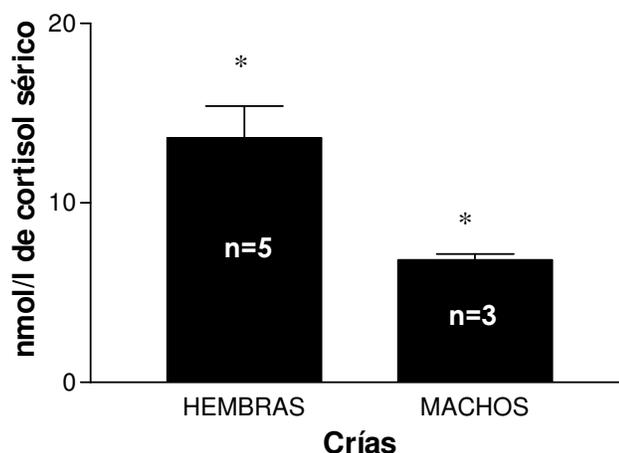


Fig. 29. Cortisol sérico de 8 crías de manatí antillano (hembras, n=5 y machos, n=3). Los valores representan los promedios \pm E.E. de cortisol sérico (hembras, 13.62 ± 1.79 ; machos, 6.82 ± 0.33). Los valores marcados con (*) son estadísticamente diferentes, Mann-Whitney, $p < 0.05$.

También se compararon los niveles de cortisol sérico entre hembras y machos juveniles y adultos. No se encontraron diferencias significativas (hembras, 9.8 ± 1.76 D.E.; machos, 9.46 ± 3.12 DE, $t = 0.41$, $p > 0.05$).

Finalmente, aunque por las características de este estudio no era el objetivo evaluar los cambios en los valores de cortisol a lo largo del desarrollo de los manatíes, sí fue posible obtener muestras en dos hembras y en dos machos, siendo crías y después juveniles. Comparando ambos sexos, se encontró cierta tendencia inversa en los niveles de cortisol sérico, es decir, las hembras siendo crías presentaron mayores niveles de cortisol que los machos de la misma edad. Pero al pasar a otra clase etaria, los niveles de cortisol de las hembras disminuyeron y el de los machos aumentó al llegar a la edad juvenil.

A continuación se muestra el registro de los niveles de cortisol sérico de 2 hembras, en 2 diferentes etapas de vida. (Fig. 30).

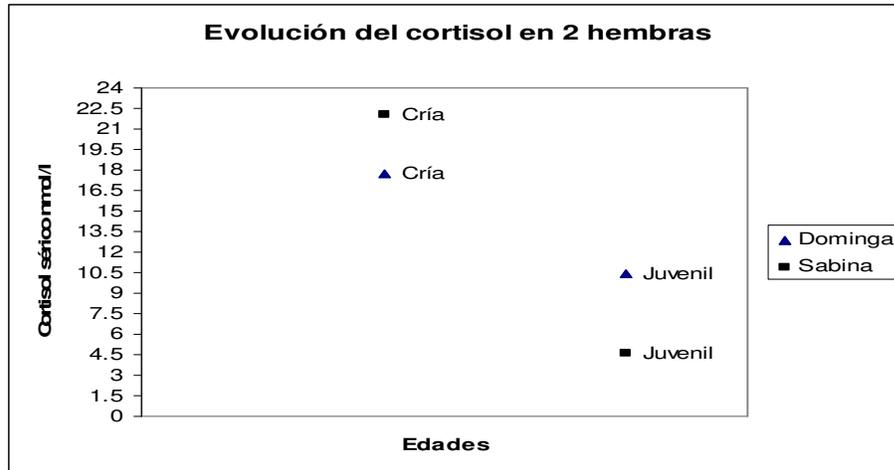


Fig. 30. Registro de los niveles de cortisol sérico de 2 hembras mantenidas en el Acuario de Veracruz.

A la vez, se muestran los niveles de cortisol sérico de 2 machos del Acuario de Veracruz en dos etapas de vida. (Fig. 31).



Fig. 31. Registro de los niveles de cortisol sérico de 2 machos resguardados en el Acuario de Veracruz.

Tipo de hábitat y técnicas de captura

Las muestras de suero y plasma tomadas de los organismos de vida libre se compararon por estado (Tabasco vs. Quintana Roo), por ser diferentes poblaciones y porque pudieran presentar diferencias debido al hábitat (en Tabasco, los manatíes capturados habitaban en agua dulce y en Sian Ka'an,

Q. Roo, los manatíes eran de hábitat marino). Además, la técnica de manejo de los manatíes no fue la misma: en Tabasco se utilizó una ecosonda con sistema de escaneo lateral de imagen, "side-scan", para detectar y ubicar manatíes en aguas oscuras y se atraparon con red de arrastre; mientras que en Sian Ka'an, Q. Roo se hizo mediante visualización de los manatíes, seguimiento y captura en el agua).

Aunque la muestra obtenida de las poblaciones fue pequeña, se lograron ver ciertas tendencias. Los manatíes de Quintana Roo presentaron valores significativamente más elevados en comparación con los de Tabasco ($U=2$, $p=0.048$). (Fig. 32).

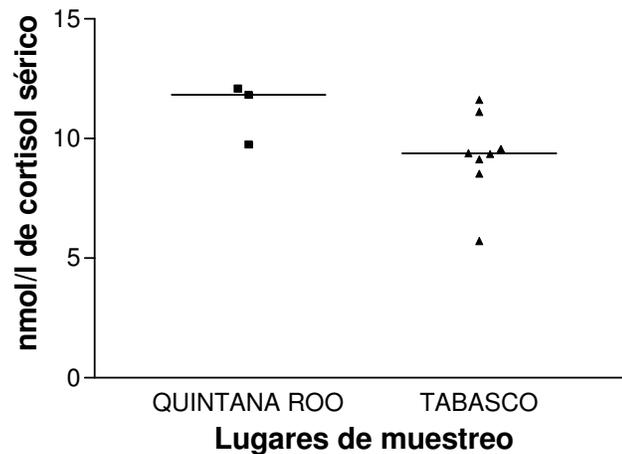


Fig. 32. Los valores representan la distribución de los rangos y las medianas de cortisol sérico de organismos de vida libre por lugar de muestreo (Sian Ka'an, Quintana Roo, $n=3$, promedio 11.23 ± 0.74 E.E.; en Tabasco: Laguna de las Ilusiones, $n=5$; Laguna Barbona, $n=2$; y Río San Pedro, $n=1$. promedio 9.3 ± 0.63 E.E.).

9. MEDICIÓN DE CORTISOL EN SALIVA

9.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA EN EL LABORATORIO PARA LA MEDICIÓN DE CORTISOL EN SALIVA CON LA PRUEBA DE TRITIO EN EL MANATÍ ANTILLANO

Objetivo

1. Estandarizar la técnica para la evaluación de cortisol a partir de saliva de 16 manatíes antillanos por medio de radioinmunoanálisis utilizando ^3H -cortisol.

Obtención de muestras de saliva

Las muestras de saliva fueron colectadas durante los años 2003, 2004 y 2006 en el Acuario de Veracruz y en el 2004 en el C.I.C.N. Yumka' y Parque Chucté. Las muestras se obtuvieron aprovechando los manejos (contención física) de los animales, en el caso de los manatíes del Acuario de Veracruz y del C.I.C.N. Yumka' se lograron tomar muestras periódicas de saliva bajo consentimiento de los animales (Apéndice 7). Cada muestra fue tomada con un hisopo estéril, lográndose colectar en promedio 300 μl . Todas las muestras se transportaron en una mezcla refrigerante al Laboratorio de la Dra. Marta Romano, una vez ahí se centrifugaron a 3000 rpm x 20 minutos, a 4°C, después se conservaron en congelación a -20°C, hasta su posterior análisis.

Concentración de la muestra de saliva

Debido a la baja concentración de cortisol en las muestras de saliva, para poder realizar las curvas de dilución se concentraron las muestras secándose con nitrógeno puro.

Radioinmunoanálisis

Para las muestras de saliva se utilizó ^3H -cortisol y un anticuerpo de tipo policlonal, específico contra cortisol (AB916, CHEMICON® Lab., Temecula, CA 92590), levantado en conejos. El marcador utilizado fue hidrocortisona [1,2,6,7- ^3H (N)] 70-100 Ci/mmol, ó 1 mCi/ml etanol de NEN Life Science products, Inc. Se utilizaron 10 puntos estándares de la curva: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125,

1.5625, 0.78125 y 0.390625. Para el paralelismo de las muestras de saliva se realizó un pool de muestras de saliva concentradas, del cual se tomaron 300 µl del concentrado y se le agregaron 300 µl del punto 50 pg/µl de la solución estándar fría. De esta solución se realizaron 4 diluciones, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 (Fig. 33). El promedio total del coeficiente de variación íntra-análisis fue de 5.59%±1.53. El coeficiente de variación inter-análisis fue de 7.22%±2.99.

Cálculos y análisis estadístico

Los datos y análisis de datos se hicieron como se describió para las muestras de suero (Página 29).

Resultados

Exactitud

Dentro de las pruebas de validación, se comprobó la exactitud del ensayo mediante la prueba de curva de dosis-respuesta, la cual mostró una correlación, $r^2 > 0.98$, de la relación entre la concentración de la hormona estándar añadida y la concentración del analito a evaluar.

Paralelismo

El paralelismo de las muestras de saliva se comprobó con un pool de muestras de saliva concentradas, a las cuales se les realizó 4 diluciones, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16, (Fig. 33).

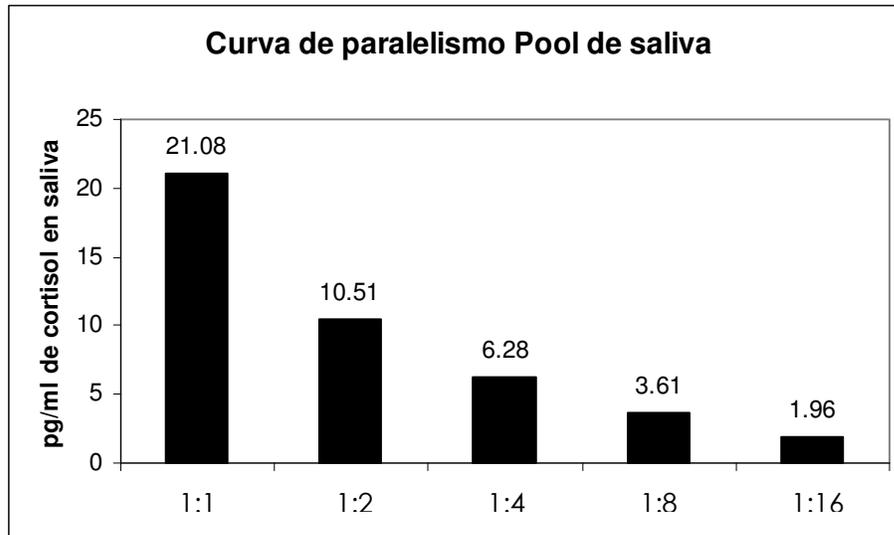


Fig. 33. Gráfica del paralelismo del % de unión del anticuerpo con la hormona estándar; con las diluciones decrecientes de la concentración del pool de saliva.

Conservación de las muestras de saliva

Se evaluó la fiabilidad de la preservación de las muestras de saliva entre los años de muestreo 2003, 2004 y 2006, se aplicó un ANOVA de 1 vía y no se encontraron diferencias entre tratamientos (2003, 3.0 ± 0.83 ; 2004, 2.63 ± 0.34 y 2006, 2.77 ± 0.4 ; $n=11$, $p > 0.05$, Fig. 34).

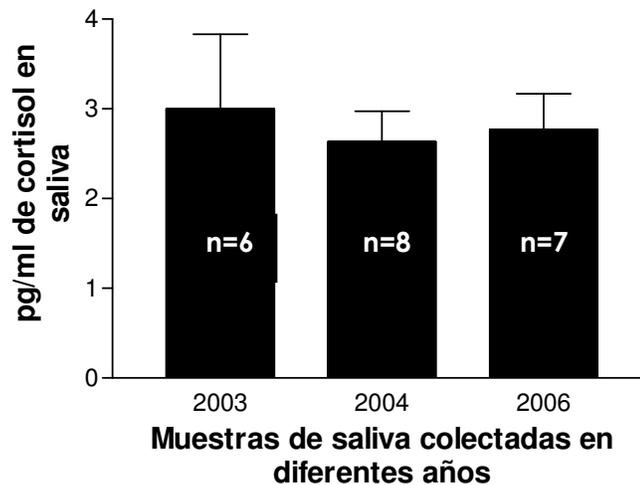


Fig. 34. Comparación de eficacia en la detección de niveles de cortisol en saliva en muestras colectadas en diferentes años. Los valores representan el promedio \pm D.E. de los niveles de cortisol en saliva de 11 manatíes.

9.2. EVALUACIÓN DEL TIPO DE MANEJO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE CORTISOL.

Objetivo

1. Evaluar el efecto del manejo (contención física) sobre los niveles de cortisol en saliva de 11 manatíes en cautiverio.

Resultados

Se encontraron niveles de cortisol más elevados en las muestras de saliva obtenidas de los manatíes de manera involuntaria (que fueron manejados por contención física) en comparación con las obtenidas bajo consentimiento de los animales ($t=2.43$, $p<0.05$, Fig. 35).

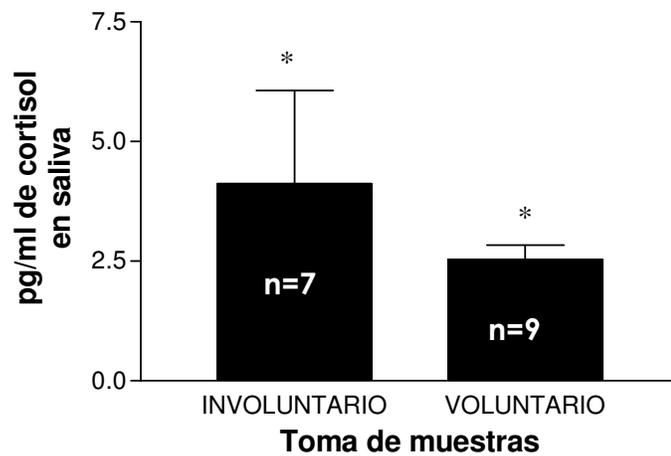


Fig. 35. Comparación de los niveles de cortisol en muestras de saliva de manatíes tomadas voluntaria (2.53 ± 0.1 D.E.) e involuntariamente (4.12 ± 1.95 D.E.). Los valores representan el promedio \pm D.E. de los niveles de cortisol en saliva de 11 manatíes.

9.3. EFECTO DEL RITMO CIRCADIANO EN LOS NIVELES DE CORTISOL EN SALIVA.

Objetivo

2. Evaluar el efecto del ritmo circadiano de los niveles de cortisol en saliva del manatí antillano.

Resultados

Se analizaron los niveles de cortisol de muestras de saliva colectadas de cinco manatíes del Acuario de Veracruz, aplicándose una t-student de muestras pareadas. De esta manera se encontraron valores significativamente más elevados en la mañana en un horario de 9:00 a 12:00 horas (con un promedio de 3.69 pg/ml de cortisol \pm 1.12 D.E.), que durante la tarde, en un horario de 12:01 a 21:00 horas (2.43 pg/ml de cortisol \pm 0.31 D.E.). Se aplicó una t-student de muestras pareadas (mañana, 3.69 \pm 1.12 y tarde, 2.43 \pm 0.31 D.E., $t=3.39$, $p<0.05$, Fig. 36).

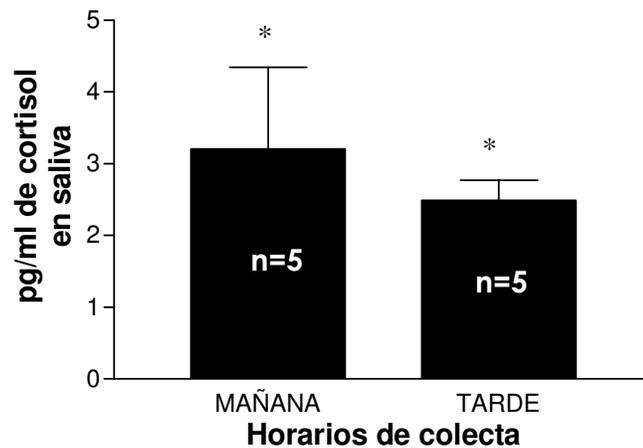


Fig. 36. Comparación de los niveles de cortisol en saliva de 5 manatíes durante la mañana y la tarde. Los valores representan el promedio \pm D.E.

9.4. EVALUACIÓN DE DIFERENCIAS POR SEXO EN LOS NIVELES DE CORTISOL EN SALIVA.

Objetivo

3. Evaluar si existen diferencias en los niveles de cortisol en saliva entre sexos.

Resultados

Al comparar los niveles de cortisol en saliva entre sexos mediante una prueba de t-student, se encontraron diferencias significativas. Los machos presentaron mayores niveles de cortisol en saliva (con un promedio de 3.06 pg/ml de cortisol \pm 0.49 D.E.) con respecto a las hembras (con un promedio de 2.47 pg/ml de cortisol \pm 0.48 D.E.; $t=2.43$, $p<0.05$, Fig. 37).

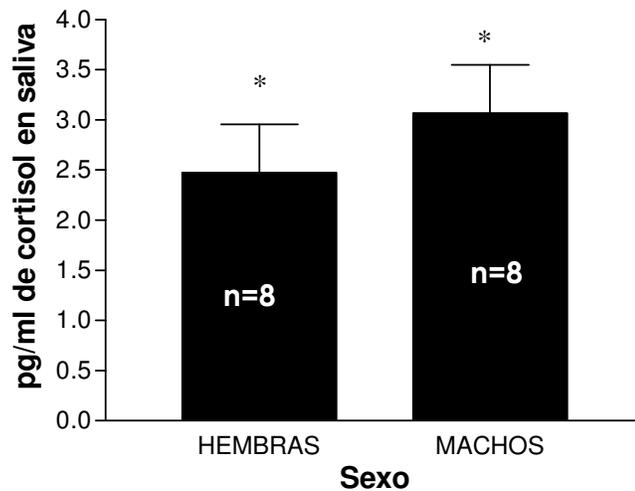


Fig. 37. Comparación de los niveles de cortisol en saliva entre sexos. Los valores representan el promedio \pm D.E. de los niveles de cortisol en saliva de 16 manatíes.

11. DISCUSIÓN

11.1. Catálogo de conductas registradas en un grupo de manatíes cautivos en el Acuario de Veracruz.

Hartman (1979) estudió el comportamiento de los manatíes de Florida en vida libre y describió el primer catálogo conductual para la especie. En México, el primer estudio de comportamiento en cautiverio, se realizó con una cría macho de manatí antillano, por lo que sólo se registraron conductas individuales de la especie (Viloria, 2001). En el presente estudio se registraron la mayoría de los comportamientos individuales y sociales (locomoción, descanso, alimentación, cuidado corporal, interacciones sexuales y vocalizaciones) registrados por Hartman (1979) y por Viloria (2001), excepto las conductas agonísticas.

En México se ha estudiado muy poco el comportamiento de los manatíes antillanos, tanto en cautiverio, como en vida libre. De hecho en cautiverio, no se había tenido la oportunidad de estudiar el comportamiento social de un grupo de manatíes (8 ejemplares), ni mucho menos se había descrito el comportamiento de ambos sexos en sus tres etapas de vida (cría, juvenil y adulto), por lo que el presente sería el primer estudio al respecto.

Se cree que el encierro por sí solo y el tiempo que un animal silvestre pase en cautiverio afecta seriamente su repertorio conductual y que por lo tanto, los estudios realizados en cautiverio no reflejan la realidad. Sin embargo, en un estudio realizado con manatíes de Florida en cautiverio, Young y Schulte (2003) encontraron que las facilidades del encierro, así como el tiempo en cautiverio parecen no alterar el comportamiento del manatí, sugiriendo que el tiempo en cautiverio no parece eliminar a un manatí como posible candidato para su liberación (Young y Schulte, 2003).

Al igual que en el estudio de Young y Schulte (2003), en el presente catálogo elaborado para un grupo de ocho manatíes antillanos, no se reportaron comportamientos agonísticos entre ellos, ni ningún tipo de agresión hacia sus

cuidadores. A la vez, se registraron comportamientos sociales, lo que corrobora que son animales altamente sociables cuando se presenta la oportunidad. Se cree que son animales semisociales o sociales, que interactúan con sus congéneres sin formar vínculos a largo plazo, excepto el que se establece entre una madre y su cría (Hartman, 1979; Reynolds, 1981). Young y Schulte (2003) por su parte, mencionan la relevancia de las relaciones que se establecen en cautiverio, ya que no sólo indican la naturaleza social en potencia de los manatíes en vida libre, sino que esas relaciones mantenidas en cautiverio, podrían facilitar la reintroducción exitosa de los manatíes, en caso de los que estuvieran asociados fueron liberados juntos.

En el presente estudio se registraron eventos de cópula entre un grupo de machos (un adulto y dos juveniles) con una hembra juvenil de casi cuatro años de edad, la cual según la literatura, todavía no ha alcanzado la madurez sexual (el manatí antillano, se tiene reportado que la alcanza aproximadamente a los cinco años de edad, Vanoye, 2002; mientras que para la subespecie de Florida se reporta que la alcanza de los dos a los cinco años, Marmontel, 1995; Odell et al., 1995). Esto corresponde con el comportamiento sexual reportado para manatíes de vida libre, en el que un grupo de machos se reúne para copular con una sola hembra (Hartman, 1979). También coincide con observaciones realizadas en manatíes cautivos, las cuales sugieren que el comportamiento de apareo, no es un adecuado indicador del estado reproductivo de la hembra. Las hembras de manatí exhiben un comportamiento de reproducción promiscuo, apareándose con varios machos (Wilson, 1975; Wittenberger, 1978; Odell et al., 1995).

11.2. Descripción general de las conductas y las proporciones de tiempo empleadas en cada categoría.

Es importante mencionar que no hay mucho al respecto de las proporciones de tiempo empleadas en cada categoría de comportamiento para el manatí antillano.

En la evidencia encontrada por Young y Schulte (2003), reportan que el comportamiento de 37 manatíes de Florida no se vio afectado por el tipo de encierro, la edad, el sexo, la temporada, ni por el tiempo en que éstos permanecieron en cautiverio y además proponen que podrían seguir siendo buenos candidatos para su liberación. Por lo tanto las categorías de comportamiento registradas en el presente estudio, podrían tomarse como representativas de lo que pudiera estar ocurriendo en vida libre, y las proporciones de tiempo registradas para cada categoría de comportamiento podrían ser consideradas para futuras comparaciones. Es importante recalcar que Young y Schulte (2003) no estudiaron el comportamiento de los manatíes durante los tres primeros meses en que fueron llevados al cautiverio. Por lo que a pesar de ser un periodo breve de tiempo, las proporciones de tiempo empleadas en cada categoría se pudieron ver afectadas. También es preciso recalcar que no evaluaron el efecto de los manejadores en el comportamiento de los manatíes, ni si hubo impronta. Quizás en la subespecie de Florida no sea tan relevante medir este factor, ya que el grado de concientización de las personas hacia la especie en Estados Unidos es mayor, con respecto al de México. Ya que en Estados Unidos no se tiene reportada la cacería ilegal de la misma, a diferencia del *T. manatus manatus*, el *T. inunguis*, el *T. senegalensis* y el *D. dugon* en los que todavía se tienen reportes de esta práctica. De hecho el comportamiento de la subespecie de Florida difiere de la Antillana (*T. manatus manatus*), ya que de la primera se reporta que busca o propicia el contacto con el humano, mientras que ésta última presenta comportamientos de evasión (Morales, 2000).

En general para los siete manatíes antillanos del Acuario de Veracruz, el comportamiento más frecuente fue el de locomoción, mientras que la alimentación y el descanso tuvieron períodos de tiempo similares (cada uno de 2 horas aproximadamente), y el menos frecuente fue el de cuidado corporal. Al comparar por sexo y clase etaria, el tiempo empleado en cada una de las categorías de comportamiento, no se encontraron diferencias significativas entre grupos, excepto que las hembras emplearon una mayor proporción del tiempo en la conducta de filtración o exploración y descanso,

mientras que los machos ocuparon una mayor proporción del tiempo en la categoría de coprofagia. Desafortunadamente, no existe información bibliográfica sobre registros de preferencias conductuales por sexo para comparar nuestros resultados.

Las crías emplearon mayor tiempo en la alimentación en general (proporcionada, filtración o exploración y tomar agua), en el descanso y en el cuidado corporal. Esto se podría explicar, ya que al igual que en la mayoría de los mamíferos, requieren satisfacer las altas necesidades nutricionales que implica estar en continuo desarrollo. Los requerimientos nutricionales de cada organismo, depende en gran parte de sus características genéticas y metabólicas particulares. Sin embargo, las crías requieren los nutrientes necesarios para alcanzar un crecimiento satisfactorio, evitar estados de deficiencia y tener reservas adecuadas para situaciones de estrés. A la vez, al descansar durante más tiempo, al igual que las vacas, elefantes y otros mamíferos, podrían liberar somatotropina (hormona del crecimiento) y a la vez, ahorrar energía para utilizarla única y exclusivamente en las necesidades fisiológicas necesarias para el crecimiento (Ribes, 2004).

Los juveniles presentaron más frecuentemente la conducta de coprofagia, para la especie se tiene reportada como una conducta normal, sin embargo, no se tienen porcentajes o tasas de consumo o preferencias por clase etaria o sexo. Es relevante estudiar el comportamiento de coprofagia, ya que podría ser un buen indicador de la falta del aporte de nutrientes para un organismo, al ser un factor importante para explicar la habilidad de muchos herbívoros y omnívoros para subsistir con una dieta baja en proteínas (Takahashi, 1998).

LOCOMOCIÓN

Viloria (2001) en un estudio realizado en cautiverio de una cría macho de manatí, reporta que el comportamiento más frecuente por mes fue el de locomoción durante las mañanas (59.21% de tiempo en promedio, en 6 de los 12 meses de estudio) y durante las noches (70.95% en promedio, durante 5 meses). Estos datos coinciden con lo encontrado en el presente estudio, ya

que la locomoción fue la principal conducta registrada durante las 12 horas de observación diurnas (45% en promedio para los 7 manatíes).

ALIMENTACIÓN

Aparentemente, los manatíes no presentan ritmos circadianos de alimentación (Best, 1981). El manatí antillano (*T. manatus manatus*), el de Florida (*T. manatus latirostris*) y el del Amazonas (*T. inunguis*) emplean de seis a ocho horas diarias (29.17% en promedio) en alimentarse (Best, 1981; Reynolds y Odell, 1991). En ese tiempo aproximadamente consumen del 4 al 9% de su peso en vegetación húmeda, que representa entre 42 y 56 Kg de alimento húmedo (Hartman, 1979; Etheridge et al., 1985). En este estudio se encontró que los manatíes emplean en alimentarse dos horas y 40 minutos en promedio durante 12 horas de observaciones diurnas (22.24% de tiempo en promedio). Esta disminución de tiempo empleado en la alimentación se podría deber entre otras causas a que la dieta alimenticia difiere en cautiverio y vida libre. La mayoría de los acuarios en México, basan la alimentación de los manatíes en frutas y verduras, las cuales son de textura mucho más blanda en comparación con las raíces y plantas fibrosas que consumen en vida libre, por lo que el tiempo de masticación disminuye. Esto se ha visto en los rangos de consumo de los herbívoros terrestres al ser influenciados por características morfológicas de las plantas y características anatómicas del aparato digestivo. Marshall et al. (2000) mencionan que aunado a lo anterior, el tiempo de manejo de la comida y de masticación afectan el rango de consumo alimenticio de los manatíes de Florida. Entonces al no utilizar el tiempo requerido en vida libre en la búsqueda de alimento, forrajeo y masticación adecuados, tienen que suplir el tiempo restante en otras subcategorías de alimentación (filtrar o explorar y coprofagia). Aunque se han reportado estos comportamientos como normales para la especie (Hartman, 1979), no hay registros de proporciones de tiempo empleados en filtrar o explorar y coprofagia, por lo que no podemos comparar nuestros resultados, ni concluir nada al respecto.

DESCANSO

Para la subespecie de Florida, algunos autores reportan que descansan más de 12 horas por día en varios períodos de descanso cortos (Hartman, 1979). Sin embargo, Self (2003) menciona que el descanso puede ser de dos a doce horas diarias, lo cual nos deja un amplio rango, que no es comparable con la subespecie de México, ya que ésta no presenta los mismos hábitos migratorios por temporadas estacionales, de verano e invierno. Hartman (1979) reporta que el manatí de Florida se reúne en grandes congregaciones, durante el invierno, en las aguas cálidas del sur de Florida, en las cuales se resguarda del frío y descansan más de 12 horas por día. En cambio, para el manatí antillano no se tienen reportados marcados hábitos migratorios, sin embargo, en el ámbito de distribución de la especie en México, se reportan dos temporadas, de lluvias y de secas, en la que éstos animales se ven en la necesidad de buscar alimento y cuerpos de agua más profundos en la temporada de seca (Olivera, 2006).

En general, el promedio de descanso para 7 manatíes antillanos mantenidos en el Acuario de Veracruz fue de 2 horas con 24 minutos (20% en promedio del tiempo total). En este estudio se encontró que las crías son el grupo que más descansa y que los adultos emplean la mayor parte del tiempo en la locomoción, esto se podría deber a los hábitos de descanso de los grupos. A pesar de no ser el motivo del estudio, se encontró que las crías prefieren zonas de descanso cercanas a la superficie (87.3% del tiempo total de descanso), mientras que los adultos prefieren descansar en zonas más profundas (en un 85.7% del tiempo total de descanso), mientras que los juveniles se encuentran en un rango intermedio entre éstos (prefieren descansar en zonas profundas un 62.6%, y en zonas cercanas a la superficie un 37.3%). Estas preferencias de descanso se pueden explicar por las características fisiológicas de cada edad, Parker (1922) menciona que debido a la pequeña capacidad de los pulmones de las crías, el intercambio es menor que en manatíes adultos, siendo el tamaño del animal y la actividad, factores que modifican el tiempo de buceo. Los adultos pueden mantener la apnea durante más tiempo, lo que les facilita descansar en zonas más profundas. Los manatíes no descansan de corrido,

sino lo hacen durante intervalos de aproximadamente cinco minutos, debido a que tienen que salir a respirar a la superficie (Hartman, 1979). Es por esto, que los hábitos de descanso de los manatíes adultos podrían explicar en parte el que tengan la mayor frecuencia de locomoción de todos los grupos, porque se tienen que movilizar mayores distancias para salir a respirar mientras descansan.

CUIDADO CORPORAL

En lo que respecta al cuidado corporal, el registro fue muy bajo (0.38% en promedio del tiempo total) en comparación con las demás categorías de conducta registradas. Vilorio (2001) clasificó como comportamientos de arreglo "sacar el labio superior", el cual también se describió en mi estudio, pero con una función diferente, que fue la de espiar a las personas; y la de "giros", que dentro de mi estudio fue considerado dentro de la categoría de locomoción. El único comportamiento de "arreglo" que coincide con una subcategoría del comportamiento de "cuidado corporal" del presente estudio fue el de "aletas a la boca", el cual se presentó un 22% de la proporción total de tiempo en un mes.

11.3. Evaluación del efecto del público sobre el comportamiento del manatí antillano en cautiverio.

Debido a la falta de información de cómo perciben estos animales la influencia del público y el efecto que éstos ocasionan en ellos, fue difícil comparar o tener como referencia algún parámetro o indicador que nos señalara posibles perturbaciones o afectaciones en el comportamiento de los mismos. En el estudio realizado por Ortega (1997) en manatíes de vida libre, los hábitos conductuales y el uso del hábitat se vieron marcadamente influidos por el turismo, y se vio regido por los horarios en los que el humano hace uso de su hábitat. El comportamiento de los manatíes antillanos en el Acuario de Veracruz tuvo una gran desviación estándar y variación individual; esto no es de extrañarse ya que el número de muestra es muy pequeño ($n=7$) y se contaba con manatíes de ambos sexos y de tres etapas de vida (cría, juvenil y adulto), por lo cual no se pudo realizar más que estadística no paramétrica.

Debido a estas condiciones, no existieron diferencias significativas entre los comportamientos registrados durante las temporadas de alta y baja afluencia de público. Sin embargo, aunque la variación del porcentaje de tiempo empleado en las diferentes categorías de comportamiento entre las temporadas de alta y baja afluencia de público fue mínima, se pudieron apreciar ciertas tendencias. En general los manatíes descansaron más tiempo durante la temporada de alta afluencia de público y la locomoción fue mayor durante la temporada baja. La alimentación proporcionada, la coprofagia y el cuidado corporal se registró en mayor proporción durante la temporada de alta afluencia de público, mientras que la filtración o exploración fue mayor durante la temporada de baja afluencia de público.

En general, existen muy pocos estudios que evalúen el efecto del público sobre el comportamiento de animales cautivos. Pifarré (2005) encontró que la cantidad de visitantes al zoológico modificaba el comportamiento del lobo mexicano, registrándose un aumento en las interacciones agonísticas y el comportamiento de ocultarse en días de alta afluencia de público. En el lobo, las conductas de esconderse, quedarse inmóvil u otras para evitar ciertos estímulos, se consideran respuestas de miedo (Hemsworth y Barnett, 2000).

Sin embargo, en el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en las proporciones de tiempo empleadas en las diferentes categorías de comportamiento en temporadas de alta vs. baja afluencia de público. Es importante mencionar que en el Acuario de Veracruz, no hay días en el que a los animales se les permita descansar del público (ya que abre los 365 días del año, en un horario de 9:00 a 21:00 horas) a diferencia de otros acuarios o zoológicos, como el del realizado por Pifarré (2005). Por lo tanto, los manatíes no cuentan con algún día sin asistencia de público; el Acuario de Veracruz siempre tiene público, presentando en promedio un día de condición A: 4,920 visitantes, y un día de condición B: 1,249 visitantes. Por lo que quizás para los manatíes, no influya tanto la cantidad de público, sino más bien la presencia o ausencia global del mismo. También es probable, que debido al estrecho contacto que tuvieron con humanos desde el principio de sus vidas

cuando llegaron al acuario (con pocos meses de vida), siete de los ocho manatíes estudiados hayan quedado improntados, por lo que la presencia del público pareciera no afectarles.

La única conducta que presentó diferencias significativas entre temporadas, fue la de "no visualización" en la que los manatíes estuvieron más tiempo disponibles visualmente al público (desde el área pública) en días de alta afluencia. Estos datos podrían indicar que el público sí afecta la rutina de comportamiento de los animales, pudiendo ser un distractor o atractivo para los animales, y que su curiosidad hace que estén más disponibles visualmente al público. Esto coincide con lo citado en los estudios de Davey et al. (2004), Davey et al. (2005) y Davey (2006) en el que propone que se debe de medir no sólo el posible efecto negativo, sino se debe de ser objetivo y evaluar el posible efecto positivo de los visitantes, siendo éstos distractores para los animales y enriqueciendo de cierta manera su entorno. Coincide también con lo reportado por Hosey and Druck (1987), quienes describieron la noción del "efecto del público" y dieron a conocer que la presencia de los visitantes afecta el comportamiento locomotor y de dispersión espacial, y que el comportamiento de la mayoría de los primates fue más activo que pasivo con respecto a los grupos de visitantes. Sin embargo, esta información se debe tomar con cautela, ya que existen otras posibilidades, como que el movimiento y ruidos del público y el flash de las cámaras pudieran tener un efecto excitante que no es necesariamente benéfico para la especie. En una gran cantidad de especies domésticas y silvestres se ha encontrado una relación entre la cantidad de público y la presencia de respuestas de miedo (ovejas, Anderson, 2002; jaguares, Sellinger y Ha (2005); rinocerontes negros, Carlstead et al., 1999; orangutanes, Hemsworth y Bannet, 2000; elefantes, Elzanowski y Sergiel, 2006; entre otros). También se han reportado otras respuestas conductuales además de miedo en primates, como un aumento de comportamientos agresivos y sexuales (Thompson, 1976; Maki, Alford y Bramblett, 1987).

Otro de los parámetros muy importantes para esta subespecie, por habitar en aguas someras y con muy poca visibilidad, es el de la audición, el cual no fue medido en este estudio y que pudo haber repercutido en gran parte en la conducta debido a que son animales altamente sensibles a los ruidos, y vivir en un ambiente acuático en el cual las ondas sonoras tienen muy buena dispersión. En el Acuario de Veracruz existen grandes filtros biológicos y mecánicos que están encendidos durante todo el día y el ruido (más de 80 decibeles) sólo cesa por breves minutos. Esto sólo podría haber sido una gran perturbación para los manatíes, y que por haber tenido el ruido constante durante todo el día, no se notaran las variaciones que el efecto del público pudiera estar ejerciendo con el ruido; para eso sería necesario realizar otro tipo de estudios para aseverarlo ^(66,67).

11.2. Determinación de cortisol sérico y en saliva en el manatí antillano.

La estructura molecular de cortisol es idéntica en todas las especies. Por lo tanto, puede ser medida en animales usando ensayos desarrollados originalmente para ser utilizados en humanos. Sin embargo, diferencias entre especies con relación al rango de referencia y a la composición del suero, hacen necesario que un ensayo que fue originalmente desarrollado para humanos, deba ser validado (precisión, exactitud, especificidad y sensibilidad) para su uso en animales e idealmente para las especies de animales que se desea analizar (Matamoros, 2002). Debido a esto, se tuvo que validar la técnica de radioinmunoanálisis para la determinación de cortisol en suero en el manatí antillano, realizando pruebas de curva dosis-respuesta, de paralelismo y los coeficientes de variación íntra e ínter-ensayo. Todos los ensayos de validación del presente estudio entraron dentro de los parámetros aceptables para la misma. Por lo tanto, se determinó que es factible utilizar el kit de patente (Cort CT2 Bio International®, France) para la determinación de cortisol en suero de manatí.

La literatura reporta que el tipo de medio con el que se toman las muestras de sangre pueden interferir en la medición de ciertos parámetros, en este caso se compararon las muestras de 5 manatíes, tomadas del mismo animal, en la

misma fecha y con diferencia de pocos minutos una de otra y las muestras de sangre se tomaron por duplicado las muestras de sangre (una tomada con un tubo al vacío y la otra con EDTA o citrato de sodio) y no existieron diferencias significativas entre ambas. Por lo que se señala que midiendo las muestras de suero o plasma (EDTA y citrato de sodio) con este estuche de patente, en el que no es necesario extraer la muestra, no existe ninguna interferencia en la medición de cortisol para esta especie.

La diferencia más marcada en los niveles de cortisol sérico se reportó entre las crías de hembras y machos. Al igual que en un estudio de crías de lobo marino en vida libre, en el que también se encontró que las hembras presentaron mayores niveles de cortisol que los machos (Pedrera-Romano et al., 2008). Es relevante mencionar que en observaciones previas a este estudio, dos de las hembras huérfanas (#5 Dominga y #6 Sabina) que fueron rescatadas y llevadas al Acuario de Veracruz, recién llegadas tuvieron un comportamiento similar de apartamiento o exclusión del resto del grupo, aunque eran invitadas a participar en los juegos o conductas sociales por otros manatíes, éstas se abstraían y gustaban de estar pegadas a un filtro desnatador (el cual ejercía succión), el cual tenía un orificio en el que les permitía introducir una de las aletas pectorales, y podían permanecer fácil más de 15 minutos. Este comportamiento se registró por separado, ya que de la llegada de Dominga al Acuario y Sabina, tiene aproximadamente un año de diferencia, y cuando llegó ésta última, la primera ya no presentaba este comportamiento, por lo que se podría decir que no fue un comportamiento aprendido. Por lo que este podría ser un punto muy importante en la toma de decisiones para el manejo de esta especie, así cuando los manatíes huérfanos sean encontrados, se les dé especial atención a las hembras.

La elevación de los niveles de cortisol sérico de los machos al entrar en la etapa juvenil se podría deber a que a partir del año de edad se tiene reportado que aunque todavía no son aptos para reproducirse, ya presentan un comportamiento sexual, en el cual invierten una gran cantidad de su tiempo, más que las hembras y en el cual gastan una gran cantidad de

energía, a la vez al necesitar mayor energía para su desarrollo esto podría explicar el aumento en los niveles de cortisol. Las hembras en cambio, una vez que se habituaron al cautiverio, sus niveles de cortisol se estabilizaron y por esta razón disminuyeron, además de que en comparación con los machos no son tan activas en la etapa juvenil.

Las concentraciones de cortisol sérico en las poblaciones de manatíes de vida libre de Quintana Roo fueron significativamente mayores, esto podría deberse al tipo de manejo y a las diferentes condiciones del hábitat (ambiente marino vs. acuático).

Para saliva debido a la poca cantidad de cortisol que es excretada por esta ruta (se reporta que sólo el 5% del total circulante en sangre es metabolizado por esta vía en la mayoría de los mamíferos), no fue factible realizar la determinación con este kit de patente y se optó por realizar la cuantificación de cortisol marcado con tritio, lo que aumentó la sensibilidad de la determinación y permitió analizar las muestras de saliva de los manatíes. Es importante mencionar que no se había medido antes la excreción de cortisol en saliva para esta especie. Es importante que la obtención de este tipo de muestras, se realice con animales entrenados o que éstos colaboren para la toma de la misma, esto para evitar alterar los resultados del análisis clínico. La medición de cortisol en saliva se ha utilizado en el humano y en otras especies marinas, como el delfín *Tursiops truncatus* (Pedernera, 2005) para evaluar niveles basales de cortisol.

En los niveles de cortisol en saliva se encontraron diferencias significativas entre el tipo de toma de muestra; en la que fue tomada de forma involuntaria los valores fueron significativamente más altos. Esto se podría deber al efecto estresante del manejo.

A pesar de que para el elefante no se ha encontrado una glándula pineal como tal, y en la subespecie *T. manatus latirostris* no se tiene reportada una glándula pineal, las concentraciones de cortisol en saliva del presente estudio

nos indican que quizás existan remanentes de esta glándula o tal vez otro órgano o grupo de células que explicara la presencia de mayores niveles de cortisol durante la mañana.

Aunque no hay estudios previos en el manatí, con qué comparar nuestros resultados, en el presente estudio se encontró que la concentración de cortisol en saliva de los machos fue mayor que en la de las hembras. Al igual que lo reportado en un estudio realizado en humanos, en el que se encontró que los hombres presentan mayores niveles de cortisol ante situaciones psicológicas estresantes (Kirshbaum *et al.*, 1992).

Al igual que en otras especies se han reportado variaciones en la secreción de cortisol dependiendo del sexo, esto mismo se encontró en los manatíes antillanos, en el que el promedio de las concentraciones de cortisol en saliva fueron significativamente mayores en los machos con respecto a las hembras.

12. CONCLUSIONES

12.1. Evaluación del efecto del público sobre el comportamiento del manatí antillano en cautiverio.

1. Es el primer estudio etológico de un grupo de manatíes antillanos en cautiverio.
2. Es el primer estudio que evalúa el efecto del público sobre el comportamiento del manatí antillano en cautiverio.
3. Las pautas de comportamiento en cautiverio para la subespecie *T. manatus manatus*, registradas en mayor proporción son, en orden de aparición, locomoción, alimentación (proporcionada, filtrar o explorar y coprofagia), descanso, ocultarse y cuidado corporal.
4. No existieron diferencias significativas en la mayoría de los comportamientos registrados, sólo el comportamiento de "no visualización" se registró menos durante la temporada de alta afluencia de público, por lo que aparentemente el público sí modifica el comportamiento del manatí en cautiverio.

12.2. Determinación de cortisol sérico y en saliva de manatíes antillanos en cautiverio y vida libre.

1. Se validó la técnica de radioinmunoanálisis para la cuantificación de cortisol en suero y saliva.
2. Con un estuche de patente se pudieron medir los niveles de cortisol tanto en suero como en plasma sin realizar extracción.
3. Se reportan los primeros valores de cortisol en suero y saliva para la especie en animales de vida libre así como en cautiverio.
4. Se reportan los primeros valores de referencia de cortisol en suero para la especie en tres diferentes etapas de vida (cría, juvenil y adulto).
5. En las hembras, las crías son las que presentaron los mayores niveles de cortisol en suero.
6. Entre sexos y por clase etaria, el grupo que presentó los mayores niveles de cortisol fue el de las hembras crías.

- 7.** En los machos existe cierta tendencia de presentar niveles de cortisol sérico más bajos siendo crías, y estos niveles al parecer se incrementan al llegar a su etapa juvenil, en hembras sucede lo contrario.
- 8.** Se encontraron diferencias entre dos técnicas de captura de manatíes de vida libre, presentando mayores niveles de cortisol sérico los manatíes de Quintana Roo.
- 9.** El método no invasivo utilizado en este estudio permitió ver que existe un incremento en los niveles de cortisol cuando la muestra se obtuvo de manera involuntaria de los animales, en comparación con las muestras que el animal dio voluntariamente (las cuales podrían considerarse como basales).
- 10.** A pesar de que se cree que esta sub-especie al igual que la de Florida, no poseen glándula pineal, y por lo tanto no deberían estar influenciadas por el ritmo circadiano, los valores de cortisol en saliva fueron más elevados durante la mañana vs. tarde.
- 11.** Los niveles de cortisol en saliva varían entre sexos.

APÉNDICE 1. Horarios de alimentación para manatíes juveniles (n=4) y adultos (n=3) en el Acuario de Veracruz en el año 2006.

Hora	Alimento	Cantidad
7:00	Lechuga romana	20 piezas
	Lechuga larga	20 piezas
10:30	Lechuga romana	30 piezas
	Lechuga larga	30 piezas
14:30	Calabacita italiana	2 Kg
	Jitomate	2 Kg
	Pepino	2 Kg
	Manzana	2 Kg
	Mango**	2 Kg
	Papa*	3 Kg
	Zanahoria*	3 Kg
19:00	Acelga	3 piezas
	Alfalfa	3 piezas
	Apio	3 piezas
	Berro	3 piezas
	Brócoli	3 piezas
	Col	1 1/2 piezas
	Ejote	3 Kg
	Espinacas	3 piezas
	Germinado de soya***	1 Kg
	Lechuga larga	20 piezas
	Lechuga romana	20 piezas

*Se alterna un día el jitomate, mango, manzana y pepino; y al otro día la papa y la zanahoria.

**Se ofrece cuando sea temporada.

***Se ofrece 2 veces por semana cada 15 días.

APÉNDICE 2. Fórmula láctea para alimentar a una cría de manatí de un año de edad (año 2006).

<i>Ingrediente</i>	<i>Cantidad</i>
Multimilk (Leche deslactosada)	90 gr
Leche de soya	50 gr
Agua purificada	600 ml (300 ml de agua caliente y 300 ml de agua fría)
Volumen preparado	750 ml

*Esta fórmula se le brindaba a principios del año 2006, cada 3 horas (3:00, 6:00, 9:00, 12:00, 15:00, 18:00, 21:00 y 24:00 horas).

APÉNDICE 3. Comparación por sexo de la proporción del tiempo empleado en las diferentes categorías de conducta individual para 7 manatíes del Acuario de Veracruz, en un horario de 9:00 a 21:00 horas.

Categorías de comportamiento	*Machos (Promedio ± E.E., n=3)	Promedio de horas aprox.	*Hembras (Promedio ± E.E., n=4)	Promedio de horas aprox.
1. Locomoción	48.79 ± 2.42	5 horas, 51 minutos	44.41 ± 6.58	5 horas, 51 minutos
2. Alimentación general	22.78 ± 1.86	2 horas, 44 minutos	21.96 ± 2.48	2 horas, 38 minutos
<i>Alimentación proporcionada</i>	15.03 ± 0.2	1 hora, 48 minutos	13.91 ± 0.77	1 hora, 40 minutos
<i>Filtración o exploración</i>	2.99 ± 0.5	22 minutos	5.83 ± 2.09	42 minutos
<i>Coprofagia</i>	4.16 ± 1.68	30 minutos	1.65 ± 0.79	12 minutos
<i>Tomar agua</i>	0.17 ± 0.17	1 minuto	0.48 ± 0.41	3 minutos
3. Descanso	14.26 ± 1.02	1 hora, 43 minutos	24.7 ± 4.26	2 horas, 54 minutos
4. No visualización	13.43 ± 0.41	1 hora, 37 minutos	10.17 ± 1.47	1 hora, 13 minutos
5. Cuidado corporal	0.17 ± 0.17	1 minuto	0.5 ± 0.1	4 minutos

*Los valores representan el porcentaje empleado en cada una de las categorías de comportamiento, y corresponde a las observaciones realizadas en el horario de 9:00-21:00 horas.

Apéndice 4. Comparación por clase etaria de la proporción del tiempo empleado en las diferentes categorías de conducta individual para 7 manañes del Acuario de Veracruz.

Categorías de comportamiento	Cría (Promedio ± E.E., n=2)	Juvenil (Promedio ± E.E., n=3)	Adulto (Promedio ± E.E., n=2)
1. Locomoción	34.27 ± 2 (4 horas, 7 minutos)	44.54 ± 3.02 (5 horas, 20 minutos)	54.86 ± 2.59 (6 horas, 35 minutos)
2. Alimentación general	25.94 ± 0.14 (3 horas, 7 minutos)	23.07 ± 1.59 (2 horas, 46 minutos)	17.54 ± 1.85 (2 horas, 1 minuto)
<i>Alimentación proporcionada</i>	15.04 ± 0.8 (1 hora, 48 minutos)	13.96 ± 0.88 (1 hora, 41 minutos)	14.38 ± 1.03 (1 hora, 44 minutos)
<i>Filtración o exploración</i>	9.14 ± 0.96 (1 hora, 5 minutos)	3.72 ± 0.41 (27 minutos)	1.42 ± 0.75 (10 minutos)
<i>Coprofagia</i>	0.48 ± 0.48 (4 minutos)	4.92 ± 1.15 (35 minutos)	1.68 ± 0.24 (12 minutos)
<i>Tomar agua</i>	0.96 ± 0.74 (7 minutos)	0.17 ± 0.17 (1 minuto)	0
3. Descanso	29.55 ± 0.59 (3 horas, 33 minutos)	18.97 ± 4.42 (2 horas, 17 minutos)	12.74 ± 0.74 (1 hora, 32 minutos)
4. No visualización	8.14 ± 1.87 (59 minutos)	12.39 ± 0.63 (1 hora, 29 minutos)	13.76 ± 0.49 (1 hora, 39 minutos)
5. Cuidado corporal	0.62 ± 0.11 (4 minutos)	0.07 ± 0.07 (0.5 minutos)	0.52 ± 0.005 (4 minutos)

*Los valores marcados con negritas no fueron significativamente diferentes ($p>0.05$), pero se resaltan para indicar qué grupo empleó una mayor proporción de tiempo en esta conducta.

**Los datos entre paréntesis representan el promedio de tiempo aproximado empleado en cada categoría de comportamiento.

APÉNDICE 5. Relación de las muestras séricas obtenidas de 28 Manatíes Antillanos.

	Hembras						Machos					
	Cautiverio			Libre			Cautiverio			Libre		
	C	J	A	C	J	A	C	J	A	C	J	A
Edades*												
# de Manatíes	4	4	2	1	1	5	3	2	2	0	3	1
ID Manatíes*	D M S Y	D S SH SI	CO I	T2	T6	AB T1 T5 T11 XI	AN CE CO	AN CE	PA XA		B10 T7 T8	T12
Subtotal	10			7			7			4		
Total por sexo	17						11					
Total de hembras y machos	28											

*Edades: (C) Cría, (J) Juvenil y (A) Adulto.

**Identificación de manatíes

Hembras: (AB) Abril BA8, (CO) Costeña, (D) Dominga, (I) Ixchel, (M) Marina, (S) Sabina, (SI) Silvia, (SH) Sisha', (T1) T001, (T2) T002, (T5) T005, (T6) T006, (T11) T011, (XI) Ximena BA11, (Y) Yumha'.

Machos: (AN) Ángel, (B10) BA10, (CE) César, (CO) Colis, (PA) Pablo, (T7) T007, (T8) T008, (T12) T012, (XA) XAMAN.

APÉNDICE 6. Origen de las muestras séricas obtenidas de 28 Manatíes Antillanos.

MANATÍES	Hembras						Machos					
	☺ Libre			☹ Cautiverio			☺ Libre			☹ Cautiverio		
Edades*	C	J	A	C	J	A	C	J	A	C	J	A
# de Manatíes	1	1	5	4	4	2	0	3	1	3	2	2
ID Manatí**	2	T6	AB T1 T5 T11 XI	D M S Y	D H L S	C I		B T7 T8	12	AN CE CO	AN CE	P X
nmol/l cortisol												
Total Libres	10			7			7			4		
Total Cautivos												
Total por sexo	17						11					
Total de hembras y machos	28											

*Edades: (C) Cría, (J) Juvenil y (A) Adulto.

**Identificación de manatíes

Hembras: (AB) Abril BA8, (C) Costeña, (D) Dominga, (H) Sisha', (I) Ixchel, (L) Silvia, (M) Marina, (S) Sabina, , (T1) T001, (2) T002, (T5) T005, (T6) T006, (T11) T011, (XI) Ximena BA11, (Y) Yumha'.

Machos: (AN) Ángel, (B) BA10, (CE) César, (CO) Colís, (P) Pablo, (T7) T007, (T8) T008, (12) T012, (X) XAMAN.

Lugares de colecta :

☺ Vida libre

Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco (Agua dulce)

Laguna Barbona, Balancán, Tabasco (Agua dulce)

Río San Pedro, Balancán, Tabasco (Agua dulce)

Reserva Sian Ka'an, Quintana Roo (Agua salada)

☹ Cautiverio

Acuario de Veracruz, Veracruz (Agua salada)

Centro de Convivencia Infantil de Jonuta, Tabasco (Agua dulce)

Parque Chucté, Fundación Sandoval-Calderas, Ciudad del Carmen, Campeche (Agua salada)

APÉNDICE 7. Relación de las muestras de saliva medidas con tritio, obtenidas de 16 Manatíes Antillanos en cautiverio.

	<i>Hembras</i>			<i>Machos</i>		
Edades*	C	J	A	C	J	A
# de Manatíes	2	5	1	3	3	2
ID Manatíes**	Dominga Marina Yumka´	Chaca Costeña Dominga Sabina Silvia	Silvia	Ángel César Colis	Ángel César Pablo	Pablo Pepe
Total por sexo		9			8	
Total de hembras y machos	17					

*Edades: (C) Cría, (J) Juvenil y (A) Adulto.

13. REFERENCIAS

1. Agoramoorthy G. Ethics and welfare in southeast asian zoos. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2004; 7(3):189-195.
2. Aubin DJS. Further assessment of the potential for fishery-induced stress on dolphins in the eastern tropical Pacific. Southwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, NOAA, 2002: 12 pp.
3. Auil N.E. Estado del Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Belice. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
4. Bashaw MJ, Kelling AS, Bloomsmith MA, Maple TL. Environmental effects on the behavior of zoo-housed lions and tigers, with a case study the effects of a visual barrier on pacing. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2007.
5. Bassett L, Buchanan-Smith HM, McKinley J. Effects of training on stress-related of the behavior of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in relation to coping with routine husbandry procedures. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2003;6(3):221-233.
6. Barnett JL, Hemsworth PH, Hand AM. Effects of chronic stress on some blood parameters in the pig. *Applied Animal Ethology*. 1982; (9): 273-277.
7. Becerra, S. Revisión bibliográfica sobre el Manatí del Caribe (*Trichechus manatus*). Tesina de licenciatura. UJAT. División Académica de Ciencias Biológicas. 2003: 56pp.

8. Becker J, Breedlove SM, Crews D y McCarthy M. Behavioral endocrinology. Segunda edición. The MIT Press, Massachusetts Institute of Technology. 2002: 410-419 p.
9. Best R.C. Foods and feeding habits of wild and captive sirenia. *Mammal Review*. 1981; (11): 3-29.
10. Brent L. Life-long well being: applying animal welfare science to nonhuman primates in sanctuaries. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2007; 10(1): 55-61.
11. Broom DM, Johnson KG. Stress and animal welfare. Chapman and Hall Editions, London. 1993: 211 p.
12. Brousset DM. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre el bienestar de tres especies de felinos mexicanos en peligro de extinción (ocelote, margay y jaguarundi) mantenidos en cautiverio. Tesis para el grado de Doctora en Ciencias Veterinarias. UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2003: 171 pp.
13. Brousset DM, Galindo F, Valdez R, Romano M, Aluja AS. Cortisol en saliva, orina y heces: Evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Revista Veterinaria*. 2005; 36(3):325-337.
14. Brown J, Wasser SK, Wildt DE *et al*. Faecal steroid analysis for monitoring ovarian and testicular function in diverse wild carnivore, primate and ungulate species. *Proceedings of the 1st. International Symposium on Physiologic and Ethology of Wild and Zoo Animals. Proceedings Suppl*. 1997; 11:27-31.
15. Brown J, Wildt DE. Assessing reproductive status in wild felids by non-onvasive faecal steroid monitoring. *The Zoological Society of London. Int. Zoo Yb*. 1997; 35: 173-191.

16. Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. Comparative aspects of steroid hormone metabolism on ovarian activity in felids measured noninvasively in feces. *Biology of reproduction*. 1994; 51: 776-786.
17. Etheridge K., Rathbun G.B., Kochman H.I., Powell J. Consumption of aquatic plants by the West Indian manatee. *J. Aquat. Plant manage.* 1985; (23):21-25.
18. Carbajal S. Minimal number of conspecifics needed to minimize the stress response of isolated mature ewes. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2001; 4(4):249-255.
19. Coppola, CL. Noise in the animal shelter environment: building design and the effects of daily noise exposure. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2006; 9(1): 1-7.
20. Davey G. An hourly variation in zoo visitor interest: measurement and significance for animal welfare research. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2006; 9(3): 249-256.
21. Davey G. Visitor circulation and nonhuman animal welfare: an overlooked variable?. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2004; 7(4): 243-251.
22. Davey G, Henzi P, Higgins L. Enrichment on chinese visitor behavior. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2005; 8(2):131-140.
23. Davey G. Visitor's effects on the welfare of animals in the zoo: a review. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2007; 10(2):169-183.
24. DeLuca LA, Glass SG, Johnson RE. Description and evaluation of a canine volunteer blood donor program. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2006; 9(2):129-141.

25. Elzanowski A, Sergiel A. Stereotypic behavior of a female asiatic elephant (*Elephas maximus*) in a zoo. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2006; 9(3):223-232.
26. Espinoza C., Jiménez I. Estado actual del manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Costa Rica. *Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica*. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
27. Espinoza C., Jiménez I. Estado Actual del Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Nicaragua. *Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica*. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
28. Frézard A, Le Pape G. Contribution to the welfare of captive wolves (*Canis lupus lupus*) : A behavioral comparison of six wolf packs. *Zoo biology*. 2003; (22):33-44.
29. García H., Machuca O.H. Monitoreo científico para la conservación del manatí y su hábitat. *Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica*. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
30. Garzón FM, Montenegro I, Caicedo D, Millán SL, Montoya RA. Plan de Acción para la Conservación del Manatí Antillano en Colombia. Ministerio del Medio Ambiente, Dirección General de Ecosistemas. Santafé de Bogotá, Colombia. 1998. [WWWdocument] URL. <http://www.minambiente.gov.co/admin/contenido/documentos/plan-manati.doc>

31. Gero S, Whitehead H. Suckling behavior in sperm whale calves: observations and hypotheses. *Marine Mammal Science*. 2007; 23 (2): 398-413.
32. Geverink NA, Schouten, WGP, Gort G, Wiegant VM. Individual differences in aggression and physiology in peri-pubertal breeding gilts. *ELSEVIER. Applied Animal Behaviour Science*. 2002: 77:43-52.
33. González-Socoloske D., Ford R.E., Olivera-Gómez L.D., Bonde R.K. El uso del sonar lateral (Sidescan) para detectar y estudiar el manatí (*Trichechus manatus*) en cuerpos de agua turbia y estuarios. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
34. González-Socoloske D, Olivera-Gómez L, Quintana-Rizzo E. El 1er. Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Mesoamérica. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
35. González-Socoloske D., Taylor C., Flores S., Cruz G.A., Ford R.E. Estado Actual del Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Honduras. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
36. Guichard C, Ellis S, Matamoros Y, Seal U. Análisis de la viabilidad poblacional y del hábitat del manatí en México. Informe. 2002. Conservation Breeding Specialist Group (SSC/IUCN), Apple Valley, MN. [WWWdocument] URL.

37. Gutiérrez M. Medición del comportamiento y cortisol fecal en oso negro (*Urdus americanus*) bajo diferentes condiciones ambientales. Tesis para el Grado de Maestro en Ciencias. UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2004: 85 pp.
38. Guyton AC, Hali JE. Tratado de Fisiología. Capítulo 77, Hormonas corticosuprarrenales. Interamericana Mc Graw-Hill. México. 1996: 1047-1062 pp.
39. Hartman, D. S. 1979. Ecology and behavior of the manatí (*Trichechus manatus*) in Florida, American Society of Mammalogists.
40. Hernández-Olascoaga A., Olivera-Gómez L.D. Helmintos gastrointestinales del Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) del estado de Tabasco, México. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
41. Instituto Nacional de Ecología, Dirección General de Vida Silvestre. "Proyecto de Conservación, Recuperación y Manejo del manatí *Trichechus manatus* en México". 2000. [WWWdocument] URL <http://sepultura.semarnat.gob.mx/upsec/programas/progcvs/manati.htm>
42. Iske L. Reproductive endocrinology of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*): estrous cycles, seasonal patterns and behaviour". Tesis para el título de Doctorado en filosofía. Universidad de Florida. 2000: 45 p.
43. Jessop TS, Tucker AD, Limpus CJ, Whittier JM. Interactions between ecology, demography, capture stress and profiles of corticosterone and glucose in a free-living population of Australian freshwater crocodiles.

Academic Press. 2003. [WWWdocument] URL
<http://www.sciencedirect.com>

44. Künz C, Kaiser S, Meier E, Sachser N. Is a wild mammal kept and reared in captivity still a wild animal?. *Hormones and behaviour*, 2003;43:1:187.
45. Laws N, Ganswindt A, Heistermann M, Harris M, Harris S, Sherwin C. A case of study: fecal corticosteroid and behavior as indicators of welfare during relocation of an Asian Elephant. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2007;(10)4:349-358.
46. Liu D, Wang Z, Tian H, Yu C, Zhang G, Wei R, Zhang H. Behavior of giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in captive conditions: gender differences and enclosure effects. *Zoo biology*. 2003; (22):77-82.
47. Louise H. Seasonal reproductive endocrinology and anatomy of Steller Sea Lions (*Eumetoplas jubatus*). Master of science. Faculty of the University of Alaska Fairbanks. 2001. 133 pp.
48. Luna A. Mediciones de comportamiento y cortisol en la tonina (*Tursiops truncatus*) en dos tipos de encierros: instalaciones cerradas y abiertas. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2005. 89 pp.
49. Mallonée JS, Joslin P. Traumatic stress disorder observed in a adult wild captive wolf (*Canis lupus*). *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2004; 7(2):107-126.
50. Mandujano CH. Estudio sobre la biología del manatín (*Trichechus manatus*) en el municipio de Playas de Catazajá, Chiapas. XIV Simposio sobre fauna silvestre. 1996. 5 pp.

- 51.** Manire C.A., Walsh C.J., Rhinehart H. L., Colbert D.E., Noyes D.R. Luer C.A. Alterations in blood and urine parameters in two florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*) form simulated conditions of release following rehabilitation. *Zoo biology*. 2003; (22):2: 103-120 pp.
- 52.** Manzanilla-Fuentes A., Seijas A.E. Causas de mortalidad de manatíes en la zona norte del Lago de Maracaibo, algunas evidencias y soluciones. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
- 53.** Manzanilla-Fuentes A., Seijas A.E. Estado actual de la población de manatí en la Bahía el Tablazo, Lago de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
- 54.** Maple, T. Toward a science of welfare for animals in the zoo. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2007; 10(1), 63–70.
- 55.** Margulis SW, Hoyos C, Anderson M. Effect of felid activity on zoo visitor interest. *Zoo biology*. 2003; (22): 587:599.
- 56.** Mashburn KL, Atkinson S. Evaluation of adrenal function in serum and feces of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*): influences of molt, gender, simple storage, and age on glucocorticoid metabolism. University of Alaska, Fairbanks and Alaska SeaLife Center. 2004. [WWWdocument] URL <http://www.sciencedirect.com>.
- 57.** McBride G. Adaptation to different types of stress. *Applied Animal Ethology*. 1982; 8:577-584.

58. Mesa-Ávila G, Molina-Borja M. Behavior as a tool for welfare improvement and conservation management in the endangered lizard (*Gallotia bravoana*). *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2007; (10)3:193-206.
59. Miksis-Olds J.L. Manatee response to environmental noise. Doctor of Philosophy in Oceanography. University of Rhode Island. 2006.
60. Morales B. Estado del Manatí (*Trichechus manatus*) en la Costa Caribe de México. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
61. Morales JB. Distribución, abundancia y uso de hábitat por el manatí en Quintana Roo y Belice, con observaciones sobre su biología en la Bahía de Chetumal, México. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Biología). UNAM. Facultad de Ciencias. 2000.
62. Muñoz AC. Extracción, purificación y cuantificación de ADN de manatíes (*Trichechus manatus manatus*) en cautiverio en el Acuario de Veracruz, A. C. Tesis de licenciatura. UDCA. Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: 2003: 18–24 p.
63. Negrete, AC. Condicionamiento operante para la realización de procedimientos veterinarios en el manatí del caribe (*Trichechus manatus manatus*). Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2003.
64. Norris D. Vertebrate endocrinology. 3era. Edición. Academic Press. 1997; 634 pp.

65. Oki C, Atkinson S. Diurnal patterns of cortisol and thyroid hormones in the Harbor seal (*Phoca vitulina*) during summer and winter seasons. *General and comparative endocrinology*. 2004. www.sciencedirect.com
66. Olivera-Gómez L.D. Estado del Manatí (*Trichechus manatus*) en humedales del sur del Golfo de México. *Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica*. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
67. Olivera-Gómez L.D., Jiménez-Domínguez D., Jorge-Vargas S., González-Socoloske D. Telemetría y técnicas acústicas para el monitoreo de manatíes en ambientes fluviolagunares en el Sureste de México. *Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica*. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
68. Ortíz RM, Houser DS, Charles CE, Ortiz CL.. Hormonal changes associated with the transition between nursing and natural fasting in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). 2003. [WWWdocument] URL <http://www.sciencedirect.com>
69. Ortiz S, Romero F. Propuesta de un plan de manejo para el manatí (*Trichechus manatus manatus*) en C.C.I. de Jonuta, Tabasco. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. División de Ciencias Biológicas. 2004: 10-11 p.
70. Parrott RF, Misson BH, Baldwin BA. Salivary cortisol en pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *British Veterinary Journal*. 1989; 145:362-366.

71. Patterson-Kane EG. Noise exposure, music, and animals in the laboratory animal refinement and enrichment forum (LAREF) discussions. *Animal Welfare and Behavior*. 2006; 9(4):327-332.
72. Pedernera-Romano C., Valdéz R., Singh S., Chiappa X., Romano M.C., Galindo F. Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): a non-invasive technique. *Animal welfare*. 2006; 15: 359-362.
73. Ponzio MF, Monfort SL, Busso JM, Dabbene VG, Ruíz RD, De Cuneo MF. A Non-Invasive Method for Assessing Adrenal Activity in the Chinchilla (*Chinchilla Manigera*)". *Journal of Experimental Zoology*, 2004; 301A:218-227.
74. Quintana-Rizzo E. Estado Actual del Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Guatemala. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
75. Ramírez-Jiménez HH, Olivera LD. Uso del hábitat de manatíes (*Trichechus manatus*) aislados en la laguna de las Ilusiones, Tabasco, México. *Mesoamericana: Revista Oficial de la Sociedad Mesoamericana para la Biología y la Conservación*. Volumen 11 (3). Nov. 2007; Pp. 95-96.
76. Reinhardt V. Working with rather than against macaques during blood collection. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2003;6(3):189-197
77. Reinhardt V, Reinhardt A. Blood collection procedure of laboratory primates: a neglected variable in biomedical research. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2000; 3(4):321-333.
78. Requelme L. Estado actual del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Panamá. Memorias del Primer Simposio para la Biología y

Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006;
http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html

- 79.** Rodarte LF, Ducoing A, Galindo F. The effect of environmental manipulation on behavior, salivary cortisol, and growth of piglets weaned at 14 days of age. 2004; 7(3):171-179.
- 80.** Rodríguez-Ibáñez C., Portilla E. Usos culturales y manejo del Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*), en el Sistema Lagunar de Alvarado, Veracruz, México. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006;
http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
- 81.** Santos-Mariño J.A. Análisis de la viabilidad de la población y del hábitat del manatí (*Trichechus manatus*) en la Costa del Caribe Costarricense. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006;
http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
- 82.** Savage-Rumbaugh S, Wamba K. Welfare of apes in captive environments: comments on, and by, a specific group of apes. Journal of Applied Animal Welfare Science. 2007; 10(1): 7-19.
- 83.** Self C. The elusive manatee: An ethological approach to understanding behavior in West Indian Manatee. Sirenian International, Inc. 2003: 1-15 pp.
- 84.** Sellinger RL, Ha JC. The effects of visitor density and intensity on the behavior of two captive jaguars (*Panthera onca*). Journal of Applied Animal Welfare Science. 2005; 8(4): 233-244.

- 85.** Sousa-Lima RS, Paglia AP, Da Fonseca GAB. Signatura information and individual recognition in the isolation calls of Amazonian manatees, *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). *Animal behaviour*. 2002; 63:301-310.
- 86.** Tresguerres JAF, Aguilar E, Devesa J, Moreno B. Tratado de endocrinología básica y clínica. Editorial Síntesis. Madrid, España. 2000:2327 pp.
- 87.** Tresz H. Behavioral management at the Phoenix zoo: new strategies and perspectives. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2006; 9(1):65-70.
- 88.** Valle MC. Relación entre cortisol e IgA en heces de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) y jaguar (*Panthera onca*) en cautiverio. Tesis para el grado de Maestra en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2007:79 pp.
- 89.** Valverde A. La conservación del manatí (*Trichechus manatus*) como objeto focal del manejo del Parque Nacional del Tortuguero, Costa Rica. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
- 90.** Vanoye, F. "Constantes hemáticas para crías de manatí (*Trichechus manatus manatus*) de hasta dos años de edad en cautiverio". Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. (2002): 4-5 p.
- 91.** Vanoye F. Programa de mantenimiento en cautiverio de los manatíes del Acuario de Veracruz, México. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006;

http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html

92. Vianna J.A., Bonde R.K., Caballero S., Giraldo P., Lima R.P., Clark A., Marmontel M., Morales-Vela B., De Souza M.J., Parr L., Rodríguez-López M.A., Mignucci-Giannoni A.A., Powell J.A., Santos F.R. Phylogeography, philogeny and hibridization in trichechid sirenians: implications for manatee conservation. *Molecular Ecology*. 2006; 15:433-447.
93. Villanueva C. Determinación de cortisol en el manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*). Tesis para el grado de Licenciatura en Biología. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 2005.
94. Villanueva-García C., Romano-Pardo, M., Valdéz-Pérez, R. Evaluación del efecto del público sobre el comportamiento y los niveles de cortisol en el Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*) en cautiverio. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html
95. Viloría L. Manejo y registro conductual de una cría de manatí (*Trichechus manatus manatus*) en cautiverio en el parque Xcaret, Quintana Roo, México. Tesis para obtener el grado de licenciatura en Biología. UNAM. Facultad de Ciencias. 2001.
96. Walton RA, Hosey GR. Observations on social interactions in captive p&re David's deer (*Elaphurus da vidianus*). *Applied Animal Ethology*. 1983; 11:211-215.
97. Wetzel D.L., Reynolds III J.E., Morales B. Amenazas de contaminantes orgánicos para los manatíes (*Trichechus manatus*) y otros mamíferos

marinos de Mesoamérica. Memorias del Primer Simposio para la Biología y Conservación del Manatí Antillano en Mesoamérica. 2006; http://resweb.llu.edu/rford/courses/ESSC5xx/SMBC_manatee_symposium_es.html

- 98.** Young J.S., Schulte B.A. Captive manatee activity and social behavior: considerations for rehabilitation. 2003.