



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Determinación de cortisol como marcador de estrés en *Tursiops truncatus* (Tonina o delfín nariz de botella), relacionado a programas de nado interactivos con humanos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ENRIQUE ALBERTO SOBERANES BLANCAS



ASESORA:

DRA. LUCÍA ELIANA RANGEL PORTA

Cd. Mx. 2022



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.

Con acento latíno.

A mis padres...

Agradecimientos

Al lector...

Declaración de ausencia de conflicto de interés

En el desarrollo del presente trabajo titulado “Determinación de cortisol como marcador de estrés en *Tursiops truncatus* (Tonina o delfín nariz de botella), relacionado con programas de nado interactivos con humanos.”, tuve acceso a cierta información perteneciente a la empresa Dolphin Discovery, en este sentido, declaro que:

No tengo ninguna situación de conflicto de interés directo o indirecto, real, potencial o evidente, incluyendo interés financiero, profesional, personal, familiar o de relación con un tercero, que pueda tener un interés comercial atribuido en obtener el acceso a cualquier información confidencial obtenida durante el tiempo del presente trabajo, las sesiones correspondientes o un interés personal o familiar, en el resultado de la opinión técnica y ética.

Hago constar que me conduzco bajo los estrictos principios éticos y profesionales de bien común, justicia, transparencia, igualdad, respeto, legalidad, honradez, lealtad, eficiencia, imparcialidad, independencia, integridad, confidencialidad y competencia técnica. El cumplimiento de estos principios garantiza la adecuada emisión de mi opinión técnica y científica.

Declaro que no estoy sujeto a ninguna influencia directa por algún representante, fabricante, comerciante o persona moral mercantil de los procesos, productos, métodos, instalaciones, servicios y actividades evaluadas. Todas mis opiniones, decisiones y acciones estarán dirigidas a la satisfacción de las necesidades e intereses de la sociedad, por encima de intereses particulares ajenos al bienestar de la colectividad.

Atentamente

C. Enrique Alberto Soberanes Blancas

Contenido

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
Tursiops truncatus	13
Descripción morfológica.....	16
Tursiops truncatus en cautiverio	17
Bienestar Animal.....	18
Bienestar animal en cautiverio	19
Estrés.....	20
Respuesta al estrés	22
Efectos del estrés crónico.....	27
Biomarcadores de estrés	28
Cortisol.....	29
Técnicas para determinación hormonal.....	33
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	33
ELISA competitivo	34
Justificación.....	36
Objetivo general	39
Hipótesis.....	39
Desarrollo de ensayo de ELISA para las determinaciones de cortisol.....	41
- Producción de anticuerpos.....	41
- Titulación de anticuerpos contra cortisol	42

- Obtención del volumen sanguíneo total (Sangrado a blanco).....	43
- Resultados de la producción de anticuerpos.....	44
- Purificación de los anticuerpos.....	45
- Estandarización del ensayo de ELISA para determinación de cortisol	46
- Validación del ensayo	50
- Selectividad analítica.....	50
- Evaluación de calidad de la curva de calibración	52
Curva estándar	57
Límite de detección y sensibilidad analítica	59
Intervalo de trabajo	59
Precisión del ensayo.....	60
- Repetibilidad	60
Materiales y Métodos	63
Zona de estudio	67
Animales	69
Colección de muestras	70
Determinación de cortisol	74
Análisis estadístico de las determinaciones hormonales de los animales	74
Resultados	76
Toninas.....	76
Niveles de cortisol en suero.....	76
Análisis estadístico REML	78

Discusión.....	88
Conclusión.....	98
Prospectivas.....	99
Literatura citada.....	100
Anexos	106

RESUMEN

La tonina, tursión o delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*) es de los mamíferos marinos con mayor presencia en los acuarios del mundo. El cautiverio de estos ejemplares los deja expuestos a diferentes estímulos, como la participación en programas de nado interactivo con humanos. Esta actividad puede ser considerada como un enriquecimiento ambiental (al fomentar mayor número de conductas de juego, nado y salto). Estudios previos han observado a delfines en cautiverio que prefieren la interacción con humanos al contacto con objetos inanimados. Sin embargo, es importante valorar dicha actividad, para evaluar la veracidad de esta afirmación, debido a que esta actividad o interacción pudiese causar una “carga alostática”, como consecuencia de la exposición prolongada a factores (externos o internos) que modifican el equilibrio homeostático del ejemplar. Para determinar esta respuesta, se evaluaron cuatro distintos programas de nado interactivo con 23 delfines en días no consecutivos ubicados en seis diferentes alojamientos (Delfinarios distintos) pertenecientes a la empresa *Dolphin Discovery* ubicadas en la Riviera Maya, México. La toma de muestras sanguíneas se realizó antes del primer nado del día y al finalizar el mismo, en el periodo no mayor a 45 minutos entre cada muestra. La determinación hormonal de cortisol se llevó a cabo mediante el ensayo tipo ELISA competitiva, previamente desarrollado y validado en el departamento de reproducción FMVZ-UNAM. Los resultados muestran que previo al nado se determinó la mayor concentración de cortisol en ambos grupos seguido del descenso significativo en las concentraciones posteriores al nado ($p < 0.001$). De igual manera no se demostró que los programas de nado interactivo induzcan un evento generador de estrés, en los que se refleje el aumento significativo de cortisol en los delfines participantes. No se encontró relación estadísticamente significativa para las variables de locación, tipo de alojamiento, sexo, edad y condición de nacimiento (vida libre o cautiverio).

Palabras clave: *Tursiops truncatus*, cortisol, estrés, programas de nado interactivo, nado con delfines

INTRODUCCIÓN

Los mamíferos marinos son un grupo diverso, con alrededor de 120 especies, que incluye a los cetáceos, pinnípedos, los sirenios, la nutria marina (*Enhydra lutra*) y el oso polar (*Ursus maritimus*; Reeves *et al.*, 2002). Estas especies se localizan comúnmente en lugares de cautiverio como zoológicos, acuarios, instalaciones de rehabilitación, santuarios y centros de investigación; cierto número son rehabilitados y reintroducidos a su hábitat. Sin embargo, la mayoría de los mamíferos en cautiverio residen de manera permanente dentro de dichas instalaciones (Brando *et al.*, 2017) en donde están sujetos a procesos de estrés de tipo e intensidad variables.

El conocimiento que se tiene de los efectos físicos y conductuales del estrés en los cetáceos es relativamente limitado, por lo que existe gran controversia sobre el bienestar de los delfines en cautiverio, y específicamente de aquellos participantes en programas de nado interactivo con humanos (Brando *et al.*, 2017; Curry, 1999; Trone *et al.*, 2005).

El cortisol es un corticosteroide conocido como la hormona del estrés, debido a que se incrementa en eventos estresantes, para permitir al organismo responder y sobrevivir (Camargo, 2004). La determinación de las concentraciones de dicha hormona se considera como herramienta de fácil aplicación, por lo que es la más estudiada en trabajos sobre bienestar animal y de respuesta a factores estresantes, con la finalidad de elaborar mejores estrategias de manejo y conservación (Noren *et al.*, 2011). La mayoría de las investigaciones relacionadas a la determinación de los niveles de cortisol en los delfines, como indicador de estrés, se han enfocado en

estudiar la concentración de esta hormona post-captura (Mancia *et al.*, 2008; Fair *et al.*, 2014; Hart *et al.*, 2015) y en animales de exhibición (St Aubin *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2012; Rangel, 2014). A pesar de ello, se dispone de algunos estudios en los que se valoró el nado interactivo de los delfines con humanos como causante de estrés, sin que se encontraran efectos negativos para el bienestar animal (Dolt *et al.*, 2000; Sánchez Okrucky., 2016; Sánchez, 2018).

Estudios realizados por Dold (2000) demuestran que no existen niveles elevados de cortisol en animales involucrados en programas interactivos y animales de exhibición, así como diferencias significativas entre ellos. Posteriormente, Sánchez Okrucky en 2016 concluye que el nado interactivo de delfines *Tursiops truncatus* no genera repercusiones en el bienestar de éstos. Finalmente, en 2018 Sánchez realizó la valoración de los programas de nado como enriquecimiento ambiental en *Tursiops truncatus*. Los resultados de este estudio indican que el nado interactivo con humanos no ocasiona daño muscular ni estrés a los ejemplares. Sin embargo, en todos los estudios antes mencionados se realizó la evaluación de un solo evento (programa interactivo) por ejemplar involucrado, lo cual limita la evaluación de eventos constantes y repetitivos (programas interactivos), para valorar el nivel de estrés a largo plazo.

Algunos autores han sugerido que evaluar las concentraciones de cortisol en animales puede no ser buen indicador cuando se valoran efectos agudos, esto se debe a las variaciones en la síntesis y liberación de la hormona que se presentan a lo largo del día, como se demuestra en el estudio de Suzuki (2003) en cetáceos. Sin embargo, el monitoreo constante de esta hormona permite determinar si una actividad específica causa estrés en los individuos así como evaluar la adaptación

de un animal a su entorno previniendo patologías producto del estrés crónico (St. Aubin y Dierauf, 2001; Schmitt *et al.*, 2010).

En el caso de los nados interactivos es importante realizar un estudio con distintos ejemplares en diferentes eventos debido a que cada nado interactivo varía en intensidad y tipo de estímulos a los que se enfrenta el animal. Además, cada individuo presenta una respuesta que difiere en magnitud ante los estímulos estresantes. En vista de ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración de cortisol inicial y final durante distintas sesiones no consecutivas en delfines sometidos a nado interactivo y compararlas con la concentración de cortisol inicial y final en delfines sin actividades de nado interactivo durante el mismo periodo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Tursiops truncatus

El nombre *Tursiops* se traduce como "delfín", derivado del Latín *Tursio* ("delfín") y el sufijo griego -ops ("aparición"), acuñado por el historiador romano Plinio, empleado para describir a un delfín; *truncatus* deriva del Latín trunco- ("truncado"), aparentemente refiriéndose a los dientes aplanados utilizados como una característica identificativa (Perrin *et al.*, 2009; Arija, 2020).

Tursiops truncatus, tursión o tonina, es probablemente el cetáceo más conocido y estudiado. Pertenece a la Clase Mammalia, Orden Cetartiodactyla, Suborden Cetacea, Infraorden Odontoceti, y Familia Delphinidae. Es una especie cosmopolita y muy común en los océanos, se distribuye en aguas templadas y tropicales alrededor del mundo entre las latitudes de 45°N a 45°S (NOAA-Fisheries, 2017) (Imagen 1).

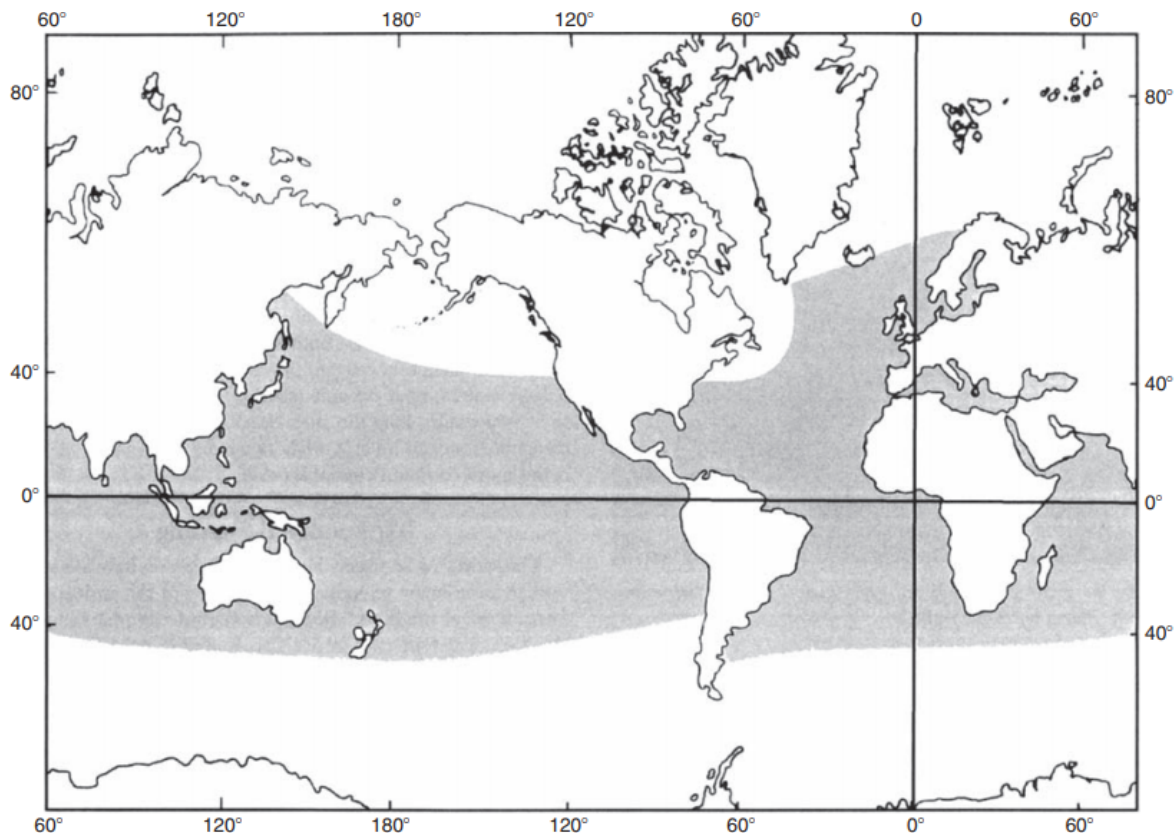


Imagen 1. Distribución de la especie *Tursiops truncatus* a nivel mundial, indicada con la franja gris (Tomada de la Enciclopedia de Mamíferos Marinos, Perrin et al., 2009).

Las toninas habitan ambientes tanto costeros como oceánicos, por lo que se pueden diferenciar en dos ecotipos. El costero que generalmente habita en aguas someras, estuarios, ríos y lagunas, a profundidades no mayores de 3 m, se encuentran a no más de 0.5 millas náuticas mar adentro; así como el ecotipo oceánico que se distribuye en aguas profundas, por lo que los encontramos a más de 0.5 millas náuticas mar adentro (Heckel, 2018).

Su distribución en México está reportada en el Océano Pacífico y en el Golfo de California, mientras que en el Océano Atlántico se han observado en el Golfo de México y en el Mar Caribe (Imagen 2). Adicionalmente, Medrano González *et al.* (2007) reportan observaciones dentro del parque nacional Revillagigedo, en concordancia con la ficha del Sistema de Información, Monitoreo y Evaluación para

la Conservación (SIMEC), de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas actualizada el 23 de marzo de 2022.



Imagen 2. Distribución general de *Tursiops truncatus* en México, señalada con la sombra color café (tomada del Atlas de Distribución de Mamíferos Marinos (Tomada de Heckel et al., 2018).

Los delfines son depredadores oportunistas, pueden tener conductas grupales o solitarias para su alimentación. Su dieta varía de acuerdo con las condiciones ambientales y a la disponibilidad de alimento presente en el hábitat (costero-oceánico). En el Golfo de California el ecotipo costero se alimenta principalmente de peces e invertebrados, mientras que el ecotipo oceánico ingiere peces mesopelágicos y calamares (Perrin *et al.*, 2009; Niño, 2011; Rangel, 2014; NOAA-Fisheries, 2017).

Las poblaciones de delfines pueden oscilar en tamaño, desde parejas hasta grupos de 15 individuos, aunque se han observado grupos de más de 1000. El número de ejemplares por grupo depende de los ecotipos. Estas poblaciones varían en cuanto a sexo, edad y condición reproductiva (Sánchez, 2018). El promedio de vida en las hembras llega a ser de 57 años y en machos de 48. Las hembras alcanzan la madurez sexual entre los 5 y los 13 años de edad, mientras que los machos la alcanzan entre los 9 y los 14 años (Perrin *et al.*, 2009).

Descripción morfológica

La tonina es un animal robusto, posee un hocico corto, grueso y claramente diferenciado del melón. La aleta dorsal es grande, curvada, y se sitúa en la región central. Su forma y coloración varían en función de su localización geográfica, se pueden identificar patrones principalmente de color gris, que pueden variar en la tonalidad -desde gris claro hasta casi negro-, se observan los patrones más oscuros en la parte superior, cerca de su aleta dorsal; y los claros -hasta casi blanco- en el vientre. Este patrón es conocido como coloración a contra sombra, se considera un tipo de camuflaje que ayuda a los delfines a no ser vistos por sus presas y depredadores. Las toninas que habitan en las zonas costeras son generalmente más pequeños y de un color más claro que los que viven en mar abierto (AMMPA, 2011; Niño, 2011; NOAA-Fisheries, 2017; CRAM, 2019). Las longitudes de los adultos varían desde 2.2 hasta 2.8 m, aproximadamente, según la ubicación geográfica (Perrin *et al.*, 2009), la longitud máxima reportada en un delfín del noreste del océano Atlántico fue de 4.10 m (AMMPA, 2011). Su peso oscila entre los 200 y los 600 kg, generalmente los machos suelen ser más grandes que las hembras (Reeves *et al.*, 2002).



Imagen 3. Diferencias morfológicas entre ecotipo costero y oceánico de *Tursiops truncatus* (Tomada del libro *Whales, Dolphins y Seals*. Shirihai y Jarrett, 2006).

Tursiops truncatus en cautiverio

El cautiverio de los cetáceos inició en 1860 (Mayer, 1998; Alaniz, 2010). *Tursiops truncatus* ha sido durante mucho tiempo la especie más popular en los acuarios o colecciones zoológicas debido a la percepción positiva que produce en las personas. Esto conlleva que la principal actividad desarrollada con ellos fuera para entretenimiento humano. Durante la última década del siglo XX se implementaron los programas de nado interactivo con delfines (Curtin y Wilkes 2007). Posteriormente, las toninas fueron utilizadas para terapias de rehabilitación física y emocional, la cual es respaldada por diversos estudios que confirman efectos positivos en personas con afecciones como autismo, síndrome de Down, déficit de atención, depresión, ansiedad y desorden del sueño que realizan esta actividad (Stephan *et al.*, 1981; Cochrane y Callen, 1992; DeMares y Krycka, 1998; Webb y Drummond, 2001; Williamson, 2008; Marino, 2011).

Actualmente *Tursiops* es el género de delfines con más ejemplares confinados alrededor del mundo. Al igual que otros mamíferos marinos en confinamiento, las toninas afrontan factores demandantes relacionados a cambios físicos y sociales (diseño de los encierros, cambios de alimentación e interacciones sociales), estos factores pueden provocar alteraciones negativas en sus habilidades adaptativas o en el comportamiento, afectando el bienestar animal. Estas alteraciones pueden desencadenar una posible situación de estrés crónico que puede manifestarse con el deterioro o muerte del ejemplar (Cowan, 2000; Perrin *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2012; Hing *et al.*, 2014).

En la búsqueda de mejorar las condiciones de los animales en cautiverio, se incrementó el conocimiento acerca de los requisitos para el cuidado de los delfines, el tipo de instalaciones y el bienestar animal. Este último relacionado generalmente en cómo el organismo enfrenta el entorno en el desarrollo y en presencia de estrés, esto con la finalidad de aumentar el éxito en la manutención a largo plazo de los animales (Perrin *et al.*, 2008; Esch *et al.*, 2009; Luna *et al.*, 2012).

Bienestar Animal

Existen múltiples definiciones de qué es el bienestar animal, siendo la más difundida la de Broom (1986), en la que se indica que “El bienestar de un individuo es su estado en relación con sus intentos de afrontar el ambiente”, sin embargo nuestra capacidad de evaluar y comprender perspectivas físicas y conductuales en los animales ha hecho que el concepto evolucione (Aluja, 2011).

Es controversial el hecho de que animales en cautiverio puedan tener bienestar. Sin embargo, es importante que cualquier establecimiento que posea animales siempre procure un ambiente favorable, en el que los ejemplares puedan

cubrir sus requerimientos básicos, y tengan facilidad de llevar a cabo actividades recreativas que les proporcione una vida confortable. Considerando lo anterior, en 1965 Brambell propuso un listado de cinco puntos, llamados “Las cinco libertades”, con la finalidad de evaluar el bienestar animal, en los cuales estableció lo siguiente:

- **Libres de sed, hambre y mala nutrición**, proporcionándoles libre acceso a agua fresca y a una dieta que los mantenga en condiciones de salud y vigor.
- **Libres de incomodidades**, proporcionándoles un ambiente apropiado, lo que incluye protección y un área de descanso confortable.
- **Libres de dolor, lesiones y enfermedad**, por medio de la prevención o de un diagnóstico y tratamiento rápidos.
- **Libres para expresar su comportamiento normal**, proporcionándoles espacio suficiente, facilidades apropiadas y la compañía de animales de su misma especie.
- **Libres de miedo y de “distress”** (sufrimiento emocional), asegurándoles condiciones que eviten sufrimiento mental.

Las cinco libertades son útiles como guía general, para las especies en las que ahora hay información precisa sobre sus necesidades. Considerando que una necesidad es un requisito, que forma parte de la biología básica de un animal, para obtener un recurso particular o para responder a un estímulo ambiental o corporal particular (Aluja, 2011; Brando *et al.*, 2017).

Bienestar animal en cautiverio

Actualmente los encargados de evaluar el bienestar animal en animales en cautiverio, emplean un conjunto de herramientas, entre las que se encuentra

proporcionar las cinco libertades, así como realizar el monitoreo del comportamiento y la medición de hormonas adrenales. Estas últimas son valiosas para indicar el alcance de los problemas de comportamiento, por lo que son una medida útil para estimar el bienestar animal (Miller *et al.*, 2016; Brando *et al.*, 2017).

Es importante comprender que el bienestar animal para cualquier sistema de cautiverio tiene partes interesadas, algunas de ellas motivadas por diversos incentivos. Dentro de dichos incentivos existe el ético, por proporcionar el bienestar a los animales desde la perspectiva del personal encargado. Además, existe también la motivación por lograr el objetivo de tener empresas turísticas, centros de conservación y de investigación, en los que se considera que los animales con un buen bienestar son mejores para educar y para interactuar con los turistas, así como para fungir como modelos de investigación, con los que es posible obtener información más válida para sus contrapartes de vida libre (Brando *et al.*, 2017).

Estrés

La palabra estrés inicialmente se usó en el campo de la ingeniería para hacer referencia a la fuerza que aplicada sobre una estructura conduce a la deformación. No fue hasta 1936 que Hans Selye introdujo el término estrés al campo de las ciencias biológicas para denotar un síndrome (Gómez, 2006). Comúnmente el término estrés se relaciona a la sobrecarga de factores externos o internos (traumatismos, toxinas, infecciones, hemorragia, enfermedades metabólicas, etc) o psicológicos (ansiedad, miedo, depresión, etc) que modifican el equilibrio homeostático en el cual se desenvuelve nuestro organismo. La sumatoria de todas las reacciones no específicas que siguen a la exposición crónica a distintos factores estresores lleva al denominado “Síndrome General de Adaptación”. Este síndrome

se define como un estado de alteración homeostática producido por diversos estímulos (internos o externo), que generan en el organismo respuestas fisiológicas y conductuales para mantener o reestablecer dicha homeostasis, y promover la adecuación del organismo con el entorno que lo rodea (Pilnik, 2010; Rodríguez, 2013).

Selye describe el “Síndrome General de Adaptación” del estrés, el cual se divide en tres fases: la primera es la reacción de alarma, que se caracteriza por la activación de circuitos específicos, en la que el cuerpo se prepara para la “lucha o huida”; la segunda es la fase de resistencia, en donde el estímulo desaparece o surgen reacciones adaptativas de alto consumo energético, llegando a un estado óptimo. Si el factor estresante se prolonga o persiste, el cuerpo entra en la tercer fase llamada agotamiento, en la cual el organismo no logra “adaptarse”, provocando el deterioro o la muerte (Rangel, 2014).

En la actualidad, se ha propuesto el término “alostasis” para explicar el mantenimiento de la estabilidad del organismo, mediante la adaptación a los cambios impuestos por los factores estresores. Es un proceso activo de diferentes sistemas, debido a la necesidad de cambiar los puntos de estabilidad o regulación con el fin de mantener un balance ante demandas constantemente variables, logrando un nuevo equilibrio (Pilnik, 2010; De Nicola, 2015).

Los sistemas alostáticos permiten al organismo responder al estrés, activando el sistema nervioso autónomo (simpático), el sistema inmune y el eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (HPA) para responder a un agente estresor. En estos sistemas figuran las catecolaminas de la médula suprarrenal, las citocinas y el cortisol de la corteza adrenal, (Davidson, 2012; Pilnik, 2010).

Respuesta al estrés

La respuesta a un factor estresante efectuada por el organismo ocurre segundos después de detectarlo, el primer sistema involucrado es el sistema nervioso simpático, induciendo la activación de neuronas preganglionares simpáticas para liberar noradrenalina y en células cromafines de la médula (glándulas adrenales), que simultáneamente secretan adrenalina al torrente sanguíneo. En consecuencia el organismo suprime funciones digestivas, aumenta el ritmo cardíaco y respiratorio, así como el flujo de sangre a los músculos, para pelear o huir (Gómez, 2002; Gómez, 2006). Esta respuesta inmediata es de corta duración (10 - 100 segundos, vida media de catecolaminas), por lo cual no tiene impacto significativo en el bienestar del animal a largo plazo (Moberg y Mench, 2000; Hill, 2016).

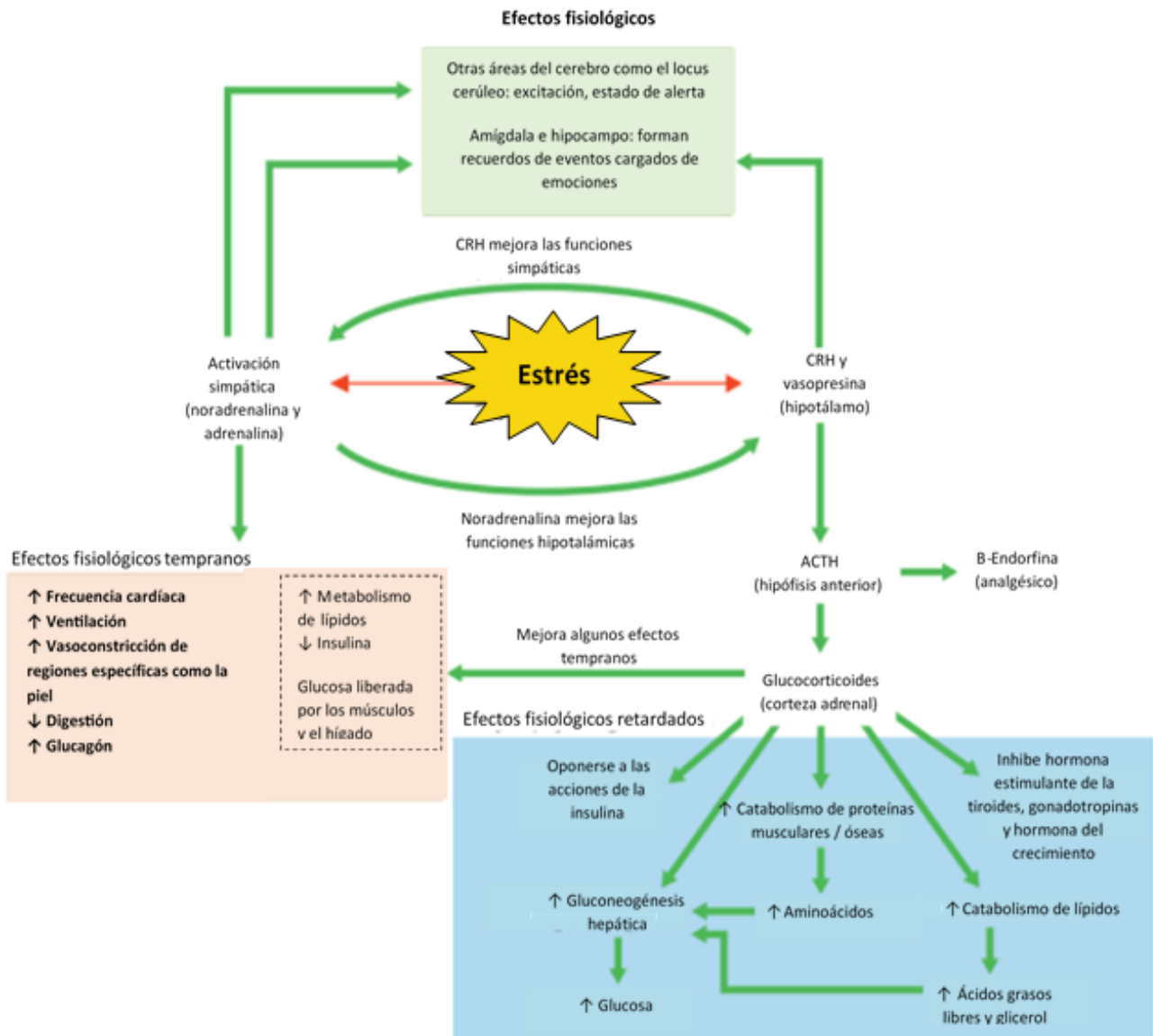


Imagen 4. La respuesta al estrés de los mamíferos incluye la activación tanto del sistema nervioso simpático como del eje HPA. (Tomada y traducida del libro *Animal Physiology*. Hill, 2016).

El segundo sistema involucrado es el eje HPA que requiere la interpretación de información por parte de estructuras supraespinales. Este se encarga de la respuesta neurohormonal, para incrementar la producción y la liberación de glucocorticoides. A nivel hipotalámico, las neuronas del núcleo paraventricular poseen axones que se proyectan a la capa externa de la eminencia media del hipotálamo, lugar de secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de la vasopresina (AVP), que tiene efectos potenciadores de la acción de CRH. Estas sustancias se transportan por los vasos porta hipotálamo-hipofisarios hasta la hipófisis anterior, donde estimulan a las células corticotropas, para la síntesis de la hormona adenocorticotropa (ACTH), que a su vez tiene como órgano diana la corteza de la glándula adrenal, más específicamente las porciones fasciculada y reticular. En dichas porciones la ACTH promueve la secreción al torrente sanguíneo de glucocorticoides -como el cortisol-, y de mineralocorticoides (aldosterona) en menor medida provenientes de la glándula adrenal, los cuales ejercen un efecto fisiológico retardado (Gómez, 2002; Rodríguez-Fernández, 2013) (Imagen 4).

Una vez secretados por la corteza adrenal, los glucocorticoides ejercen efectos fisiológicos, estos refuerzan las acciones del sistema nervioso simpático, inhiben la secreción de gonadotropinas, tirotrópina y hormona del crecimiento. Tienen efectos metabólicos que facilitan la liberación de fuentes de energía, incentivan el catabolismo de proteínas en músculos y huesos, estimulan el catabolismo de lípidos (fuente de energía alternativa), estimulan la producción de glucosa en el hígado (gluconeogénesis) que se libera al torrente sanguíneo, se oponen (al igual que las catecolaminas) a la acción de la insulina para asegurar la disponibilidad de energía disponible (glucosa). Los aminoácidos liberados también son utilizados para la reparación de tejidos (Hill, 2016).

Es posible determinar el aumento en la concentración de glucocorticoides, como el cortisol circulante en sangre cinco minutos después de presentarse el estímulo estresante, debido a que esta hormona debe producirse a partir de precursores, durante los próximos minutos (> 5 minutos). De tal manera que se observará el aumento de concentración, para llegar a su punto más alto (30 - 40 minutos). Posteriormente inicia la disminución de cortisol en circulación debido a la retroalimentación negativa que ejercen en células del hipotálamo e hipófisis anterior, al disminuir la concentración de ACTH la corteza adrenal secreta menores cantidades de glucocorticoides (cortisol) y las concentraciones en la sangre vuelven a niveles basales entre 60 y 90 minutos (Hill, 2016; Sheriff *et al.*, 2011) (Imagen 5).

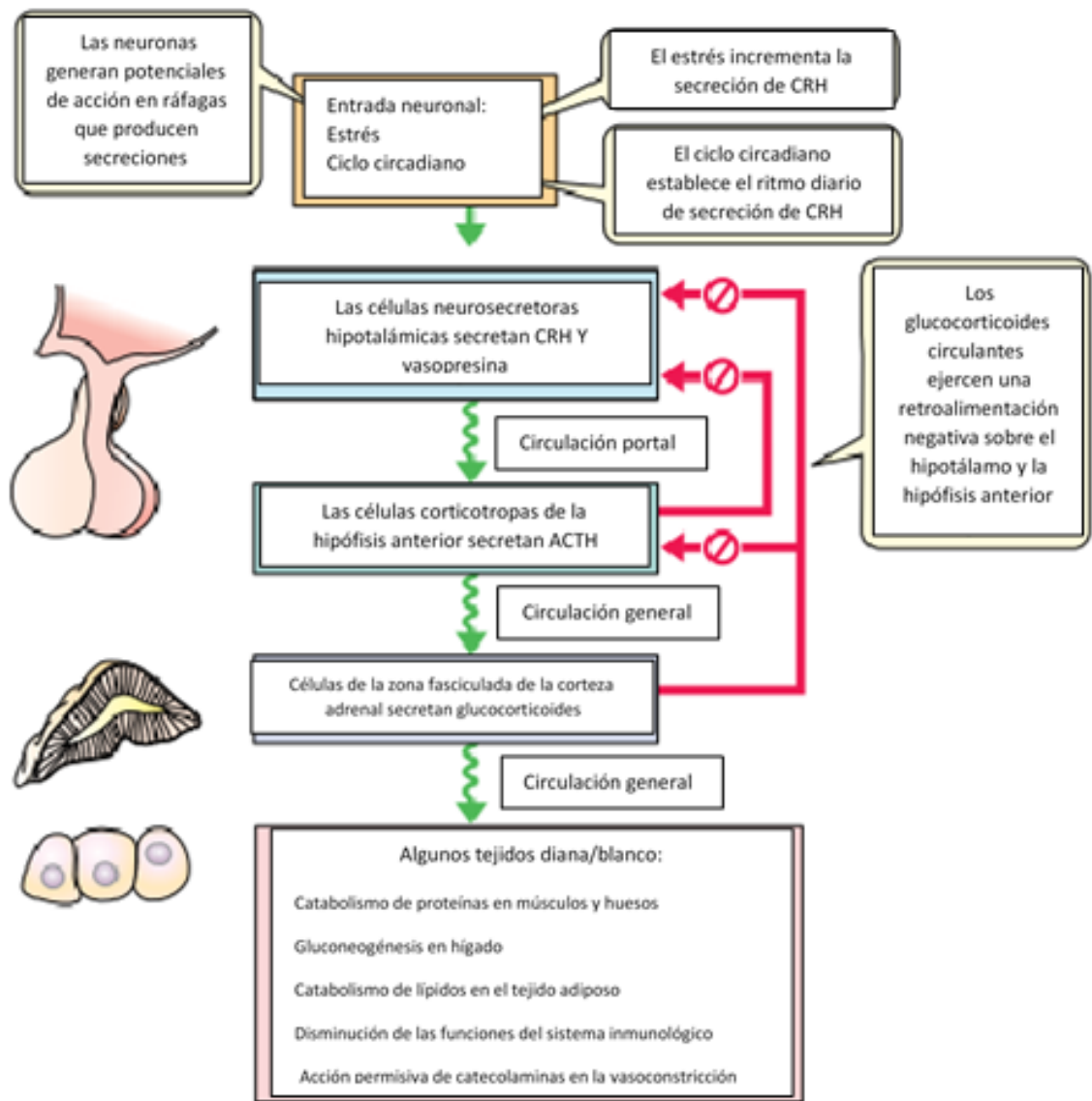


Imagen 5. Mecanismos hormonales, neurales y de retroalimentación en presencia de uno o más factores estresantes (Tomada y traducida del libro *Animal Physiology*, Hill, 2016).

Durante los primeros minutos de la respuesta al estrés, las catecolaminas y los glucocorticoides (en concentraciones bajas) estimulan el sistema inmunológico, favoreciendo la inflamación ante una infección o una herida. Conforme la respuesta al estrés avanza la concentración de glucocorticoides circulantes aumenta. Este incremento inhibe la producción de agentes inflamatorios (prostaglandinas), produciendo un efecto antiinflamatorio contrario al inicial. Al reprimir la inflamación,

modulan la respuesta inmune evitando reacciones exageradamente y dañe las células y tejidos sanos (Hill, 2016; Pilnik, 2010).

Efectos del estrés crónico

Las respuestas efectuadas por el organismo ante un factor de estrés agudo (corta duración) conducen a la adaptación momentánea y contribuyen positivamente a la supervivencia del organismo. Sin embargo, una exposición prolongada, frecuente o repetitiva a factores estresantes puede inducir una respuesta crónica, también conocida como “estrés crónico”. Este estado genera desgaste en los sistemas alostáticos. La exposición prolongada a glucocorticoides, periodos inexistentes de recuperación, así como la respuesta inadecuada de los sistemas de respuesta, dan lugar a lo que se conoce como “carga alostática”. Es decir los costos energéticos acumulados asociados con la respuesta al estrés crónico, pueden contribuir a la disfunción fisiológica y aumentar la probabilidad de enfermedades (Turnbull y Cowan, 1998; Gould *et al.*, 1998; Pilnik, 2010; Atkinson *et al.*, 2015; Hill, 2016).

La exposición prolongada a glucocorticoides (Cortisol) también da lugar a condiciones patológicas. En el sistema nervioso central las altas concentraciones de cortisol pueden provocar la atrofia de las células en el hipocampo, e incluso en el encogimiento del mismo; esto puede dañar áreas que son especialmente importantes para el aprendizaje y la memoria. Las acciones catabólicas de los glucocorticoides generan atrofia muscular y adelgazamiento de los huesos. La modulación del sistema inmunológico provoca susceptibilidad a infecciones y enfermedades. La secreción continúa de cortisol suprime las funciones reproductivas. El incremento de la actividad simpática de la adrenalina y el cortisol

inducen un aumento en la resistencia a la insulina y en la glucogénesis, lo cual aumenta el riesgo de desarrollar síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Gould *et al.*, 1998; Pilnik, 2010; Hill, 2016; De Nicola, 2015).

La sensibilidad y respuesta en los órganos o tejidos afectados por la exposición prolongada no es uniforme. Existe variabilidad en la magnitud como en la especificidad de la acción, esto es mediado por la proporción de cortisol que es retenido en cada célula. La variabilidad no sólo difiere entre los tejidos del mismo individuo sino también entre individuos (Oakley, 2010).

Biomarcadores de estrés

Existen gran cantidad de parámetros propuestos para evaluar la capacidad de respuesta de un organismo ante factores estresantes, dentro de estos sobresalen los biomarcadores, los cuales tienen características bioquímicas o fisiológicas, que son cuantificables, logrando identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien la respuesta a un evento. Dentro de ellos encontramos la determinación de cortisol y progesterona, las concentraciones de albúmina plasmática, urea, globulina, proteínas totales, la actividad de creatinfosfoquinasa, β -hidroxibutirato, haptoglobina, fibrinógeno, el volumen celular acumulado y el conteo de leucocitos (Romero *et al.*, 2011; Torres Courchoud, 2016).

La determinación de cortisol ha sido propuesta para evaluar la respuesta de un organismo a eventos estresantes, especialmente cuando se comparan valores previos y posteriores a determinado manejo o actividad. En el caso de que una actividad represente ser un evento estresante provocaría el aumento en la concentración de cortisol, reflejando la respuesta de los sistemas alostáticos del organismo (Brousset *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2011)

Cortisol

Es un glucocorticoide que pertenece a las hormonas esteroideas, el cual es predominante en los cetáceos (St. Aubin y Dierauf, 2001), tiene por lo menos dos modos de acción en el organismo: el primero está asociado con la coordinación de los ritmos circadianos (consumo de alimento y sueño), y el segundo se relaciona con procesos biológicos y de respuesta al estrés. Su secreción en condiciones normales es regulada por mecanismos de retroalimentación negativa ejercidos por el mismo cortisol y por el ritmo circadiano. La secreción de esta hormona está ligada a los hábitos del organismo. Se ha reportado que los mamíferos terrestres diurnos aumentan los niveles de cortisol antes del amanecer y disminuyen en el atardecer, mientras que los animales nocturnos muestran el patrón opuesto. (Brousset *et al.*, 2005; Rodríguez-Fernández, 2013). En condiciones de cautiverio, la concentración de cortisol se encuentra generalmente en un intervalo de 0.3 - 1 µg/dL en delfines *Tursiops aduncus* y de 0.1 - 0.28 µg/dL en las orcas (*Orcinus orca*) mostrando ambos animales hábitos diurnos (Suzuki, 2003).

Como lo mencioné, el cortisol es esencial porque afecta muchos procesos biológicos, como la función del sistema inmune, el crecimiento del esqueleto, la reproducción, la cognición y el comportamiento, incluyendo la respuesta ante el estrés (Brandan, 2014).

La respuesta al estrés ayuda a mantener la homeostasis en el organismo, afectando a casi todos los órganos y tejidos del cuerpo, el organismo reduce la actividad de los sistemas y procesos con mayor gasto energético; tales como el crecimiento, el sistema inmunológico y el digestivo (Glaser, 2005; Selye, 1950).

Contrario a la percepción popular, no todos los aspectos del estrés son negativos, recordemos que pequeñas elevaciones en las concentraciones de cortisol funcionan como un mecanismo para la supervivencia animal y lo prepara para tener respuestas adaptativas (Hing *et al.*, 2014), St. Aubin y Dierauf (2001) sugieren que estas pequeñas elevaciones podrían ser saludables. En este sentido, el estrés agudo actuaría en favor de los procesos de aprendizaje, al generar recuerdos (Zárate *et al.*, 2014).

A pesar de que pequeñas elevaciones mejoran el desempeño del individuo, es evidente que la exposición constante a estímulos estresantes y concentraciones elevadas de cortisol tienen efecto negativo, induciendo la posible situación de estrés crónico, afectando a los organismos de diferentes maneras, manifestándose en el deterioro en la salud o la muerte (Cowan, 2000; Hing *et al.*, 2014).

A pesar de su variabilidad y vida media corta (60-90 minutos), el cortisol es uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar el estrés experimentado por animales, debido a que se encuentran aumentos en procesos de estrés agudo mostrando variaciones antes y después del evento estresante. Podemos analizar la concentración de cortisol en diferentes muestras biológicas, como son la sangre, heces, orina, saliva, entre otras (Romero *et al.*, 2011).

Sin embargo, el análisis del cortisol se puede dificultar debido a que cada muestra presenta ventajas y desventajas (Cuadro1). De las ventajas más importantes de analizar cortisol en sangre es la concentración, aumentando en minutos y permaneciendo en sangre por un periodo de 60-90 minutos, se puede cuantificar de manera directa con distintas técnicas, la principal desventaja es la obtención de la muestra, la cual es invasiva. En el caso de la orina y heces la

principal ventaja es que la obtención de la muestra no es invasiva, sin embargo una de las grandes desventajas es la inconsistencia en el volumen, las muestras se pueden contaminar y se ven afectadas por el comportamiento del organismo. (Brousset *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Ventajas y desventajas en diferentes muestras para la determinación de cortisol (Romero et al., 2011).

Muestra	Ventajas	Desventajas
Sangre	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La concentración de cortisol aumenta en minutos. ✓ Permanece en sangre entre 60-90 minutos antes regresar a su nivel basal. ✓ La matriz más usada en estudios de bienestar animal. ✓ Determinación directa de cortisol. ✓ Se puede cuantificar por distintas técnicas (ELISA y RIA). 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Es Invasivo. ✗ Se puede presentar un aumento de cortisol por un manejo inadecuado.
Saliva	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No invasivo. ✓ El cortisol se encuentra de forma libre. ✓ Mayor uso en ovinos y caprinos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Manipulación excesiva del ejemplar, si no se cuenta con condicionamiento operante ✗ Problemas de contaminación por alimento o por el medio en el que se encuentre el animal, durante la colecta.
Orina	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No invasivo. ✓ Permite cuantificar catecolaminas y sus metabolitos. ✓ Mayor uso en porcinos y ovinos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Se encuentra en menor. concentración que en sangre. ✗ Es metabolizada antes de su secreción. ✗ Existe un retraso entre la liberación del cortisol y su excreción. ✗ La muestra puede contaminarse. ✗ El volumen de muestra no es constante. ✗ La excreción de orina puede ser a lo largo del día.
Heces	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No invasivo. ✓ Uso en animales de fauna silvestre. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Existe un retraso entre la liberación del cortisol y su excreción. ✗ Es metabolizada antes de su secreción. ✗ Volumen de las heces y el tránsito intestinal varía entre individuos. ✗ Las concentraciones son afectadas por fluctuaciones diurnas. ✗ Validar la técnica por especie y sexo. ✗ La excreción de heces puede ser a lo largo del día.

Técnicas para determinación hormonal

Con la finalidad de poder cuantificar la concentración hormonal en sangre, se han desarrollado distintas técnicas, como el radioinmunoensayo (RIA), el inmunoensayo quimioluminiscente, el inmunoensayo de fluorescencia con resolución temporal, el inmunoensayo de polarización fluorescente y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Sin embargo, las técnicas más empleadas para diagnóstico clínico son las de RIA y ELISA (Franco & Uribe, 2012).

Existen diferencias entre estos dos ensayos; por una parte, los reactivos enzimáticos marcados empleados en ELISA son menos costosos, de fácil preparación y estables, en comparación con los radioisótopos que emplea el RIA. Por otro lado, el equipo que se emplea en el ELISA es más accesible y los resultados obtenidos mediante ELISA son relativamente más rápidos, pero con menor sensibilidad. La principal ventaja que tiene la técnica de ELISA sobre la de RIA, son los bajos costos al emplearla, la versatilidad de la técnica reduce el riesgo de contaminación aumentando la seguridad del personal, no requiere permisos especiales para el manejo y almacenamiento de reactivos y se puede implementar con facilidad en aquellos laboratorios que así lo deseen. En ambos casos se requiere que los ensayos posean alta precisión, repetibilidad y sensibilidad (Beuvery *et al.*, 1984; Franco, 2012).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El inmunoensayo enzimático, conocido como ELISA fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman. Se considera como una de las técnicas inmunoquímicas más poderosas, ya que permite la rápida cuantificación de diferentes antígenos y anticuerpos en bajas concentraciones dentro de una mezcla. Además, tiene elevada

sensibilidad y nos proporciona información cuantificable referente al analito que se analiza que sería difícil determinar por otras técnicas (Thomas *et al.*, 2014).

El término ELISA se usa generalmente para cualquier inmunoensayo a base de enzimas que actúan sobre un sustrato para revelar la reacción antígeno-anticuerpo. Los sustratos pueden emitir coloración, quimioluminiscencia o fluorescencia. Existen diferentes sistemas, todos basados en anticuerpos, antígenos, y conjugados enzimáticos, los cuales reaccionan con los sustratos (Wild, 2013).

Un ensayo ELISA ideal desarrollado en un laboratorio debe cumplir con las siguientes características (Davies, 2013):

- a) Sensibilidad: el método debe ser capaz de medir el analito en concentración suficientemente baja para su uso.
- b) Especificidad: debe tener reactividad cruzada baja a moléculas estructuralmente similares al analito que puedan estar presentes en las muestras.
- c) Simplicidad: debe ser fácil de realizar y dar resultados rápidos.
- d) Seguridad: los componentes de los reactivos utilizados no deben ser perjudiciales para la salud.

ELISA competitivo

El ensayo de ELISA competitivo está diseñado para generar la competencia entre dos tipos de antígenos, el conjugado o reportero y el presente en la muestra, o el estándar en el caso de la curva estándar, los cuales compiten para unirse con los anticuerpos de captura, que en caso de los ensayos de fase sólida fueron previamente fijados a una placa. Finalizada la competencia, se retiran los componentes que no hayan reaccionado y se agrega el sustrato, el cual se unirá de

manera específica con el antígeno conjugado, dando como resultado una señal colorimétrica. La señal colorimétrica es inversamente proporcional a la concentración de antígeno (muestra) que queremos determinar. Por lo tanto, cuanto mayor sea la concentración de antígeno en la muestra a determinar, menos antígeno marcado se unirá a los anticuerpos de captura y será menor la intensidad de la señal. Este tipo de ensayo es muy útil para determinar la concentración del antígeno deseado en mezclas complejas, asumiendo (gracias a las pruebas de selectividad) que en la muestra solamente el analito es capaz de desplazar al antígeno conjugado (Thomas *et al.*, 2014).

Justificación

La tonina es una de las especies más populares de los acuarios o zoológicos, son principalmente ejemplares costeros de poblaciones del Noroeste del Atlántico y del Golfo de México (AMMPA, 2011), debido a que son vulnerables a captura por pesca incidental o son cazados de manera ilegal. Algunos autores sugieren que la tonina induce una reacción positiva en muchas personas; debido a estas características se encuentran en constante interacción con seres humanos. Estas interacciones pueden ser con los entrenadores, veterinarios, investigadores o miembros del público. Con estos últimos se desarrollan diferentes tipos de actividades, la principal son los programas de nado interactivo, en los cuales las toninas interactúan de manera directa y sin ninguna barrera física con el público. Existen otras actividades que las toninas también pueden realizar, y que implican contacto directo con los humanos, como son encuentros donde se les acaricia y donde se les alimenta al delfín (Curtin, 2007; Breusing *et al.*, 2005). También existe la terapia asistida por delfines, la cual es respaldada por diversos estudios que confirman los efectos psicológicos positivos para la gente, al realizar esta actividad (Stephan *et al.*, 1981; Cochrane y Callen, 1992; DeMares y Krycka, 1998; Webb y Drummond, 2001).

Los delfines que se encuentran en los acuarios o zoológicos están expuestos a cambios en el ambiente, tanto físico como social, los cuales pueden ser factores o estímulos que desencadenen respuestas de estrés (Curry, 1999; Luna *et al.*, 2012).

La mayoría de los cambios o estímulos causantes de estrés pueden estar relacionados con el diseño de los encierros, las estructuras sociales modificadas por los humanos, y los cambios en su alimentación. Todos estos cambios en algunas ocasiones pueden tener repercusiones psicológicas y fisiológicas que pueden impactar negativamente el bienestar animal (Brando *et al.*, 2017; Curry, 1999; Luna *et al.*, 2012).

Cuando el organismo se encuentra expuesto a un estímulo desfavorable, constante y prolongado, se puede inducir a la situación de estrés crónico, lo cual puede causar problemas de crecimiento, en las funciones reproductivas y de inmunosupresión, volviendo a los animales susceptibles a patologías que pueden acrecentarse con el tiempo (Curry, 1999). La inmunosupresión es a menudo la mayor amenaza de la exposición al estrés crónico en los cetáceos (St. Aubin y Dierauf, 2001).

En muchos de los casos, la primera respuesta del organismo ante el estímulo estresante es de comportamiento, en donde el individuo evade al estresor simplemente alejándose. Sin embargo, cuando la opción de evadir el estímulo se ve limitada por el confinamiento es inasequible, esto genera la respuesta fisiológica al estrés (Moberg y Mench, 2000).

Debido a que los delfines en cautiverio se encuentran expuestos constantemente a los programas de nado interactivo y limitados al confinamiento, es importante evaluar si dicho estímulo induce situaciones estresantes en los animales para lo cual se requiere realizar monitoreos de las concentraciones de cortisol mediante muestras repetidas, con la finalidad de generar información suficiente para establecer si los programas de nado interactivo podría considerarse

como un estímulo desfavorable (generador de estrés), o contrariamente puede verse como el enriquecimiento positivo para los delfines cautivos, debido a que fomenta la interacción social, las capacidades cognitivas, el juego y la curiosidad, lo que incrementa la posibilidad de mejorar su bienestar (Claxton, 2011).

Objetivo general

Determinar los niveles de cortisol en *Tursiops truncatus* asociados al programa de nado interactivo de los parques *Dolphin Discovery*.

Objetivo particular

Determinar, a través de mediciones de cortisol repetidas en días alternos, si la actividad de nado interactivo con humanos llevada a cabo en los parques de Dolphin Discovery es factor estresante para las *toninas* involucradas.

Hipótesis

Hipótesis nula (H₀): Los niveles de cortisol en *Tursiops truncatus* sometidos a nado interactivo con humanos no difieren de los de los organismos que no son sometidos a dicha actividad, ya que la actividad no representa un factor estresante.

Hipótesis alternativa (H_a): Los niveles de cortisol en *Tursiops truncatus* sometidos a nado interactivo con humanos son mayores a los de los organismos que no son sometidos a dicha actividad, debido a que la actividad es un factor estresante.

Hipótesis particulares

H₀: El nado interactivo con humanos no incrementa las concentraciones de cortisol en delfines sometidos a dicha actividad.

Ha: El nado interactivo con humanos incrementa las concentraciones de cortisol en delfines sometidos a dicha actividad.

Desarrollo de ensayo de ELISA para las determinaciones de cortisol

Previo a llevar a cabo el presente trabajo se hizo el desarrollo, estandarización y validación de una técnica de ELISA competitiva, con anticuerpos policlonales, para la determinación de cortisol en delfines, a continuación se detallara la metodología que se empleó y los resultados obtenidos.

- Producción de anticuerpos

Para la producción de los anticuerpos policlonales -IgG contra cortisol- se inmunizaron tres conejos hembras de la raza *Nueva Zelanda (Oryctolagus cuniculus)*, de cinco meses de edad, con peso aproximado de tres kg cada una, las cuales fueron identificadas con números del uno al tres.

El antígeno utilizado fue cortisol 3 - (0-carboximetil) oxima - BSA (Q 3889 000, Steraloids Inc.), en una concentración de 1 µg/333 µL por inmunización, mezclado con 250 µL adyuvante de TiterMax Gold (T2684, Sigma Aldrich).

Se siguió un cronograma quincenal de inmunización (Cuadro 2), se realizaron ocho aplicaciones por vía subcutánea, a lo largo de la región torácica-lumbar de la columna vertebral. El inmunógeno se dividió en tres diferentes sitios; procurando suficiente distancia entre ellos para de evitar la fusión de la respuesta inflamatoria según lo estipulado en el manual de Gourdon (2003).

Se tomaron muestras sanguíneas previas a cada inmunización, con la intención de obtener el suero, para la titulación de los anticuerpos. La colección de estas muestras se realizó siguiendo las "*Pautas para la extracción de sangre: roedores y conejos*", las cuales sugieren realizar la toma a partir de la arteria central de la oreja, puesto que permite coleccionar volúmenes grandes en repetidas ocasiones,

es de fácil acceso y no requiere el uso de anestésicos (The University of Toledo, 2011). El procesamiento de las muestras consistió en centrifugarlas a 1310 xg durante un periodo de 15 minutos. El suero obtenido fue almacenado en microtubos y se conservó a -5 °C hasta su análisis.

Cuadro 2. Cronograma de inmunizaciones y titulaciones.

Fecha	Día	Actividades
15/11/17		Resguardo de Conejos
15/12/17	1	Toma de Muestra basal, 1 ^a inmunización
29/12/17	15	Toma de primera muestra, 2 ^a inmunización
12/01/18	29	Toma de segunda muestra, 3 ^a inmunización
26/01/18	43	Toma de tercera muestra, 4 ^a inmunización
09/02/18	57	Toma de cuarta muestra, 5 ^a inmunización
23/02/19	71	Toma de quinta muestra, 6 ^a inmunización
06/03/18	82	Titulación de anticuerpos
09/03/18	85	Toma de sexta muestra, 7 ^a inmunización
23/03/18	99	Toma de séptima muestra, 8 ^a inmunización
26/03/18	102	Titulación de anticuerpos
30/03/18	106	Obtención del volumen sanguíneo total de los conejos (1,2,3)
16/04/18	123	Titulación final de los anticuerpos

- Titulación de anticuerpos contra cortisol

Para evaluar los títulos de los anticuerpos se realizó un ELISA indirecto. En una placa de 96 pozos (Maxisorp) se fijó el antígeno (cortisol, Q 3889 000, Steraloids Inc) a una concentración de 0.5 µg/pozo -el cual fue diluido en 50 µL de solución de carbonatos-, con excepción de los pozos destinados a las uniones no específicas (UNE), a los cuales solo se les agregaron 50 µL de solución de carbonatos. La placa

se incubó durante 18 horas a una temperatura de 4 °C. Al finalizar la incubación se realizaron cuatro lavados a la placa con 100 µL/pozo de solución de lavado y se procedió a secar el pozo. Posteriormente, se colocaron 50 µL/pozo de los sueros a evaluar, considerando dos réplicas por muestra. La placa se incubó a 37 °C por el periodo de dos horas, y se hizo el segundo lavado igual al descrito previamente. Posteriormente, se realizó la dilución de 1:10 000 del conjugado (proteína G peroxidada, Bio-rad No. catálogo 170-6425) con solución de fosfatos salinos, para agregar 50 µL a cada pozo e incubar la placa, nuevamente, durante dos horas a 37°C. Al término de la incubación se realizó un tercer lavado (Igual a los anteriores). Finalmente se adicionaron 100 µL de sustrato por pozo. Para la preparación del sustrato se utilizaron 12.5 mL de solución de citratos, 125 µL de TMB/DMSO (Sigma-Aldrich, No. catálogo 54827-17-7), previamente preparado, y 2.5 µL de peróxido de hidrogeno al 30% (Sigma-Aldrich, No. Catálogo 7722-84-1), por placa. La placa se incubó a 37 °C por 15 minutos. Para detener la reacción se agregaron 50 µL de ácido sulfúrico a cada pozo. Una vez detenida la reacción se realizó la lectura de la placa en un lector de ELISA en la longitud de onda de 450 nm.

- Obtención del volumen sanguíneo total (Sangrado a blanco)

Una vez finalizado el calendario de inmunizaciones y con los resultados de la titulación de los anticuerpos, los cuales mostraron la densidad óptica mayor a 1.0, todos los conejos fueron sangrados a blanco por punción cardiaca y sacrificio de los animales, con el propósito de obtener el mayor volumen posible de sangre. Este procedimiento cumplió con lo estipulado en Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999, en la cual se determinan las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062). La sangre fue colectada en tubos

de 50 mL, los cuales se centrifugaron a 5734 g por un periodo de 30 minutos, a 4 °C (Luna *et al.*, 2012). El suero fue colectado y se conservó en tubos de 5 mL etiquetados con el número del animal correspondiente y se almacenaron a -5 °C hasta su purificación.

- Resultados de la producción de anticuerpos

Durante esta etapa del desarrollo de la técnica se logró la producción de anticuerpos policlonales útiles para la determinación de cortisol. En donde observamos la respuesta progresiva al antígeno (Gráfico 1) alcanzando títulos de anticuerpos superiores a 2.0 densidades ópticas después de la segunda muestra. Sin embargo, se observó la disminución en los títulos, por lo que se decidió seguir inmunizando hasta volver a obtener títulos superiores a 2.0 densidades ópticas. Posterior a la octava inmunización en los tres individuos se realizó un sangrado a blanco por punción cardíaca y sacrificio de los animales, para poder obtener la mayor cantidad de suero posible.

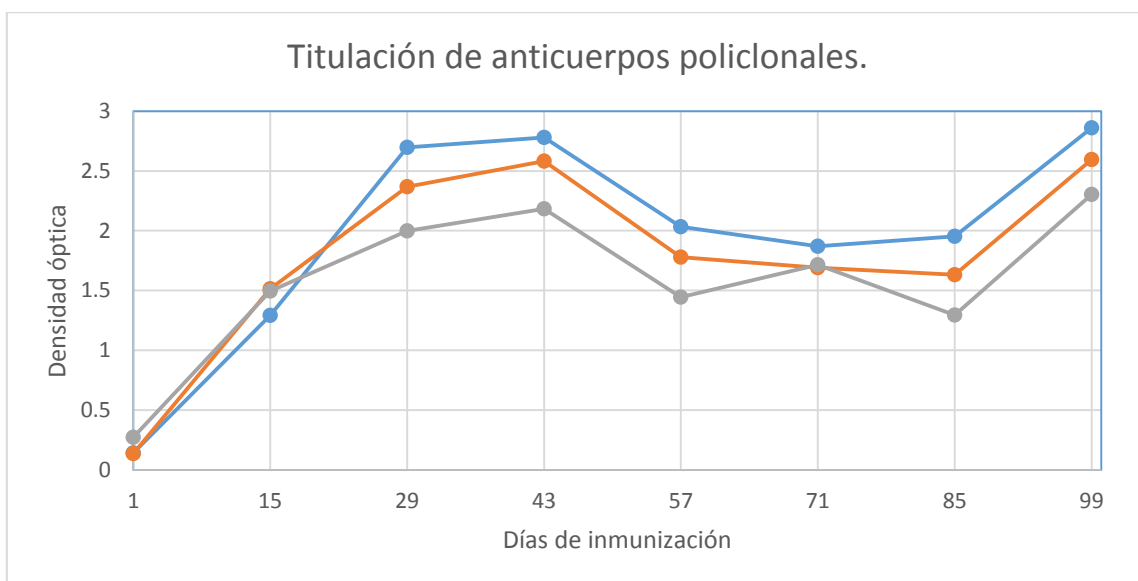


Gráfico 1. Titulación de los anticuerpos policlonales contra cortisol. En el eje de las X se observa en forma cronológica el aumento de la densidad óptica correspondiente al incremento de anticuerpos en las muestras sanguíneas de cada individuo (conejo 1 ●, conejo 2 ● y conejo 3 ●) las cuales se colectaron de acuerdo al

cuadro 2, (Día 1) suero Pre inmune, colectado antes de la primera inmunización, (Día 15) suero colectado 15 días después de la primera inmunización, y sucesivamente hasta la última inmunización (Día 99).

- Purificación de los anticuerpos

Para la purificación de los anticuerpos se utilizó el protocolo modificado de Sigma Aldrich “*Purificación de anticuerpos usando Proteína A, Proteína G o Proteína L Agarosa*” (Sigma Aldrich, 2018). En dicho protocolo se sugiere el uso de Proteína A-Sefarosa (Thermo Fisher, No. Catálogo 20333), debido a que ésta presenta mayor afinidad a la fracción cristalizable a las Inmunoglobulinas G (IgG) de conejos.

La proteína A-Sefarosa (0.75g) se hidrató con 20 mL de etanol 20%, conjuntamente se preparó la columna en una jeringa de 10 mL, a la que se le agregó una llave de paso al pivote, lo cual consistió en retirar el embolo de la jeringa e introducir y presionar una pequeña cantidad de fibra sintética (1 cm de espesor) al fondo de la columna, con la finalidad de evitar que la sefarosa se fugue de la misma. La sefarosa ya hidratada se adicionó con una pipeta de Pasteur, permitiendo que el exceso de etanol se drene lentamente. Posteriormente se lavó la columna con 20 mL de PBS para equilibrarla, y después se cerró la llave para dejar la columna hidratada con PBS, hasta su utilización.

En las columnas previamente preparadas, se colocaron los sueros de los animales inmunizados para separar los anticuerpos, cada suero fue trabajado de manera individual. Para ello, el suero fue diluido en una concentración de 1:5 con PBS (1 mL de suero más 4 mL de PBS), a continuación, la dilución se filtró con ayuda de un filtro de jeringa con tamaño de poro de 0.45 µm. La muestra fue filtrada tres veces por la columna; la fracción no unida (es decir, el líquido eluido de la

columna) fue colectado y se resguardó para, de ser necesario, el futuro reprocesamiento. Posteriormente, se agregaron 10 mL de PBS para eliminar los componentes del suero que pudieron quedar retenidos en la columna. Una vez eluido todo el suero de la columna se agregaron 10 mL de glicina (Sigma-Aldrich, No. Catálogo 56-40-6; 0.1 M, pH 2.5), con el cambio de pH se provoca la desunión a la sefarosa, y por ende, la captación de los anticuerpos purificados en las 10 fracciones colectadas en placas de 24 pozos Costar® de poliestireno de baja retención. Las muestras colectadas de cada fracción fueron cuantificadas por espectrofotometría con una longitud de onda de 280 nm, para seleccionar las fracciones con mayor concentración de proteínas. Dichas fracciones fueron colocadas dentro de una membrana (Spectra/POR) previamente hidratada, formando cápsulas que se sumergieron dentro de un vaso de precipitado con PBS (pH 7.2) para su diálisis y agitación. Se realizaron cuatro recambios de PBS con intervalos de 45 minutos, al finalizar el proceso de diálisis el contenido de las cápsulas fue colectado y nuevamente se determinó la concentración de proteínas en el espectrofotómetro. Las fracciones se identificaron con su concentración y se realizó una mezcla con las fracciones que presentaron mayor concentración, obteniendo el volumen final de 15 mL de anticuerpo policlonal contra cortisol con la concentración 4.41 mg/mL, este volumen fue almacenado a -5 °C hasta su utilización. Finalmente, la columna de purificación fue lavada con PBS, y para su conservación se agregaron 10 mL de etanol y se refrigeró.

- Estandarización del ensayo de ELISA para determinación de cortisol

El ensayo de ELISA competitivo fue estandarizado para determinar la concentración de cortisol en el suero. Para ello se sensibilizó una placa de 96 pozos

(Maxisorp®) utilizando el anticuerpo policlonal IgG contra cortisol, en la concentración de 5 µg por pozo, diluidos en 50 µL de solución de carbonatos, a excepción de los pozos seleccionados como UNE, a los cuales sólo se les agregó 50 µL de solución de carbonatos y se incubó durante 18 horas a una temperatura de 4 °C. Al finalizar la incubación se realizaron cuatro lavados a la placa con 100 µL/pozo de solución de lavado, posteriormente se agregaron 100 µL de solución de bloqueo a cada pozo, se incubó la placa a 28 °C por dos horas, y se hizo un segundo lavado, igual al descrito previamente.

Para el montaje de la placa se utilizó una placa de reservorio en la que se colocó la curva estándar, que constó de 12 concentraciones distintas de cortisol (desde 160 hasta 0.07 ng/mL). En ella también se colocaron los controles de calidad, alto y bajo, que se agregaron sin diluir. Ya en la placa del ensayo se pipetearon 50 µL de curva estándar y 50 µL de controles de calidad a los pozos correspondientes, considerando triplicados en el caso de la curva y también para los controles de calidad. Las muestras se incluyeron por duplicado. Una vez montada la placa se incubó a 28 °C por 20 minutos, con agitación de 100 rpm. En el transcurso de estos minutos se preparó el cortisol conjugado (Donado por la Dra. Coralie Munro de la Universidad de Davis) a una dilución de 1/7500, y se agregaron 50 µL de conjugado por pozo, y se incubó durante 18 horas a 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el lavado a la placa con 100 µL de solución de lavado por pozo, haciendo solamente tres repeticiones, una menos que en los lavados previos. Se agregaron 100 µL de sustrato a todos los pozos, y se dejó incubar por 25 minutos a 32 °C. Finalmente, a cada pozo se le agregaron 50 µL de ácido sulfúrico 2N (Thermo Fisher, No. Catálogo 7664-93-3), como solución de paro, con la intención de detener la reacción enzimática que evidencia la cantidad de

antígeno fijada. La lectura de la placa se realizó en el lector de ELISA (EPOCH), en una longitud de onda de 450 nm (Imagen 6).

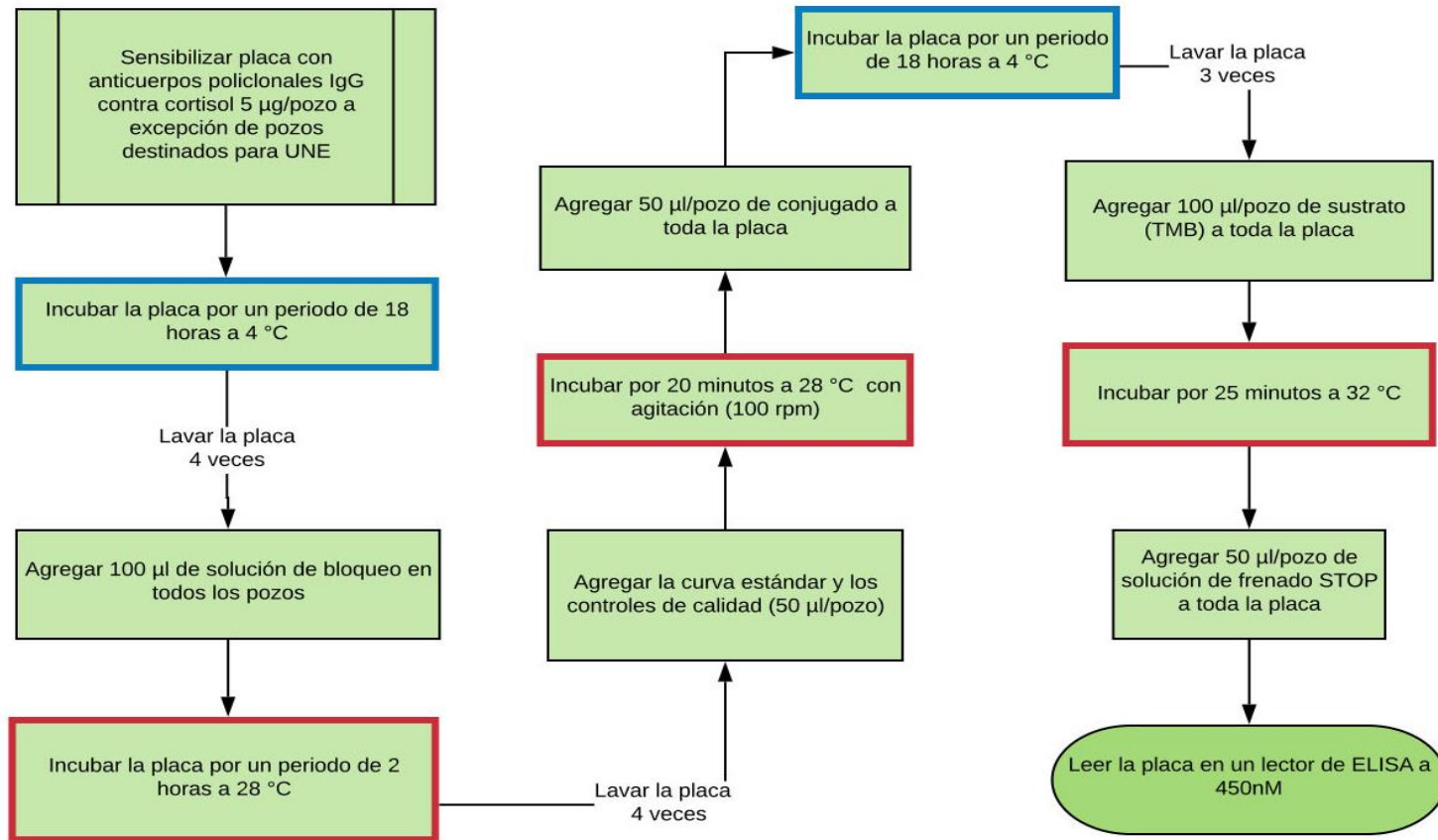


Imagen 6. Diagrama de flujo que representa el procedimiento estandarizado para el ensayo de ELISA de cortisol.

- Validación del ensayo

La validación del ensayo se realiza con el objetivo de demostrar que el método analítico desarrollado es confiable y adecuado para cuantificar la concentración de cortisol en el suero. Para ello, basándonos en la Norma Oficial Mexicana -177-SSA1-2013, se realizaron las pruebas de: selectividad, evaluación de calidad de la curva de calibración, límite de detección del método, límite de cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación y descongelación.

- Selectividad analítica

El inmunoensayo se confrontó a diferentes moléculas, las cuales comparten estructura similar al cortisol. Lo anterior con la finalidad de determinar la selectividad analítica o especificidad del anticuerpo, que consiste en el grado en el que el ensayo puede detectar el analito para el que fue desarrollado, y no otro, aún en una muestra que contenga sustancias similares.

Para realizar esta prueba se sensibilizó una placa de 96 pozos (Maxisorp®) utilizando diferentes moléculas (Cortisol, Testosterona, Estradiol y Progesterona), todas ellas en la concentración de 2 µg por pozo, diluidos en 50 µL de solución de carbonatos, a excepción de los pozos destinados como UNE, a los cuales sólo se les agregó únicamente 50 µL de solución de carbonatos. La placa se incubó durante 18 horas a la temperatura de 4 °C, y al finalizar la incubación se realizaron cuatro lavados a la placa con 100 µL/pozo de solución de lavado, posteriormente se adicionaron, a cada pozo, 2 µg del anticuerpo policlonal IgG contra cortisol, diluidos

en 50 μ L de solución de fosfatos salino; una vez agregado el anticuerpo se incubó a 30 °C por dos horas, al término de las cuales se hizo un segundo lavado, igual al descrito previamente. Posteriormente, se realizó la dilución de 1:10 000 del conjugado (proteína G peroxidada, Bio-rad No. catálogo 170-6425) con solución de fosfatos salinos, para agregar 50 μ L a cada pozo e incubar la placa, nuevamente, durante dos horas a 30 °C. Terminada la incubación se realizó el tercer lavado (Igual a los anteriores). Finalmente se adicionaron 100 μ L de sustrato (TMB) por pozo; la placa se incubó a 30 °C por 25 minutos; y para detener la reacción se agregaron 50 μ L de ácido sulfúrico a cada pozo. Una vez detenida la reacción se realizó la lectura de la placa en un lector de ELISA a 450 nm de longitud de onda.

Los resultados obtenidos de esta prueba, mostraron un porcentaje de unión del 100% para cortisol, en contraste al resto de analitos con porcentajes menores al 2% como se ve en la Gráfico 2.

Selectividad analítica de anticuerpos contra cortisol



Gráfico 2. Resultado de la especificidad de los anticuerpos anti-cortisol, mediante un ELISA indirecto, en el cual se utilizó la misma concentración de antígenos y anticuerpo por pozo (2 μg), dando como resultado densidades óptica que fueron transformadas a porcentajes.

- Evaluación de calidad de la curva de calibración

Para realizar la curva estándar se incluyen muestras del antígeno, en las que se conoce su concentración, estas se denominan estándares y con ellas se elabora la curva estándar, en la que se puede determinar el porcentaje de actividad en la fracción dependiente/actividad total contra la concentración del antígeno en los estándares. La concentración del analito en las muestras desconocidas puede entonces ser inferida a partir de la curva estándar, resultando un ensayo cuantitativo. Se seleccionaron 12 estándares entre los 160 ng/mL y los 0.07 ng/mL, cada estándar posee la mitad de concentración que su estándar inmediato superior.

Los criterios de evaluación para considerar a una curva como válida fueron que el valor absoluto del porcentaje de la desviación relativa sea menor o igual que

el 20%, en cada nivel de concentración, excepto para el nivel más bajo, ya que para este punto el valor puede ser menor o igual que el 25%. De igual forma, se consideran los valores de A, B, C, D, ED80, ED50 y ED20, que significan:

A: Valor más alto de unión (Densidades ópticas), que representa la unión máxima en la prueba.

B: Valor de la pendiente, el cual deberá ser lo más cercano a 1.0.

C: Valor lo más cercano a la unión al 50%, o valor de ED50.

D: Unión inespecífica en el ensayo, debe tener la densidad óptica lo más baja posible.

Además, se establecieron los siguientes parámetros:

- Límite de detección del método

Se determinó considerando la concentración de analito mínima detectada por el ensayo, que sea diferente de cero.

- Límite de cuantificación

Es la concentración mínima que puede ser determinada de una manera confiable y con un desempeño aceptable.

- Repetibilidad

Se define como la precisión de que, bajo las mismas condiciones de trabajo, en un periodo corto (NOM-177-SSA1-2013, 4.86), se obtengan resultados similares para las determinaciones de la hormona de estudio. En ésta se evalúan los valores correspondientes a los controles de calidad, alto y bajo (triplicado) en un mismo día y en dos ensayos diferentes.

- Reproducibilidad

Se define como la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, analistas, y/o equipos (NOM-177-SSA1- 2013, 4.87). Se analizaron por triplicado los controles alto y bajo en tres ensayos diferentes, en tres días consecutivos, pero en las mismas condiciones de trabajo. En cada ensayo se corrió la curva estándar previamente estandarizada.

- Estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación y descongelación

La estabilidad es la capacidad de un analito de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil (NOM-177-SSA1-2013). Para evaluar la estabilidad del analito bajo ciclos de congelación-descongelación, se hicieron cinco alícuotas de cada control alto y bajo y se identificaron del 1 al 5, se realizaron cinco ciclos de congelación-descongelación, en un periodo de cinco días (lunes a viernes). Para ello, el día 1 (lunes) se sacaron las alícuotas de ambos controles marcadas con el número 5 del congelador y se mantuvieron a temperatura ambiente por un periodo de una hora, y posteriormente se regresaron al congelador por 24 horas, el día 2 (martes) se sacaron las alícuotas 5 y 4 de ambos controles, así sucesivamente con las demás alícuotas se repitió el proceso anterior. Al final de la semana, en un mismo ensayo, se analizaron por triplicado las cinco alícuotas de cada control de calidad, en las mismas condiciones de trabajo que se manejaron las otras pruebas

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los parámetros de la evaluación de calidad de la curva de calibración:

- Estandarización de ELISA competitivo casero para determinación de cortisol

Para la estandarización del ensayo de cortisol se probaron distintas concentraciones de anticuerpo y diluciones de conjugado, hasta obtener las condiciones más adecuadas para su estandarización. Dando como resultado que la concentración de anticuerpo policlonal contra cortisol es de 5 µg por pozo y la dilución de conjugado de 1/7500. Con estas condiciones se observó mejor comportamiento del ensayo y mayor diferencia entre los pozos de unión máxima y los de unión no específica. Se evaluaron tres ensayos en diferentes días con los cuales se obtuvo el porcentaje de recuperación de cada punto de curva, para determinar el porcentaje de analito recuperado de la matriz por la prueba. Esto nos permite evaluar la eficiencia del ensayo para cuantificar el analito en la matriz. Se conoce la concentración de analito adicionado a la muestra y se confronta con la concentración que nos brinda el programa "AssayZap". El criterio de aceptación de esta prueba es un intervalo de 80% a 120% de recuperación, por lo cual el resultado no necesariamente es del 100% pero debe de estar dentro de dicho intervalo para que sea aceptado Cuadro 3.

Cuadro 3. Evaluación del porcentaje de recuperación en curvas estándar para la determinación de cortisol, donde \bar{x} = promedio, E = número de ensayo (E1 = ensayo 1, E2 = ensayo 2, E3 = ensayo 3), CA = criterio de aceptación establecido (80-120%). C=CUMPLE, NC= No cumple. En cada ensayo se incluyeron 9 repeticiones.

Estándar (ng/mL)	\bar{x}			% Recuperación			Resultado CA		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
160	133.58	129.51	147.25	83.48	80.94	92.03	C	C	C
80	74.21	65.81	72.25	92.76	82.27	90.31	C	C	C
40	39	40.34	42.82	97.49	100.85	107.06	C	C	C
20	21.19	22.63	21.16	105.96	113.17	105.80	C	C	C
10	8.82	8.09	8.21	88.20	80.87	82.07	C	C	C
5	4.23	5.33	5.16	84.64	106.62	103.16	C	C	C
2.5	2.23	2.43	2.09	89.27	97.20	83.69	C	C	C
1.25	1.04	1.26	2.54	83.36	101.19	203.51	C	C	NC
0.62	0.43	0.54	0.64	68.90	87.05	102.55	NC	C	C

Curva estándar

Para realizar la interpolación de datos y convertirlos de densidades ópticas a concentraciones de cortisol (ng/mL) se utilizó el programa "AssayZap", en el cual se evaluaron los resultados obtenidos de la ELISA competitiva y así poder validarla. Se utilizó la curva estándar de nueve puntos para nuestro inmunoensayo los cuales van de 160 ng/mL hasta 0.62 ng/mL de cortisol (Gráfico 3).

Los parámetros resultantes de la curva estándar en este inmunoensayo, de acuerdo con lo descrito con anterioridad, se consideran válidos, ya que encontramos los valores de A y D lo más alejados posible, el valor B de la pendiente fue de 1.0676, los valores de C y ED 50 son cercanos entre ellos, y la calidad de la curva es bastante cercana a 1.

A: 999.5000	ED 20	70.54 ng/mL
B: 1.0676	ED 50	9.09 ng/mL
C: 9.7146	ED 80	0.95 ng/mL

D: 217.1662
Calidad : 0.999860

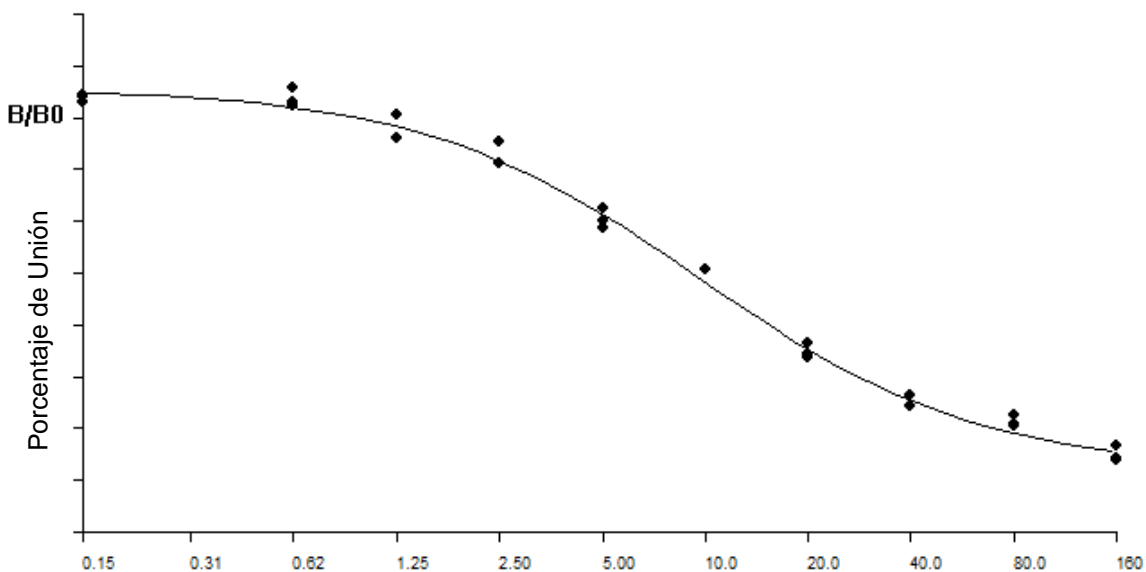


Gráfico 3. Curva estándar de cortisol con 11 concentraciones distintas (160 ng/mL - 0.15 ng/mL), en el eje de las X se muestran las diferentes concentraciones de la curva estándar, datos obtenidos con el programa "AssayZap".

Se evaluaron tres corridas analíticas (Ensayo 1 = E1, Ensayo 2 = E2 y Ensayo 3 = E3) en diferentes días, con la finalidad de observar la repetibilidad que muestra el ensayo, obteniendo los coeficientes de variación para cada punto de la curva, mostrando resultados favorables ya que casi en su totalidad los puntos de la curva cumplen con el criterio de aceptación dos de tres veces, el cual no debe ser superior al 15% como se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Evaluación de la desviación estándar en curvas para la determinación de cortisol, donde \bar{x} = promedio, E= número de ensayo, CA= criterio de aceptación establecido (<15%), C=CUMPLE, NC= No cumple. En cada ensayo se incluyeron 9 repeticiones.

Estándar (ng/ml)	\bar{x}			Desviación Estándar			CV			Resultado CA		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
160	133.5 8	129.5 1	147.2 5	9.53	8.72	0.00	7.13	6.73	0.00	C	C	C
80	74.21	65.81	72.25	8.46	7.46	2.78	11.40	11.34	3.84	C	C	C
40	39.00	40.34	42.82	2.64	2.91	2.59	6.78	7.23	6.05	C	C	C
20	21.19	22.63	21.16	2.17	2.75	0.53	10.23	12.14	2.51	C	C	C
10	8.82	8.09	8.21	0.47	0.59	0.66	5.37	7.24	8.03	C	C	C
5	4.23	5.33	5.16	0.61	0.36	0.37	14.36	6.73	7.19	C	C	C
2.5	2.23	2.43	2.09	0.18	0.30	0.44	8.24	12.43	20.91	C	C	NC
1.25	1.04	1.26	2.54	0.52	0.43	0.28	50.35	33.79	11.18	NC	NC	C
0.62	0.43	0.54	0.64	0.16	0.08	0.01	36.64	14.98	1.33	NC	C	C

Límite de detección y sensibilidad analítica

El límite de detección de este ensayo se obtuvo utilizando 10 muestras adicionadas con la concentración de 0.15 ng/mL, la concentración menor al último punto de curva estándar, obteniendo como resultado que el límite de detección es de 0.621 ng/mL; adicionalmente la sensibilidad analítica del ensayo es de 0.62 ng/mL.

Intervalo de trabajo

El presente inmunoensayo presenta un intervalo de trabajo que va desde los 160 ng/mL a 0.62 ng/mL, dentro del cual nuestro ensayo puede determinar la concentración de una muestra desconocida con una incertidumbre aceptable.

Los controles de calidad usados en este estudio corresponden a muestras de delfines en cautiverio.

- Control de calidad bajo (CCB); muestra de suero sanguíneo de delfín *Tursiops truncatus*, durante manejo de rutina, la toma de muestras fue mediante condicionamiento operante.
- Control de calidad alto (CCA); muestra de suero sanguíneo de delfín *Tursiops truncatus*, durante un manejo fuera del agua, para realizar endoscopia y diversos manejos médicos. La muestra no fue obtenida bajo condicionamiento operante voluntario.

Precisión del ensayo

- Repetibilidad

Los controles de calidad bajo y alto se analizaron por triplicado en tres ensayos diferentes (E1, E2 y E3), en días consecutivos, manteniendo las mismas condiciones de trabajo, en cada ensayo se corrió simultáneamente a los controles de calidad una curva estándar. El coeficiente de variación (CV) intraensayo obtenido para el CCB fue menor a 1.90%, mientras que para el CCA fue menor a 1.19% (Cuadro 5), cumpliendo los criterios de aceptación para esta prueba según la NOM - 177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad, la cual indica que para esta prueba el CV no debe ser mayor al 15%.

Cuadro 5. Coeficiente de variación intraensayo para determinar la respetabilidad de los control de calidad alto y bajo (CCA y CCB), donde \bar{x} = promedio, E= número de ensayo, D.E.= desviación estándar, CV= coeficientes de variación, CA= criterio de aceptación establecido (<15%). En cada ensayo se incluyeron 6 repeticiones.

	CCA			CCB		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3
\bar{x}	0.77	0.75	0.77	0.94	0.96	0.95
D.E.	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
(%) CV	1.17	1.19	1.15	1.28	1.10	1.90
Resultado CA	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

- Estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación-descongelación

Se determinó la estabilidad de la muestra ante ciclos de congelación-descongelación, con la finalidad de evaluar el efecto de eventos de congelación y descongelación, los cuales pueden afectar la determinación del analito presente en la muestra (Cuadro 6). Se realizaron cinco ciclos de congelación y descongelación en los controles de calidad (CCB y CCA), se observó que a partir del segundo ciclo de descongelación el porcentaje de recuperación en ambos casos es menor a 20%.

Cuadro 6. Estabilidad de la muestra ante cinco ciclos de congelación – descongelación (CCD) en muestras de ambos control de calidad (CCA y CCB), donde \bar{x} =promedio, D.E=desviación estándar, % R= porcentaje de recuperación. En cada ensayo se incluyeron dos repeticiones.

Muestra CCD	\bar{x}	D.E	% R
1 CCA	4.87	0.45	100
2 CCA	0.55	0.01	11.51
3 CCA	2.15	0.48	44.19
4 CCA	2.36	0.18	48.51
5 CCA	5.18	0.77	106.37
1 CCB	0.87	0.01	100
2 CCB	0.84	0.38	17.27
3 CCB	1.31	0.02	26.82
4 CCB	2.41	0.64	49.43
5 CCB	3.95	0.55	81.19

Materiales y Métodos

El estudio para la determinación de cortisol se llevó a cabo durante el mes de septiembre de 2019, en 23 ejemplares de *Tursiops truncatus* (Cuadro 7). Todos los individuos se encontraban en cautiverio, bajo las condiciones establecidas en la NOM-135-SEMARNAT-2004, referente al manejo, exhibición y manutención de mamíferos marinos. Todos ellos pertenecen a distintas colecciones de los parques *Dolphin Discovery* (Imagen 7).

Los animales se sometieron a la evaluación inicial del estado de salud, realizada por los médicos veterinarios encargados de cada locación, con la finalidad de descartar condiciones patológicas preexistentes al estudio. La evaluación incluyó el examen físico general, y el análisis de biometría hemática y química sanguínea (ver anexo 2). Las muestras sanguíneas fueron analizadas en los laboratorios de los propios parques, por los médicos veterinarios encargados. En este estudio solamente se incluyeron animales diagnosticados como clínicamente sanos (Anexo 2).

Cuadro 7. Información general de las toninas involucradas en el presente estudio. Donde los individuos controles se muestran de color gris (●), mientras los individuos correspondientes al grupo nado se muestran sin color. Fuente: Historial clínico Dolphin Discovery.

No.	Nombre del ejemplar	Sexo o género	Alojamiento o hábitat	Condición de nacimiento	Edad (años)
1	HESTIA	Hembra	Puerto Aventuras (Dreams)	Cautiverio	5
2	SOFIA	Hembra	Puerto Aventuras (Dreams)	Cautiverio	4
3	HELLEN	Hembra	Puerto Aventuras (Dreams)	Vida Libre	49
4	NOEL	Hembra	Dolphin D. Akumal	Cautiverio	10
5	XIMENA	Hembra	Dolphin D. Akumal	Cautiverio	4
6	ELENA	Hembra	Dolphin D. Akumal	Cautiverio	6
7	ISABEL	Hembra	Dolphin D. Akumal	Cautiverio	4
8	AMADEUS	Macho	Dolphin D. Maroma	Cautiverio	6
9	NALA	Hembra	Dolphin D. Maroma	Vida Libre	19
10	PAKAL	Macho	Dolphin D. Maroma	Cautiverio	12
11	HIDALGO	Macho	Dolphin D. Maroma	Cautiverio	9
12	TATICH	Macho	Puerto Aventuras	Cautiverio	17
13	CHAAC	Macho	Puerto Aventuras	Vida Libre	26
14	ATILA	Macho	Puerto Aventuras	Cautiverio	12
15	ZEUS	Macho	Puerto Aventuras	Vida Libre	24
16	DA VINCI	Macho	Isla Cozumel	Cautiverio	14
17	JUPITER	Macho	Isla Cozumel	Vida Libre	39
18	GANDHI	Macho	Isla Cozumel	Cautiverio	7
19	RAMSES	Macho	Isla Cozumel	Cautiverio	12
20	AZTECA	Hembra	Isla Mujeres	Vida Libre	29
21	MADONNA	Hembra	Isla Mujeres	Vida Libre	23
22	PICASSO	Macho	Isla Mujeres	Vida Libre	31
23	SHADIA	Hembra	Isla Mujeres	Vida Libre	49

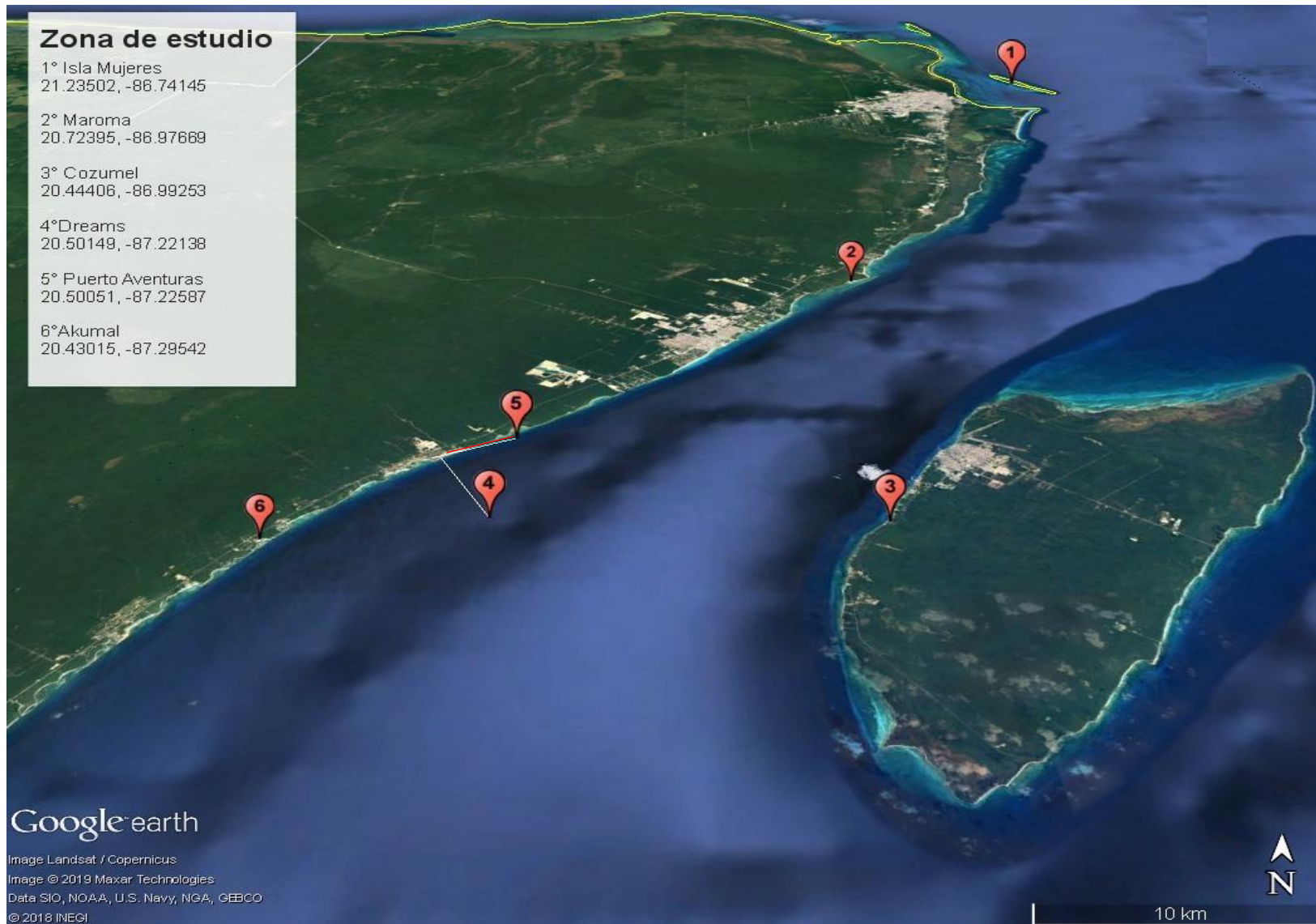


Imagen 7. Ubicación de los diferentes hábitat, Caribe Mexicano, Quintana Roo, México. Sitios de estudio: 1.- Isla Mujeres. 2.- Maroma. 3.- Cozumel. 4.- Dreams. 5.- Puerto Aventuras. 6.- Akumal. (Tomado de: Google Earth).

Las toninas involucradas en el presente estudio (Cuadro 7) fueron divididas en dos grupos:

1. **Grupo de nado:** toninas involucradas a programas de nado interactivo, los programas tuvieron una duración aproximada de 60 minutos.
2. **Grupo control:** toninas involucradas a programas de enriquecimiento únicamente con su entrenador, esto consistió exclusivamente en realizar juegos, la duración fue igual al grupo de nado.

Los programas de nado interactivo consistieron en la interacción sin ninguna barrera física entre la tonina y los turistas, con supervisión del entrenador. Durante la sesión los turistas acariciaron, alimentaron, nadaron y se fotografiaron con la tonina.

Se consideró la actividad de enriquecimiento como control debido a que en el presente estudio no se cuenta con toninas que no tengan contacto con humanos. Las toninas pertenecientes al grupo control no participaron en programas de nado interactivo, que corresponde a la variable del estudio.

Para la determinación del cortisol, fue necesario realizar la toma de muestras sanguíneas, mediante punción en la vena caudal, localizada en la parte ventral de la aleta caudal, el manejo y toma de muestras se realizó mediante condicionamiento operante. Se emplearon tubos Vacutainers sin anticoagulante y catéteres de mariposa 21G para sistema Vacutainer, las muestras se centrifugaron a 1318xg para separar el suero, el cual se almacenó en congelación (-20°C) hasta su procesamiento. La determinación de cortisol en el suero se llevó a cabo con el

ensayo de ELISA previamente desarrollado, estandarizado y validado en el Departamento de Reproducción, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. La validación del ensayo se realizó previamente dentro del mismo banco de sueros.

Para el trabajo con los animales y la toma de muestra se visitaron diferentes alojamientos (locaciones):

Zona de estudio

El estudio se realizó en seis instalaciones pertenecientes al Grupo *Dolphin Discovery*, ubicadas en el estado de Quintana Roo, México (Imagen 8).

Instalaciones	Coordenadas de latitud y longitud -Grados decimales-
1° Isla Mujeres (IM)	21.23°, -86.74°
2° Maroma (MR)	20.72°, -86.97°
3° Cozumel (CZ)	20.44°, -86.99°
4° Dreams (DR)	20.50°, -87.22°
5° Puerto Aventuras (PA)	20.50°, -87.22°
6° Akumal (AK)	20.43°, -87.29°

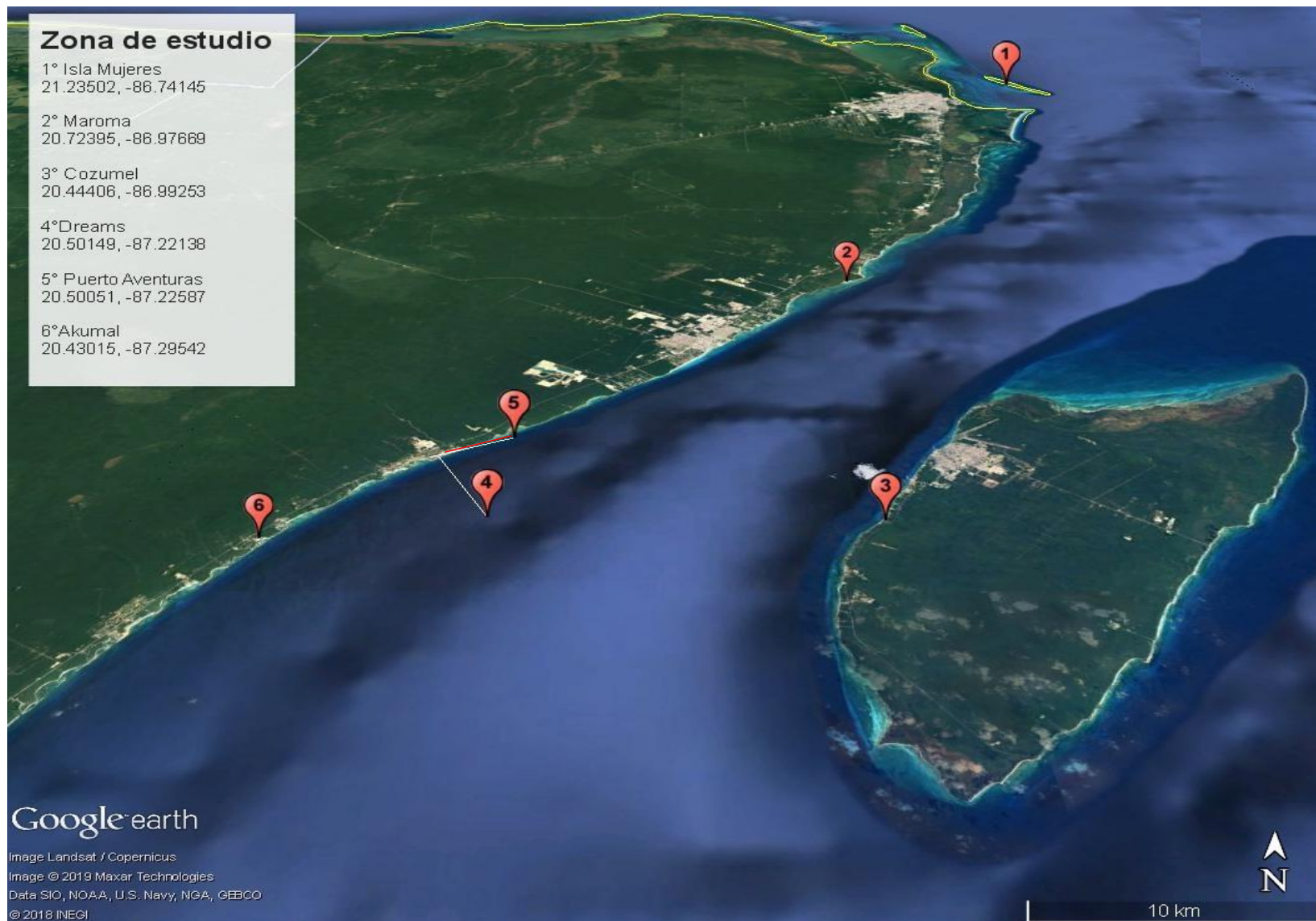


Imagen 8. Zona de estudio, Caribe Mexicano, Quintana Roo, México. Sitios de estudio: 1.- Isla Mujeres. 2.- Maroma. 3.- Cozumel. 4.- Dreams. 5.- Puerto Aventuras. 6.- Akumal. (Tomado de: Google Earth).

Animales

Por locación se seleccionaron tres individuos sometidos a programas nado interactivo (Grupo de nado), y un individuo sometido a enriquecimiento con su entrenador (Grupo control), el cual no realizó actividad de nado interactivo. Con excepción de la instalación DR en la que sólo fue posible incluir dos individuos sometidos a dicho programa y un control.

La toma de muestras en el grupo de nado consistió en realizar la primera toma previa al nado interactivo (T0), el cual tiene inicio en el horario de 09:00 h y la segunda posterior al mismo (T1) teniendo un horario de termino de 10:00 h, en el caso del grupo control se realizó antes del programa de enriquecimiento y posterior a él, el cual se llevó en el mismo periodo T0= 09:00 h y T1= 10:00 h.

Para la toma de muestras, todos los individuos del estudio contaban con condicionamiento operante para permitir el manejo de manera voluntaria, debido a lo cual se disminuye el estrés por el manejo (Brandon, 2010).

Los individuos utilizados como controles fueron retirados del programa de nado interactivo con una antelación mínima de 12 horas, previas a la toma de muestras.

Se recabó la siguiente información general de los individuos: nombre, sexo o género, hábitat, edad en años, condición de nacimiento -en cautiverio o en vida libre-; así como el estado de salud que se obtuvo en el historial clínico realizado por los médicos veterinarios de *Dolphin Discovery*, al inicio del estudio (Cuadro 7).

Colección de muestras

El manejo y la toma de muestras para el grupo de nado se llevó a cabo en el primer programa de nado interactivo del día, esto consistió en realizar la toma de muestra (T0) antes de empezar dicha actividad y sin personas (turistas) dentro del agua. Durante el transcurso del nado interactivo las muestras fueron almacenadas a temperatura controlada de 21 °C. A finalizar la actividad se realizó inmediatamente la toma de la muestra (T1) posterior al nado.

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena caudal, que se localiza en la superficie ventral de la aleta caudal. Para ello se utilizó un catéter de mariposa 21G, apto para el sistema vacutainer, y se emplearon tubos Vacutainer de 5 mL (Imagen 9).



Imagen 9. Toma de muestras de sangre de la vena caudal, con ayuda de entrenadores (Fotografía propia).

Una vez obtenidas las muestras (T0 y T1) de todos los ejemplares (4 de cada una por individuo), se realizó el procesamiento de las mismas en los laboratorios de cada locación, esto consistió en centrifugar, identificar, alícuotar y almacenar las muestras, como se describe más adelante.

La colección de muestras para el grupo control fue exactamente igual al del grupo de nado, con la única diferencia que este grupo no participó en programas de nado interactivo, los cuales fueron sustituidos por una sesión de enriquecimiento con el entrenador, teniendo la misma duración que el programa de nado interactivo.

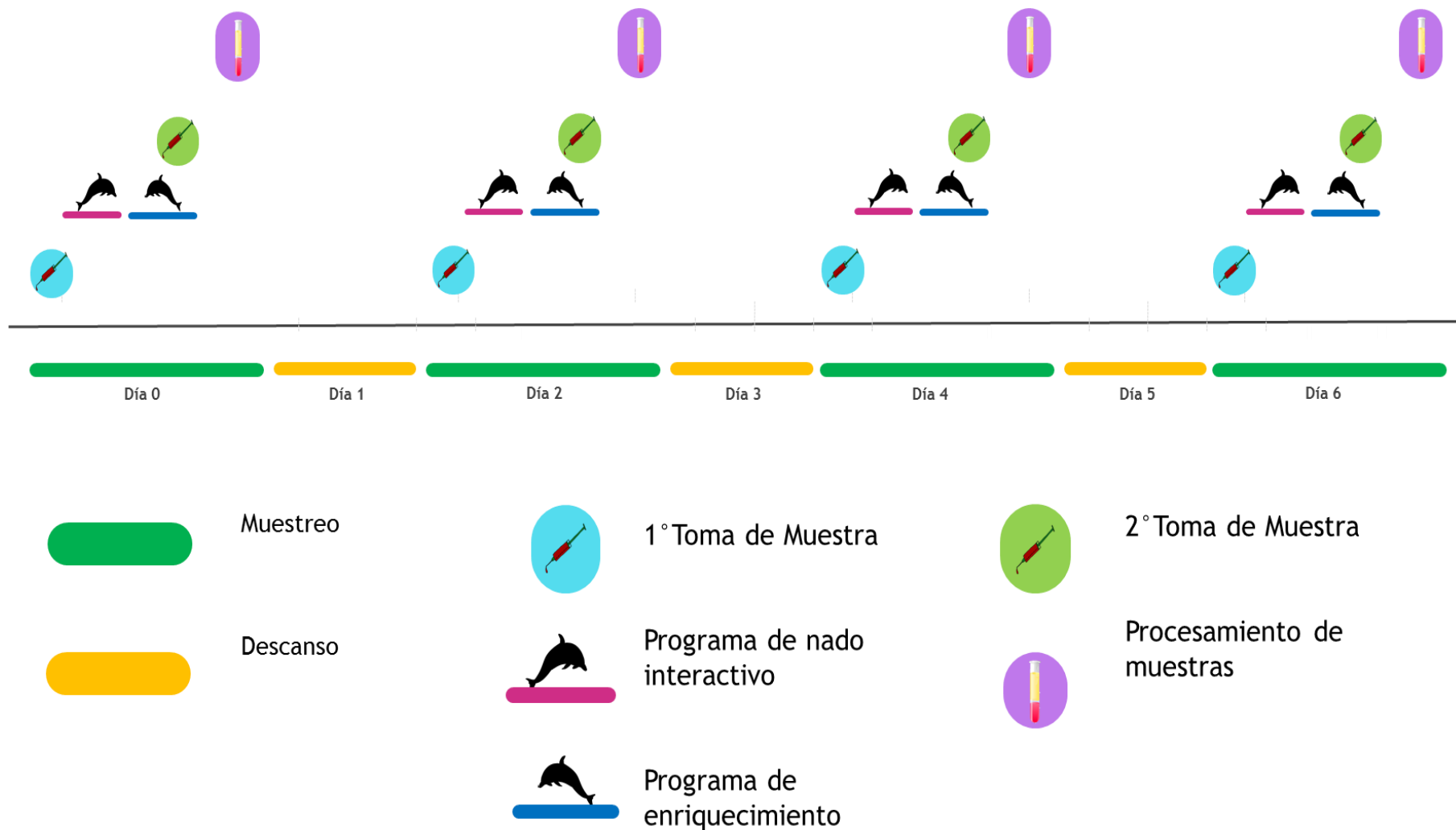


Imagen 10. Cronograma de Colección de muestras por individuo, en donde podemos observar que la colección de muestras se realizó con intermitencia de un día entre cada muestra. El procesamiento de muestras consistió en centrifugar las muestras, obtener el suero y almacenarlas hasta su posterior análisis.

En total, cada individuo se muestreo durante cuatro días, alternados cada uno por un día de descanso.

En cada uno de los muestreos del día 1 se tomaron cuatro tubos:

- Un tubo con EDTA (Lila) para evitar la coagulación, y realizar la biometría hemática.
- Dos tubos sin anticoagulante (Rojo) para separar el suero, y utilizarlo para realizar la química sanguínea y para la determinación de cortisol. Cada tubo se tomo en uno de los dos diferentes tiempos de evaluación (T0 y T1).
- Un tubo con citrato de sodio (Azul) para realizar el hematocrito.

A partir del segundo día del estudio sólo se tomó la muestra sin anticoagulante (tapa roja) para la determinación hormonal en el suero.

En todos los muestreos, a los animales control se les realizó la toma de muestras de igual manera que al grupo de nado.

Para la obtención del suero los tubos Vacutainer sin anticoagulante se dejaron reposar de 30 a 60 minutos, hasta observar la formación de un coágulo. Posteriormente se centrifugaron en una centrífuga Hamilton Bell, V6500 a 1318xg por 30 minutos. Si la muestra presentaba fibrina, ésta se desprendía de las paredes del tubo y se volvía a centrifugar por un periodo de 10 minutos. Una vez obteniendo el suero libre de fibrina se realizó la extracción con ayuda de una micropipeta de 1 mL y se depositó en tubos de centrifuga de 1.5 mL previamente rotulados. El suero obtenido fue almacenado en congelación -20 °C hasta su análisis.

Determinación de cortisol

Para la determinación de cortisol en el suero de los delfines, se utilizó la técnica de ELISA previamente mencionada, agregando 50 μL /pozo de muestra, se consideraron duplicados para todas las muestras a determinar. Los resultados obtenidos fueron transformados, de densidades ópticas a concentración de ng/mL con ayuda del programa “Assay Zap” (System for Analyzing RIAs, ELISAs, IRMAs and Other Assay, Biosoft®), del cual el Departamento de Reproducción posee una licencia de uso.

Análisis estadístico de las determinaciones hormonales de los animales

Los resultados de las determinaciones hormonales de los delfines en estudio fueron analizados en el programa SAS (Statistical Analysis System) con el método de estimación por máxima verosimilitud restringida (REML) para muestras repetidas en modelos mixtos, considerando la correlación de ambos grupos (nado y control) con: el tiempo (T0 y T1), el sexo, los alojamientos, la edad, el tipo de alojamientos (instalaciones) y la condición de nacimiento de los animales (vida libre o en cautiverio). Se estableció como intervalo de confianza el 95% ($P < 0.05$). Los datos se transformaron por logaritmo natural (Ln), para normalizar la distribución de los datos, y evitar valores que puedan afectar el análisis.

REML es una técnica para estimar los componentes de la varianza en datos multiclasicados; A diferencia del análisis de la varianza, puede aplicarse de forma rutinaria a conjuntos de datos no equilibrados, evitando los problemas de las estimaciones de varianza sesgadas que se obtienen con la estimación de máxima

verosimilitud estándar. El método REML es especialmente valioso para el análisis de ensayos clínicos no equilibrados, ya que permite recuperar toda la información disponible sobre los efectos del tratamiento, lo que puede conducir a mejoras significativas en su precisión (Jiménez *et al.*, 2003).

Simultáneamente se analizaron los datos con los test Kolmogorov–Smirnovde y la U de Mann-Whitney, los resultados obtenidos se muestran en el anexo XX, los cuales no se contraponen con los resultados obtenidos por el método REML, debido a esto la discusión se basa en los resultados obtenidos por el método REML.

Resultados

Toninas

Para este estudio se muestrearon un total de 23 ejemplares. Diecisiete de ellos fueron seleccionados para formar parte del grupo de nado y seis para el grupo control. De éste modo, en cada locación se incluyeron tres delfines en nado y uno control, con excepción de la locación DR, en la que únicamente se incluyeron dos ejemplares en el grupo de nado. El ajuste anterior se debió a que un ejemplar contemplado para el estudio rehusó el condicionamiento operante, que permite realizar la toma de muestra de manera voluntaria, en distintas ocasiones. No se pudo sustituir al ejemplar debido a que la locación DR solo cuenta con cuatro toninas.

Para cada delfín incluido en el estudio se obtuvieron los datos de nombre, sexo, condición de nacimiento -en cautiverio o vida libre- y edad (Cuadro 7).

Niveles de cortisol en suero

Con el inmunoensayo competitivo desarrollado y validado, se obtuvieron las concentraciones de cortisol sérico de cada muestra. Los resultados se expresan en ng/mL (Cuadro 8), y oscilaron entre 0.62 y 18.24 ng/mL, con una media igual a 2.98 ng/mL). En general todas las muestras T1 presentaron una disminución en los niveles de cortisol respecto a las muestras T0 independientemente del grupo asignado (nado interactivo o enriquecimiento), o de las condiciones de alojamiento, condición de nacimiento, tipo de alojamiento, sexo y edad.

Cuadro 8. Concentración de cortisol en suero, obtenidos antes y después de los programas de nado interactivo y enriquecimiento, donde los individuos controles se muestran de color gris (●), mientras los individuos del grupo nado se muestran sin color, T0= Antes del nado y T1= Después del nado.

Locación	No.	Muestra Tiempo Ejemplar	Concentración de cortisol ng/mL							
			1		2		3		4	
			T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
Dreams	1	HESTIA	0.62	3.42	0.62	0.63	0.62	0.62	0.62	0.62
	2	SOFIA	0.62	0.62	0.62	0.62	0.70	0.62	0.62	0.62
	3	HELLEN	14.77	12.14	7.72	6.54	16.20	10.77	18.24	10.18
Akumal	4	NOEL	10.61	1.69	13.44	2.31	13.71	0.62	11.86	0.96
	5	XIMENA	7.40	0.69	2.23	0.62	3.70	0.62	2.02	0.62
	6	ELENA	13.21	2.99	8.39	0.83	12.64	6.18	11.78	4.01
	7	ISABEL	3.75	0.62	2.37	0.62	3.98	0.62	1.27	0.62
Maroma	8	AMADEUS	11.65	0.62	0.62	0.62	6.79	0.62	3.47	0.62
	9	NALA	13.00	0.62	6.53	0.62	6.79	0.62	2.15	0.62
	10	PAKAL	7.09	2.05	9.77	0.62	11.31	0.62	5.66	0.62
	11	HIDALGO	5.77	0.62	6.80	0.62	5.23	0.62	2.12	0.62
Puerto Aventuras	12	TATICH	0.81	0.62	1.00	0.62	3.19	0.62	4.46	0.62
	13	CHAAC	6.98	2.54	8.60	0.62	4.55	0.62	1.78	0.62
	14	ATILA	0.62	0.62	2.04	0.62	0.62	0.62	0.98	0.62
	15	ZEUS	4.87	1.18	8.87	1.93	8.82	0.62	6.82	0.62
Isla Cozumel	16	DA VINCI	0.62	2.17	1.63	1.91	2.43	1.33	0.62	0.62
	17	JUPITER	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62
	18	GANDHI	0.62	1.52	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62
	19	RAMSES	0.62	0.62	1.33	0.62	0.62	0.62	3.46	2.34
Isla Mujeres	20	AZTECA	0.62	1.53	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62
	21	MADONNA	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	1.59	0.62
	22	PICASSO	2.52	0.77	2.85	0.62	4.12	0.62	6.72	0.94
	23	SHADIA	7.23	4.01	8.19	3.72	10.23	0.62	0.87	0.62

Análisis estadístico REML

No se encontraron diferencias significativas entre las variables de edad, sexo, condición de nacimiento, alojamiento, grupo (control y grupo de nado) y tipo de alojamiento (Cuadro 9). Al no encontrarse diferencia en los grupos (Grafico 9 y 10), se agruparon los datos en un solo conjunto. Sólo se encontró diferencia significativa en las concentraciones de cortisol con respecto al tiempo (T0 antes del nado o la actividad recreativa, y T1 después del nado o la actividad recreativa) (P= 0.01) (Gráfico 4). Se observa la disminución en las concentraciones de cortisol posteriores al tratamiento, independientemente del grupo.

Cuadro 9. Resultados resumidos del Análisis estadístico REML.

Término fijo	Estadístico F	Prob. F	Observaciones
Tiempo	3.09	0.01	Existe diferencia
Grupo	3.09	0.086	No hay diferencia entre grupos
Edad	0.77	0.695	No hay diferencia entre edades
Alojamiento	1.1	0.377	No hay diferencia entre alojamientos
Condición de nacimiento	0.3	0.587	No hay diferencia entre condiciones de nacimiento
Sexo	0.96	0.332	No hay diferencia entre sexo
Tipo de instalación	3.66	0.063	No hay diferencia entre tipo de alojamientos

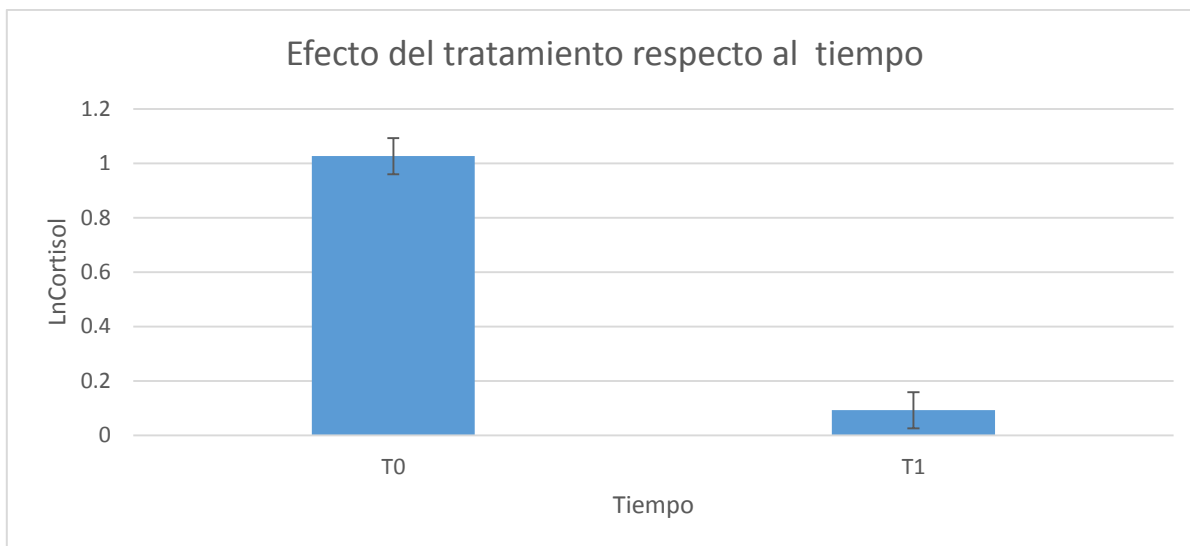


Gráfico 4. Concentración media de Ln de cortisol por tiempo. Se muestra la diferencia entre la media obtenida de las concentraciones correspondientes a T0 (09:00 h) y la media para las concentraciones de T1 (10:00 h). Se muestra el error estándar (0.06673). Existe una diferencia significativa de la concentración de cortisol con respecto al tiempo, antes (T0) o después del tratamiento (T1), con una $P= 0.01$ como podemos observar en el cuadro 9.

Los datos del gráfico 4 muestran los resultados como logaritmo natural de cortisol, que al ser transformados resultan en una media para el cortisol en el tiempo 0 de 2.79 ng/mL y para el tiempo 1 de 1.069 ng/mL.

Aunque visiblemente notamos que el grupo de nado presenta una concentración menor de cortisol (Gráfico 5) no es estadísticamente significativa con una $P < 0.05$, lo que indica que en el presente estudio no hay diferencia en los niveles de cortisol entre los animales con nado y aquellos que no se encuentran en dicha actividad, siendo la concentración promedio para el grupo control de 2.36 ng/mL, y de 1.29 ng/mL para el grupo de nado.

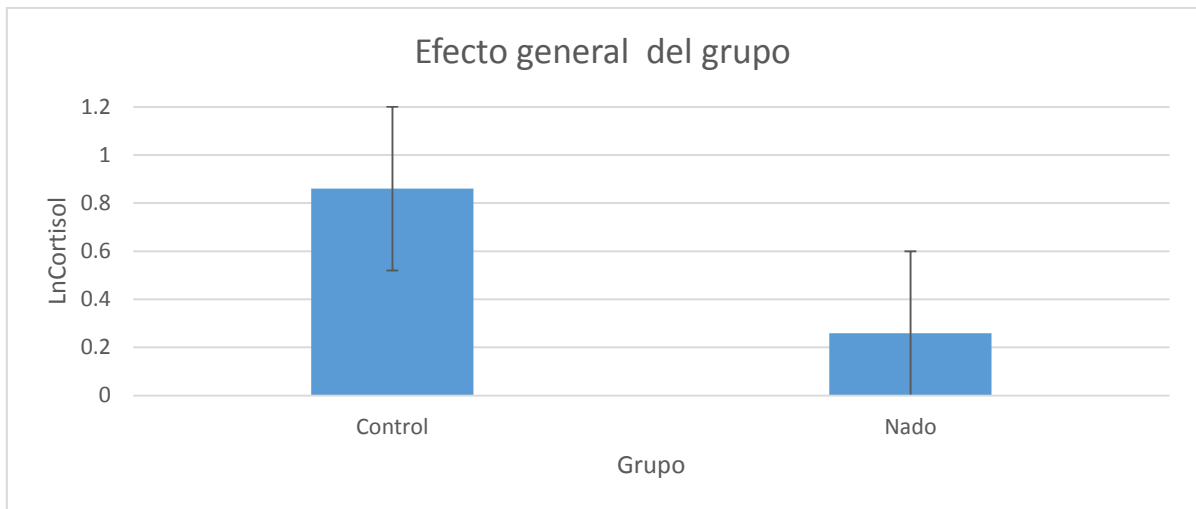


Gráfico 5. Concentración en Ln de cortisol con respecto al grupo sin considerar el factor de tiempo. No existe diferencia significativa entre la concentración de cortisol respecto al grupo al que pertenecieron obteniendo una $P= 0.086$ como podemos observar en el cuadro 9. Se muestra el error estándar (0.3423).

Al observar el promedio de concentraciones en los tipos de instalaciones (abierta o cerrada) (Gráfico 6), percibimos que el tipo de instalación en el cual estén alojados las toninas involucradas en este estudio no tiene un efecto directo sobre los niveles de cortisol evaluados, como lo confirma el cuadro 9, la concentración promedio para instalaciones cerradas es de 1.53 ng/mL mientras que para instalaciones abiertas es de 1.8 ng/mL.

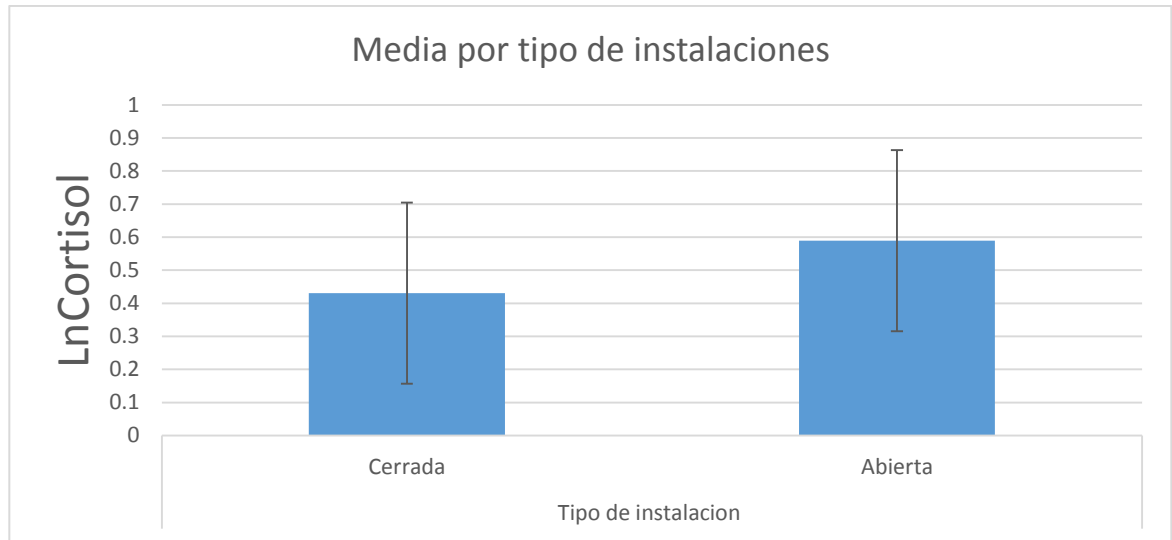


Gráfico 6. Media de las muestras de cortisol por tipo de locación. No existe diferencia en la concentración de cortisol con respecto al tipo de instalación (Abierta o cerrada), con una $P= 0.063$ como podemos observar en el cuadro 9. Se muestra el error estándar (0.2739).

Finalmente, al comparar el efecto del grupo con respecto al tiempo, podemos observar que en ambos grupos existe una notoria disminución en la concentración de cortisol en el tiempo 1, lo cual indica que sin importar el grupo (control o nado) las concentraciones de cortisol se reducen después de la actividad o tratamiento (Gráfico 7 y 8). La concentración promedio para el grupo control en el T0 es de 3.76 ng/mL, y para el T1 es de 1.48 ng/mL (Gráfico 9); mientras que para el grupo de nado en el T0 es de 2.06 ng/mL y de 0.81 ng/mL para el T1 (Gráfico 10).

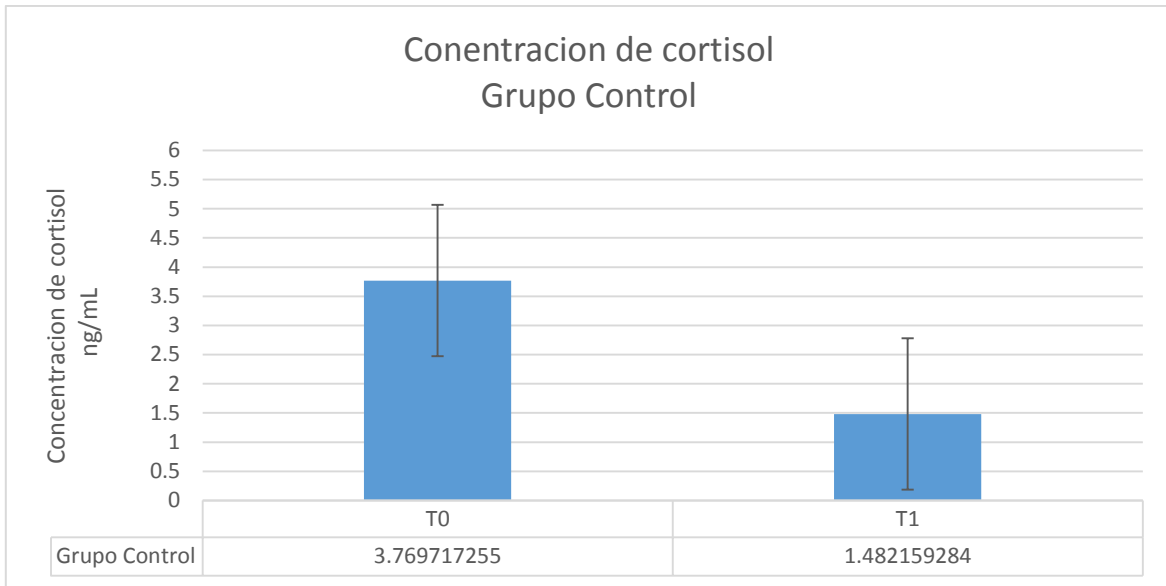


Gráfico 7 Concentración de cortisol en ng/mL del grupo Control respecto al tiempo (T0 y T1). No existe diferencia significativa entre la concentración de cortisol con respecto al tiempo, antes (T0) o después del tratamiento (T1), obteniendo una $P= 0.086$ como podemos observar en el cuadro 9. Se muestra el error estándar para el grupo control de 1.296.

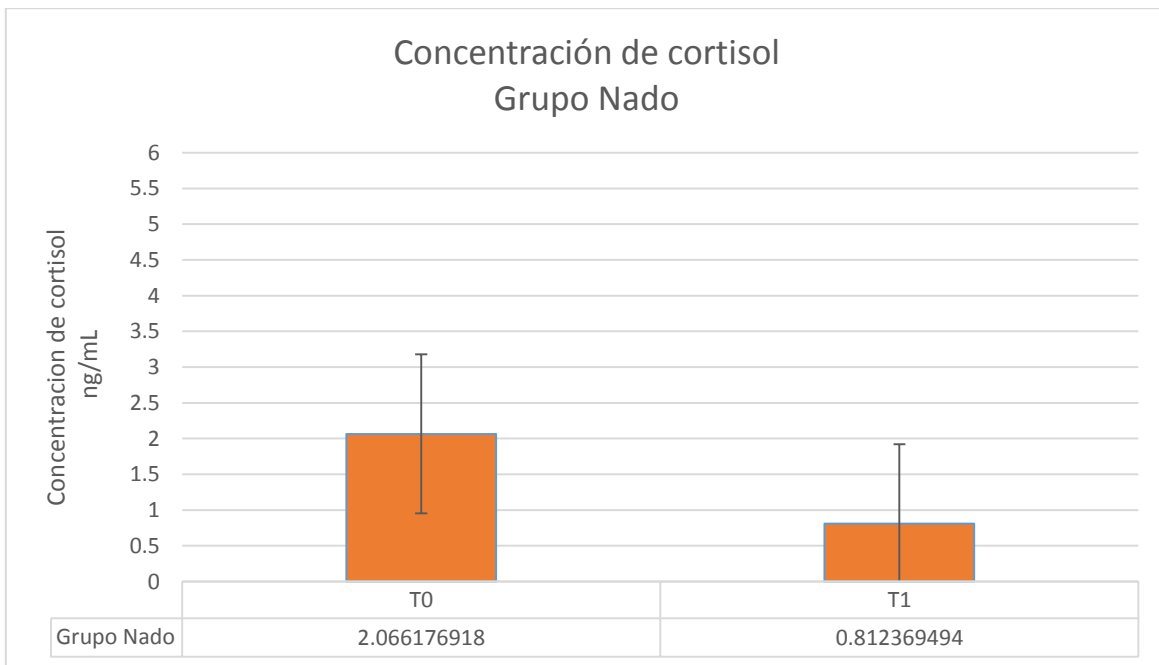


Gráfico 8 Concentración de cortisol en ng/mL del grupo Nado respecto al tiempo (T0 y T1). No existe diferencia significativa entre la concentración de cortisol con respecto al tiempo, antes (T0) o después del tratamiento (T1), obteniendo una $P= 0.086$ como podemos observar en el cuadro 9. Se muestra el error estándar para el grupo control de 1.111.

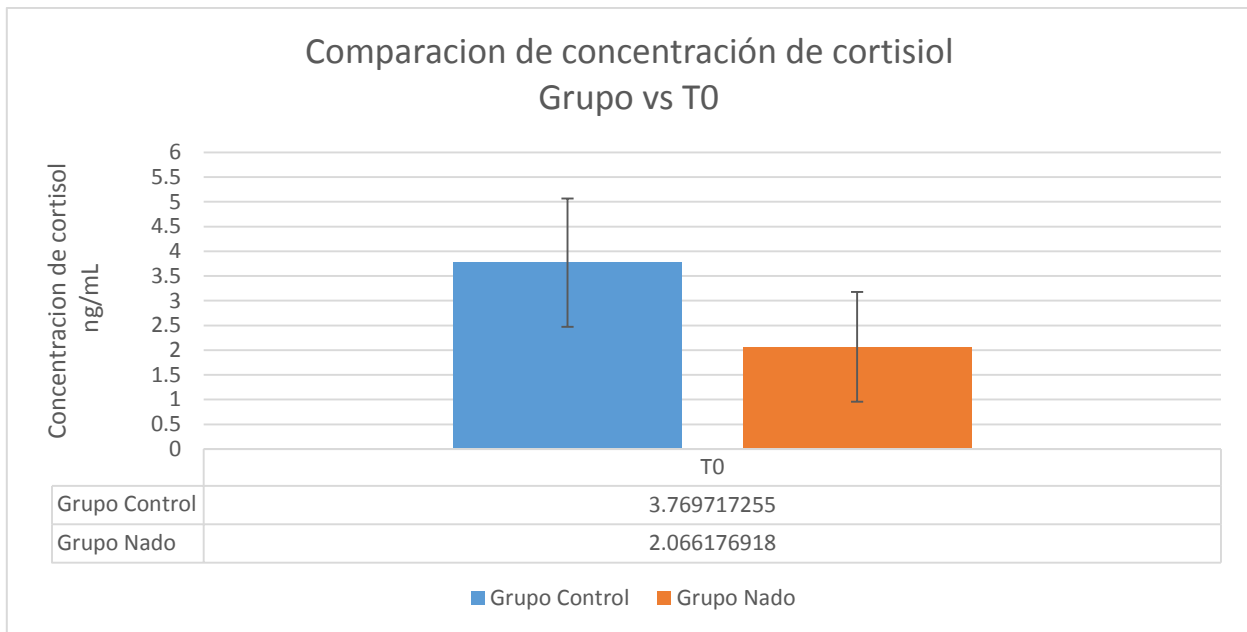


Gráfico 9 Concentración de cortisol en ng/mL de ambos grupos respecto a T0. No existe diferencia significativa entre la concentración de cortisol respecto al grupo al que pertenecieron durante T0, obteniendo una $P= 0.086$ como podemos observar en el cuadro 9. Se muestra el error estándar para el grupo control de 1.296 y para el grupo de nado 1.111.

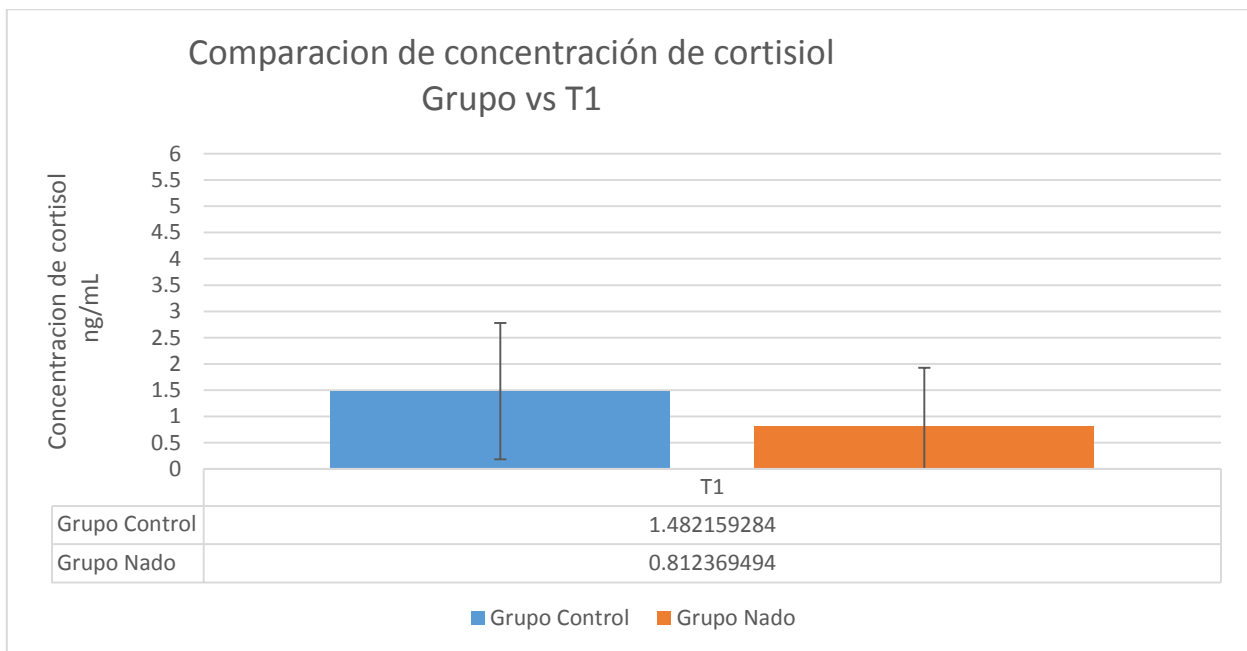


Gráfico 10 Concentración de cortisol en ng/mL de ambos grupos respecto a T1. No existe diferencia significativa entre la concentración de cortisol respecto al grupo al que pertenecieron durante T0, obteniendo una $P= 0.086$ como podemos observar en el cuadro 9. Se muestra el error estándar para el grupo control de 1.296 y para el grupo de nado 1.111.

No obstante, aunque estadísticamente no es significativo, podemos notar que en las toninas que se encuentran en instalaciones cerradas (Grafico 12), las muestras previas al estímulo, son más elevadas mostrando niveles de 5 – 9 ng/mL en comparación con las de instalaciones abiertas con niveles de 3 – 4 ng/mL (Grafico 13). En cambio, las muestras posteriores al estímulo muestran un patrón más homogéneo en ambas instalaciones con niveles de 1 – 2 ng/mL. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa que relacione el tipo de instalación donde habitan las toninas con concentraciones de cortisol más elevadas. Además, se observó aunque estadísticamente no es significativo ($P= 0.063$) que la concentración en las toninas que se encuentran en instalaciones abiertas sin nado (grupo control), presentan concentraciones más elevadas que las toninas que pertenecieron al grupo de nado. Los datos de la gráfica 14 nos muestran que el grupo control en instalaciones cerradas posee 1.21 ng/mL de cortisol, mientras que en instalaciones abiertas tienen 3.04 ng/mL. Por otro lado, para el grupo de nado en instalaciones cerradas es de 1.95 ng/mL y en instalaciones abiertas de 1.06 ng/mL.

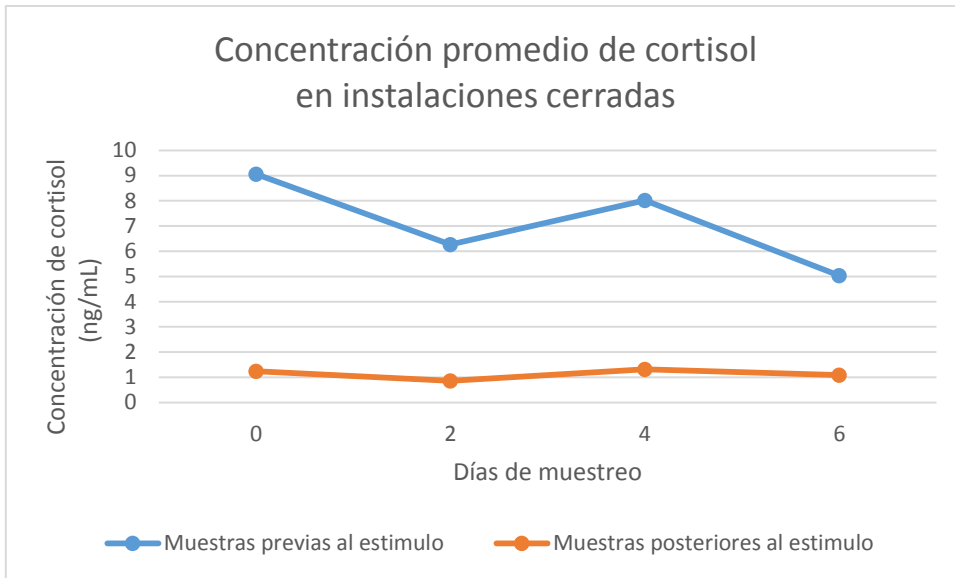


Gráfico 11. Promedios de las concentraciones de cortisol en instalaciones cerradas (MR, AK). Observamos las medias obtenidas para cada muestra.

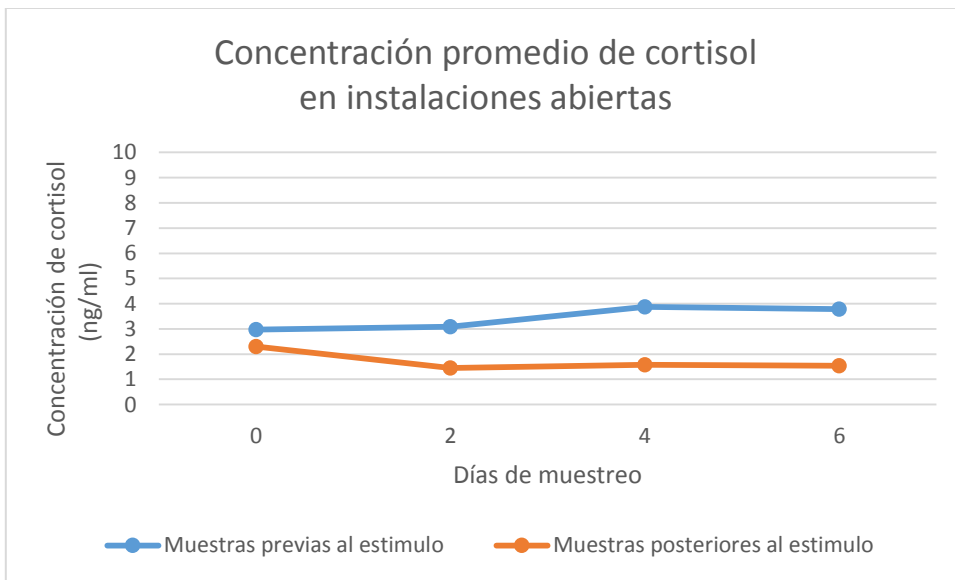


Gráfico 12. Promedios de las concentraciones de cortisol en instalaciones abiertas (IM.CZ, DR, PA). Observamos las medias obtenidas para cada muestra.

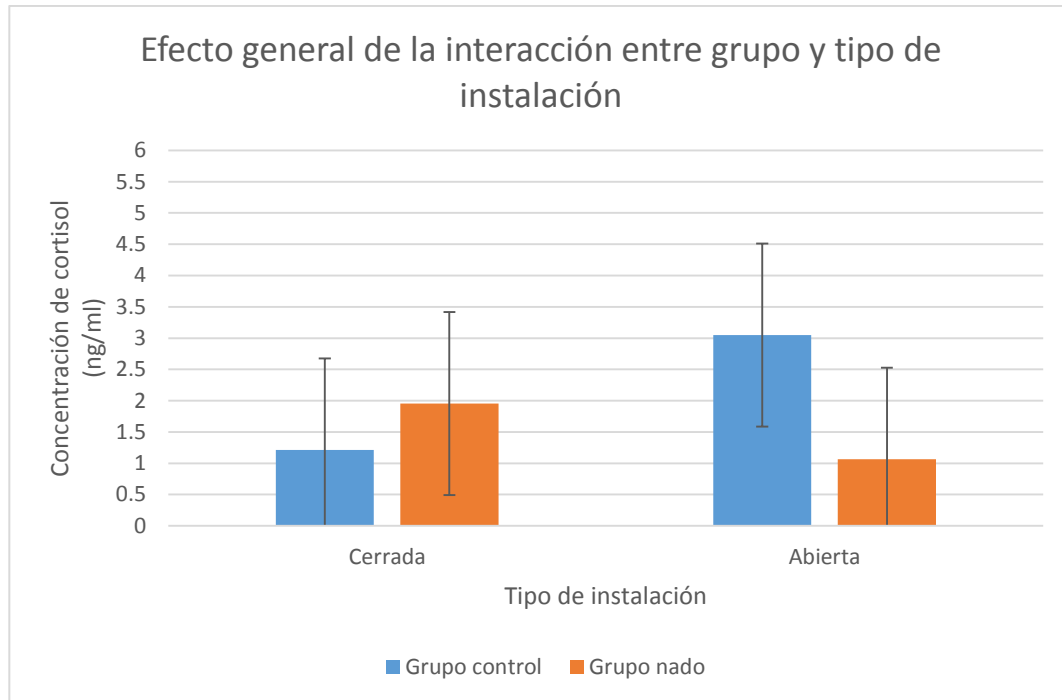


Gráfico 13. Concentración de cortisol en ng/mL respecto a la interacción de grupo y tipo de instalación. Sin considerar el factor de tiempo con una $P= 0.063$ como podemos observar en el cuadro 9. Se muestra el error estándar (1.463).

Recordemos que el cortisol presenta de manera natural un patrón de secreción, que está regulado por el ciclo circadiano, el cual presenta niveles más elevados al amanecer que paulatinamente van disminuyendo a lo largo del día. Los resultados obtenidos muestran similitud con dicha regulación.

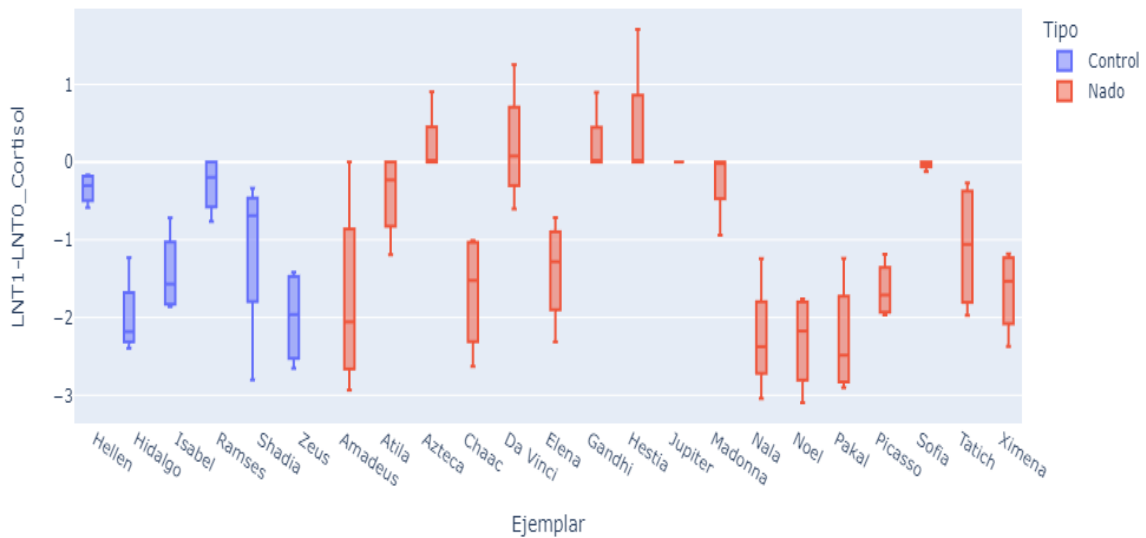


Gráfico 14 Variación individual de los ejemplares respecto a las variables LnCortisolT1 – LnCortisolT0, es claro a lo anterior que algunos valores sean negativos.

Debido de la no normalidad de los datos, además de la significancia estadística que menciona que no existe diferencia entre grupos se realizó un comparativo de ejemplar por ejemplar, para evaluar la variación individual al tratamiento, como observamos en el gráfico 14, el grupo control en su totalidad y once ejemplares del grupo nado no presenta aumento de cortisol respecto al T0, en cambio muestran una disminución en diversos grados, sin embargo 4 ejemplares del grupo (Azteca, Da Vinci, Gandhi y Hestia) nado mostraron un aumento de cortisol respecto al T0, finalmente el ejemplar “Jupiter” mostro una variación nula.

Conjuntamente se realizó la determinación de la incertidumbre de los datos (Cuadro 10), para definir en porcentaje la incertidumbre asociada a la medición de las muestras, dado como resultado un 29% de incertidumbre relativa extendida en la medida. Este análisis nos ayuda a considerar factores externos que no podemos controlar, pero afectan en cierta medida el resultado. En conjunto se calculó el límite inferior y superior para grupo obteniendo lo siguiente:

Grupo control: Límite inferior 0.44 ng/mL.

Límite superior 23.54 ng/mL

Grupo nado: Límite inferior 0.44 ng/mL.

Límite superior 17.69 ng/mL

Esto indico que todos los datos están dentro de los límites asociados, por consiguiente se consideraron verdaderos.

Cuadro 10, Resultados del Análisis de ANOVA robusto para determinar la incertidumbre de los datos.

Robust ANOVA

Media	2.5997			
Total SD (std dev)	3.6169			
	<u>Entre Objetivo</u>	<u>Muestreo</u>	<u>Análisis</u>	<u>Medida</u>
SD (o u)	2.0637	33.774	20.178	39.342
% total varianza	63.92	26.59	9.49	36.08
<i>U'</i> (Exp incertidumbre relativa) (95%)		24.93	14.89	29.04

Discusión

En el presente trabajo se demostró que las concentraciones de cortisol de los delfines sometidos a nado interactivo no difieren de las que presentan los animales que se encuentran fuera de dichos programas. Más aún, las concentraciones de cortisol en sangre de los animales sometidos a nado interactivo (grupo nado), o a actividades recreativas (grupo control), disminuyen de forma inmediata y significativa con respecto al tiempo que transcurre entre el inicio (09:00 h) y el final

(10:00 h) de la actividad, tendencia que se repitió en el transcurso de los cuatro muestreos realizados. Dicha disminución de cortisol coincide con el ritmo circadiano que naturalmente presenta el cortisol, en el que se observa un aumento en la concentración circulante de cortisol antes del amanecer y la disminución hacia el atardecer (Suzuki, 2003; Brousset *et al.*, 2005). Al presentarse este comportamiento podríamos inferir que dicha actividad no interfiere en la secreción natural que presenta el cortisol en los mamíferos. Sin embargo, en el presente estudio la disminución en las concentraciones de cortisol ocurre de forma inmediata a las actividades en las que los animales entran en contacto con los humanos, mientras que la reducción ocurrida por el ritmo natural de secreción del cortisol, ocurre de manera gradual a lo largo del día para alcanzar una reducción significativa (Suzuki, 2003). Más aún, en nuestro estudio, con la finalidad de descartar que si se llegara a presentar una variación en la concentración de la segunda muestra (T1), se debiese a la regulación natural que tiene el cortisol, todas las muestras fueron recolectadas durante la primera actividad programada (9:00 horas), respetando en ambos grupos de estudio que la segunda muestra se tomara a las 10:00 horas

Como mencione, los resultados muestran una disminución muy marcada (Gráfico 7) en las muestras posteriores al estímulo en ambos grupos (nado y control), coincidiendo con lo reportado por Suzuki (2003), quien realizó un monitoreo de 24 horas con la finalidad de conocer la regulación diaria del cortisol (en distintas épocas del año), en dos toninas del Indo-Pacífico de exhibición, el observo que las concentraciones de cortisol disminuyen gradualmente en el periodo de 09:00 a 18:00 h, proponiendo que las concentraciones más altas de cortisol ($7.8 \pm$

3.0ng/ml) generalmente se encontraban a las 03:00 horas, seguidas de un descenso en las concentraciones, encontrando las concentraciones más bajas (2.7 +/- 0.7ng/ml) a las 18:00 horas, el descenso gradual que Suzuki (2003) menciona como secreción regular para delfines en cautiverio, es similar a los resultados obtenidos en el presente estudio sin embargo la disminución no es gradual, esta ocurre en un periodo de una hora aproximadamente (09:00h T0 a 10:00h T1).

Partiendo del entendimiento de que la respuesta al estrés es una cascada de eventos, la evaluación de los cambios a través del tiempo en la concentración del cortisol es importante para comprender como afectan los estímulos a los organismos. Gracias al diseño planteado en este estudio se colectaron muestras seriadas no consecutivas previas y posteriores al estímulo, las cuales nos permitieron observar la respuesta a lo largo del tiempo en el mismo ejemplar. Dichas muestras tienen un intervalo de tiempo entre ellas de 60 minutos, lo cual corresponde a la duración de la actividad de nado a evaluar. Cambios abruptos en las concentraciones de cortisol se han reportado en respuesta a factores externos como la administración de ACTH, en toninas y belugas (*Delphinapterus leucas*), para desencadenar la respuesta al estrés, produciendo la elevación de cortisol a una máxima concentración en tan solo 60 minutos posteriores a la administración (St. Aubin, 1990).

En general los niveles de cortisol obtenidos (Cuadro 8) en este estudio oscilaron entre 0.62 ng/mL - 18.24 ng/mL, con una media de 2.98 ng/mL. Nuestros valores coinciden con trabajos previos. Dold (2000) reporta niveles de 4.0 a 14.8 ng/mL en delfines en cautiverio que tenían interacciones con el público. Mientras

que Luna (2012) reporta niveles en delfines de 4.3 - 7.9 ng/mL, Rangel Martínez (2014) niveles entre 6 y 36 ng/mL y Sánchez Gomez (2018) menciona niveles mínimos de 0.063 ng/mL, Thomson (1986) estudio diferentes escenarios de captura (estímulos estresantes) en toninas bajo el cuidado humano, obteniendo concentraciones iniciales de 11 – 15 ng/mL, los cuales aumentaron a 29 – 44 ng/mL después de la captura, similar a lo reportado por Fair (2014) donde menciona que la concentración media de cortisol en toninas de vida libre post captura es de 46.2 ng/mL, mientras que Gales (1992) reportó concentraciones de cortisol de 180 ng/mL en delfines listados (*Stenella coeruleoalba*) varados en la costa (Augusta, Australia), valores considerados como indicativos de una respuesta aguda al estrés. Los valores máximos de cortisol encontrados en nuestro trabajo no son indicativos de eventos agudos de estrés

Más aún, al analizar los resultados obtenidos en este trabajo, no se encontraron diferencias en las concentraciones de cortisol entre grupos (Gráfico 5), e incluso los valores disminuyeron después de que los delfines estuvieron en contacto con los humanos, ya fuera para una actividad recreativa o para el nado interactivo (2.79 ng/mL promedio en T0 vs 1.069 ng/mL en T1). Lo cual sugiere que presentan una secreción regular de cortisol y no puede asumirse que exista un evento de estrés, medido por la concentración de cortisol. Nuestros resultados son similares a lo reportado por Rangel Martínez (2014), quien realizó un estudio en 32 toninas que participaban en programas de nado interactivo con humanos, en delfinarios del estado de Quintana Roo, México, sin encontrar diferencia entre los grupos de nado y los grupos control (delfines con actividad de enriquecimiento con

su entrenador). Sin embargo, Rangel Martínez (2014) encontró diferencia significativa ($p=0.03$) entre las concentraciones de cortisol colectadas en ejemplares machos antes y después del nado, diferencia que no se encontró en el presente trabajo.

El presente estudio coincide con Sánchez Gómez (2018) que llevó a cabo un estudio en 18 toninas en delfinarios del estado de Quintana Roo, México, participantes en nado interactivo con humanos, en los cuales realizó la toma de cuatro muestras a lo largo del día, con la finalidad de determinar la concentración de cortisol en sangre, para observar si existía un efecto acumulativo de estrés en los delfines sometidos a esta actividad, los resultados que obtuvo muestran que la concentración más alta de cortisol se encuentra en la primera muestra (9:00), y que las muestras posteriores (10:00, 16:00 y 17:00 horas) presentan un descenso significativo de concentración con respecto a la primera muestra, además coinciden con el estudio de Rangel Martínez (2014) en que la concentración más elevada de cortisol se encuentra en la primera muestra colectada (09:00 h), para posteriormente disminuir en las siguientes muestras (10:00 h), si bien la evidencia obtenida por este estudio en concordancia con los previos no sugiere que exista efecto negativo de estrés relacionado con las actividades de nado interactivo, sólo refleja la condición del animal al momento del estudio, por lo cual es importante un monitoreo constante para asegurar que esta actividad no repercuta negativamente en el bienestar de los ejemplares involucrados.

Debido a los procesos fisiológicos que regulan la secreción natural del cortisol, es de esperar que las muestras previas (T0) a los programas (nado

interactivo o enriquecimiento) tengan mayor concentración con respecto a las obtenidas después (T1) del programa, siguiendo la secreción natural que presenta. Confirmando nuevamente que el nado interactivo no genera estrés en los ejemplares involucrados, coincidiendo con el presente estudio y los previos (Dold, 2000; Rangel Martínez, 2014; Sánchez Gómez, 2018). De ser el caso contrario los resultados mostrarían un aumento en las muestras T1, sugiriendo que la elevación de cortisol es un mecanismo de respuesta ante un factor estresante, además de que la elevación diferiría de la secreción natural que presenta el cortisol (Moberg, 1985; Romero *et al.*, 2011).

Al no encontrar evidencia en la literatura ni en el presente estudio de que los programas de nado interactivos con humanos generen eventos de estrés en los animales involucrados, podemos considerar que estos programas no repercuten de manera negativa en el bienestar del animal. Incluso podríamos considerar con los datos obtenidos que puede existir un beneficio (disminución) en los niveles de cortisol en toninas involucradas en el nado interactivo (1.06 ng/mL) sobre las que no lo están (3.04 ng/mL), cuando son alojadas en instalaciones de tipo abiertas, sin embargo, estadísticamente no se encontró evidencia para apoyar tal afirmación.

El trabajo de Miller *et al.* (2011) apoya la idea de que para los delfines en cautiverio la interacción con humanos puede ser benéfica. Ellos observaron que los delfines involucrados en programas educativos e interactivos con humanos, exhibieron mayor diversidad de estilos de nado y comportamientos de juego después de dichos programas, además de descubrir que los comportamientos agresivos, repetitivos y el tiempo dedicado a socializar parecían no estar relacionados con la participación

de los ejemplares en estos programas. Posteriormente, Melfi (2013), propuso que los comportamientos entrenados con condicionamiento operante de refuerzo positivo, pueden llegar a convertirse en una actividad que los animales realizan de forma voluntaria, sin mucho esfuerzo, y sin generar estrés. Eskelinen *et al.* (2015), mencionan que las toninas en cautiverio prefieren la interacción con humanos sobre la interacción con objetos inanimados. Brando (2017), coincide con lo anterior y afirma que el entrenamiento de mamíferos marinos cautivos, es un enriquecimiento ambiental debido a la cercana interacción humano-delfín. El conjunto de actividades que plantea una sesión de entrenamiento como la alimentación, la interacción y la actividad física realizada por los ejemplares son aspectos importantes que ayudan a prevenir situaciones de estrés (Naranjo, 2009).

Por otro lado, no se encontró evidencia estadística que indique que las variables de sexo, edad condición de nacimiento tipo de locación y locación tengan efecto significativo en las concentraciones de cortisol, a pesar de ello se observó que existe mayor concentración en animales en instalaciones abiertas que no realizan nado en comparación con los que sí lo realizaron en este estudio. Esto coincide con Luna *et al.* (2012), que no reportan diferencia en las concentraciones de cortisol entre delfines de instalaciones abiertas y cerradas. Es importante tomar en cuenta que este tipo de estudios que involucre ejemplares en cautiverio deben complementarse con otras variables, como lo son la alimentación, los grupos sociales, la calidad del agua y el ruido subacuático, espacio de los encierros, etogramas y la duración del estudio para comprender de manera conjunta cuáles pueden ser los efectos a corto y largo plazo de los programas interactivos de nado

con humanos, para generar una actividad óptima que garantice el bienestar de los animales. De igual manera se debe considerar el recurso humano necesario y la logística para llevar a cabo este tipo de investigaciones ya que sin la ayuda de los veterinarios responsables, entrenadores y personal administrativos no podrían llevarse a término estos estudios.

Por último, se mostró la validez y confiabilidad del ensayo de ELISA para la determinación de cortisol, desarrollado en el banco de sueros de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

El presente estudio realizó la validación de la prueba ELISA de tipo competitivo para la determinación de cortisol, esto con base en lo establecido en la NOM-177-SSA1- 2013, que indica procesos de estandarización y evaluación de la curva estándar. El presente trabajo cumplió lo establecido y determinó la curva estándar de diez puntos con concentraciones de 0.62 a 160 ng/mL de cortisol, la cual contiene el intervalo de concentraciones reportado para la especie *Tursiops truncatus* (6.0 - 36.0 ng/mL). Otro aspecto importante a evaluar del inmunoensayo fue la sensibilidad analítica, la cual es considerada por la NOM-177-SSA1- 2013 como la concentración más baja del analito que puede determinarse sin volverse incierta, y el intervalo de trabajo, que indica la zona en la que podemos realizar determinaciones con precisión, repetibilidad y con incertidumbre aceptable. Al comparar este aspecto de nuestro inmunoensayo con los trabajos previos para la determinación de cortisol en *Tursiops truncatus*, que emplearon ELISAS comerciales a excepción del trabajo realizado por Luna (2012) el cual utilizó la técnica de RIA, encontramos que los intervalos de trabajo que emplearon ELISAS

son similares, y que nuestro inmunoensayo presenta una sensibilidad analítica mayor a la generalidad de los trabajos (0.62 ng/mL), a excepción de Sánchez Gómez (2018), quien reportó sensibilidad analítica de 0.063 ng/mL, siendo estos dos trabajos más sensibles al trabajo reportado por Luna *et al.* (2012), con lo que podemos inferir que usar el método de determinación por medio de ELISA es igual de práctico que un método de RIA, con la ventaja de que no usa isótopos radioactivos, es mucho más económico y no presenta riesgo para la salud.

El presente estudio encontró que el analito presente en la muestra es altamente sensible a eventos de descongelación y no tolera más de dos ciclos de congelación y descongelación. Esta información es semejante a la referida por el Instructivo de uso para una ELISA comercial para determinación de cortisol en suero de la marca IBL Internacional. Este, sugiere que se evite congelar y descongelar las muestra de suero repetidamente, además de mencionar el periodo de estabilidad referente al tipo de almacenamiento, que da como resultado para muestras almacenadas a -20 °C sin CCD la estabilidad de la muestra es de seis meses, en nuestro caso al exceder ese número de CCD la muestra presenta inestabilidad o presenta efecto de prozona (efecto hook), este fenómeno se observa en la relación antígeno-anticuerpo, cuando existe una concentración excesiva de anticuerpos, esto genera una aglutinación que satura los sitios de unión, generando resultados dudosos.

Al realizar el proceso de validación es importante tomar en cuenta los parámetros de precisión en los inmunoensayos, debido a que no están exentos de presentar variaciones, esto se debe a que no solo influye el inmunoensayo, sino que

también se considera el equipo de trabajo, el usuario y la muestra. Conjuntamente estas variables tienen que cumplir con el criterio de aceptación que establece la NOM-177-SSA1- 2013, que indica que el coeficiente de variación intraensayo no debe ser mayor al 15%, parámetro que el presente inmunoensayo cumple de manera satisfactoria, al tomar en cuenta los resultados, parámetros establecidos y los criterios de aceptación que requiere un inmunoensayo para ser válido, podemos concluir que el presente inmunoensayo es válido, sencillo, específico y sensible para realizar la determinación de cortisol en muestras de suero sanguíneo procedentes de delfín nariz de botella.

Conclusión

Podemos afirmar basándonos en los resultados obtenidos en los parámetros analizados que el inmunoensayo de tipo competitivo es válido y confiable para realizar la determinación de cortisol en suero de delfines, considerando no más de un ciclo de congelación y descongelación en las muestras, cumpliendo con ello nuestro objetivo general y particular.

No se encontró diferencia significativa ($P=0.086$) en las concentraciones de cortisol en los delfines sometidos a nado interactivo (grupo nado) con respecto a los delfines que están fuera de dichos programas (grupo control) por lo que no rechazamos nuestra H_0 general

No se encontró evidencia de que el nado interactivo con humanos incremente las concentraciones de cortisol en delfines sometidos a esta actividad.

Se observó que las concentraciones de cortisol en los ejemplares se comportaron de manera similar, pero la intensidad de respuesta frente al estímulo fue diferente en cada uno de ellos, indicando que cada organismo responde de manera diferente, esto podría estar relacionado a factores o estímulos individuales. Se observó la disminución estadísticamente significativa ($p = 0.01$) en las concentraciones de cortisol en suero entre las muestras previas (T_0) y las muestras posteriores (T_1) al programa de enriquecimiento y nado interactivo, por lo cual no se presenta al momento de realizar el estudio un efecto acumulativo de cortisol en el transcurso de los cuatro días que analizo este estudio.

La disminución de cortisol, varía en intensidad en cada uno de los ejemplares, por lo cual es importante considerar además de la respuesta general del grupo, la respuesta individual, la cual proporciona datos particulares sobre el ejemplar.

Con base a la evidencia encontrada en la literatura y en los resultados del presente estudio se infiere que los programas de nado interactivo con humanos durante el presente estudio no ocasionan estrés agudo en los ejemplares involucrados.

Prospectivas

Se deben realizar estudios que consideren múltiples parámetros para tener una visión más extensa de la respuesta en los ejemplares involucrados en nados interactivos a las distintas variables que representan estas actividades, considerar que la respuesta individual del organismo, puede arrojar nuevas variables a considerar en futuros estudios, como la intensidad con la que algunos individuos afrontan los estímulos.

Se debería empezar a considerar como programas de enriquecimiento, aquellos nados interactivos con humanos en vista que fomenta la interacción humano-delfín, son acompañados con refuerzo positivo el cual recompensa a los animales con alimento o juguetes y promueve el ejercicio en los ejemplares involucrados.

Literatura citada

Alliance of Marine Mammal Parks and Aquariums (AMMPA). (2011). AMMPA Información Estandarizada Delfín *Tursiops truncatus*. Disponible en: <https://www.ammpa.org/sites/default/files/files/animalfactsheets/AMMPA-DolphinFactSheet-SPANISH-PRINT.pdf> (consultado: 13 de diciembre de 2019).

Atkinson, S., *et al.* (2015). Stress physiology in marine mammals: How well do they fit the terrestrial model? *Journal of Comparative Psychology*. 185: 463–486.

Arija, C. M. (2020). Delfín mular común – *Tursiops truncatus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. López, P., Martín, J., Barja, I. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Beuvery, E., *et al.* (1984). Comparison of Radioimmunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Measurement of Antibodies to *Neisseria meningitidis* Group A Capsular Polysaccharide. *Journal Of Clinical Microbiology*. 20 (4): 672-676.

Brandan, N., *et al.* (2014). Hormonas de la corteza adrenal. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina. Catedra de bioquímica. 1: 3-19.

Brando, S. (2010). Advances in Husbandry Training in Marine Mammal Care Programs. *International Journal of Comparative Psychology*. 23 (4): 777–791.

Brando, S., *et al.* (2017). Optimal marine mammal welfare under human care: Current efforts and future directions. *Behavioural Processes journal*. 156, 16-36.

Brening K., *et al.* (2005). Impact of different groups of swimmers on dolphins in swim-with-the- dolphin programs in two settings. *Anthrozoös*. 18(4): 409-429.

Brousset Hernández-Jáuregui, DM., *et al.* (2005). Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals. *Veterinaria México*. 36 (3): 325-337.

Camargo, BS., (2004). Estrés, síndrome general de adaptación o reacción general de alarma. *Rev. Medica Científica*. 17(2): 78-86.

Claxton, AM. (2011). The potential of the human–animal relationship as an environmental enrichment for the welfare of zoo-housed animals. *Applied Animal Behaviour Science*. 133(1): 1–10.

Cochrane A, Callen K. 1992. *Dolphins and Their Power to Heal*. Healing Arts Press: Vermont.

Cowan, D.F. (2000). The histopathology of the alarm reaction in dolphins. In: *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians and the International Association for Aquatic Animal Medicine Conference*, pp. 195–196.

CRAM. 2019. Delfín mular. Disponible en: <https://cram.org/catalogo-de-especies/mamiferos-marinos/cetaceos/delfin-mular/> (Consultado el 23 de abril de 2019).

- Curry, BE. (1999). Stress in mammals: the potential influence of fishery-induced stress on dolphins in the eastern tropical pacific ocean. NOAA Technical Memorandum 1999. NOAA-TM-N M FS-SWFSC-260.
- Curtin, S., Wilkes, K. (2007). Swimming with Captive Dolphins: Current Debates and Post-experience Dissonance. *International Journal of Tourism Research*. 9: 131-146.
- Davies, C. (2013). Principles of competitive and immunometric assays. Chapter 2.1. *The Immunoassay Handbook*. 4.
- Davidson, R.J., McEwen, B. S. (2012). Social influences on neuroplasticity: Stress and interventions to promote well-being. *Nature Neuroscience*. 15(5): 689-695.
- DeMares, R., Krycka, K. (1998). Wild animal triggered peak experiences: transpersonal aspects. *Journal of Transpersonal Psychology*. 30(2): 161-177.
- De Nicola, AF. (2015). Mecanismos neuroendocrinos de respuesta durante el estrés y la carga alostática. *Ciencia e investigación*. 65(1): 17-26.
- Dold, C.D., *et al.* (2000). Circulating levels of cortisol and aldosterone in the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): a comparative look at display animals. In: *Proceedings of the AAZV/IAAAM Joint Conference*. p. 494.
- Eskelinen, HC., Winship, KA., Borger-Turner, JL. (2015). Sex, age, and individual differences in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in response to environmental enrichment. *Anim. Behav. Cogn.* 2 (3): 241-253.
- Fair, PA., *et al.* (2014). Stress response of wild bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) during capture-release health assessment studies. *General and Comparative Endocrinology*. 206: 203-212.
- Franco, J., Uribe, VL. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas ruminantes. *Biosalud*. 11(1): 41-56.
- Glaser, R., Kiecolt-Glaser, JK. (2005). Stress-induced immunodysfunction: implications for health. *Nature Rev Immunol*. 5: 243-51.
- Gómez González B, Escobar A. (2006). Estrés y sistema inmune. *Rev Mex Neuroci*. 7(1): 30-38.
- Gómez-González B, Escobar A. (2002) Neuroanatomía del estrés. *Rev Mex Neuroci*. 3: 273-82.
- Gould, E., *et al.* (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(6): 3168-3171.
- Hart, LB., *et al.* (2015). Adrenal Hormones in Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Influential Factors and Reference Intervals. *PLoS ONE*. 10(5).
- He, J. (2013). Practical guide to ELISA development. Chapter 5.1. *The Immunoassay Handbook*. 4.

Heckel, G., *et al.* (2018). Tursión, tonina o delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*). En Atlas de Distribución y Abundancia de Mamíferos Marinos en México. Universidad Autónoma de Campeche. Pp. 116-120.

Hill, RW., Wyse, A., Anderson, M. (2016). Endocrine and Neuroendocrine Physiology. En Animal Physiology (Fourth ed., pp. 429–464). Sinauer Associates, Inc. Publishers.

Hing, S., *et al.* (2014). A review of factors influencing the stress response in Australian marsupials. *Conserv Physiol.* 2(1): 1- 17

IBL International. (2005-01). Cortisol ELISA: Ensayo inmunológico para la determinación cuantitativa *in vitro* de cortisol libre en saliva humana y de cortisol total en suero humano diluido: IBL International. (RE52611). Disponible en: http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE52611_IFU_es_Cortisol_ELISA_2015-01_sym3.pdf

Jim, G. (2003). Standard operating procedure #406 polyclonal antibody production – rabbits. Comparative Medicine & Animal Resources Centre, McGill University. Disponible en: https://www.mcgill.ca/research/files/research/406_-_polyclonal_antibody_production_-_rabbits_-_may2015.pdf

Jiménez, E., *et al.* (2003). Estimación por máxima verosimilitud restringida de componentes de varian-za y covarianza de múltiples características bajo los diseños I y II de Carolina del N. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26(1): 53-66.

Lobato-García, Bárbara R., *et al.* (2009). Optimización de protocolos de producción de anticuerpos policlonales: un ejercicio de innovación educativa. *Rev Med UV*, 09(3): 5-12.

Luna, BA., *et al.* (2012). Comportamiento de mantenimiento y niveles de cortisol de toninas (*Tursiops truncatus*) en instalaciones cerradas y abiertas. *Veterinaria México*, 43 (2); 103–112.

Medrano González L., E. Peters Recagno, M.J. Vázquez Cuevas, R.A. Zaragoza Álvarez, J.M. Sánchez Parra, L. Miranda Ramírez, C. del Villar Flores, H. Rosales Nanduca, L. Vilorio Gómora, I.C. Díaz Gamboa y E.V. Vega Peña. 2007. Distribución de la mastofauna marina de la Boca del Golfo de California y el Archipiélago Revillagigedo y sus implicaciones para la conservación. II. Distribución y abundancia de mamíferos marinos en el Pacífico mexicano. Reporte al Instituto Nacional de Ecología. México, DF

Mancia, A, Warr, G. W., y Chapman, R. W. (2008). A transcriptomic analysis of the stress induced by capture-release health assessment studies in wild dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology*. 17(11): 2581–2589

Melfi, V. (2013). Is training zoo animals enriching? *Appl Anim Behav Sci.* 147(3): 299–305

Miller, L.J., *et al.* (2011). The effects of education programmes on Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) Behaviour Anim Welfare. 20(2): 159–172.

Moberg, GP., Mench, J. A. (2000). The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare. CABI Publishing, New York. Pp. 71-80.

Moberg, GP. (1985). Animal Stress. Waverly Press Inc, Baltimore, MD.

Morrillas, P., *et al.* (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. 1ª ed. España. doi: ST/NAR/41.

Naranjo Pereira, M. (2009). Una revisión teórica sobre el estrés y algunos aspectos relevantes de éste en el ámbito educativo. Revista Educación. 33(2):171-190.

Niño, CA., Urbán, J., y Vidal, O. (2011). TONINA, TURSIÓN. En Mamíferos Marinos del Golfo de California: Guía Ilustrada. Mexico: Alianza WWF México-Telcel. pp 145-146.

NOAA-Fisheries. (2017). Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Disponible en: <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/species/mammals/dolphins/bottlenose-dolphin.html>. (Consultado el 23 de abril de 2019).

NOM-135-SEMARNAT-2004. Norma Oficial Mexicana NOM- 135-SEMARNAT-2004, Para la regulación de la captura para investigación, transporte, exhibición, manejo y manutención de mamíferos marinos en cautiverio.

NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

NOM-177-SSA1-2013. Norma Oficial Mexicana NOM--177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

Noren, D. P., Mocklin, JA. (2011). Review of cetacean biopsy techniques: Factors contributing to successful sample collection and physiological and behavioral impacts. Marine Mammal Science. 28(1): 154-199.

Oakley, RH., Cidlowski, JA. (2010). Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue Specific Actions of Glucocorticoids. The Journal of Biological Chemistry. 286(5): 3177–3184.

Perrin, WF., Bernd, W., Thewissen, JGM. (2009). Common Bottlenose Dolphin *Tursiops truncatus*. En Encyclopedia of Marine Mammals. San Diego, Estados Unidos.

Pilnik, SD. (2010). El concepto de alostasis: un paso más allá del estrés y la homeostasis Susana. *Rev Hospital Italiano Buenos Aires*. 30(1): 7-12.

Proie, S. (2013). A systematic review of cortisol levels in wild and captive atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), Killer whale (*Orcinus orca*), and Beluga whale (*Delphinapterus leucas*). (Tesis de Maestría). The Evergreen State Collage. Pp. 122-160.

Rangel Martínez, C. (2014) Evaluación del bienestar de *Tursiops truncatus* (Delfín nariz de botella) en condiciones en cautiverio. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México. Pp.19-34.

Reeves, RR., *et al.* (2002). *Guide to Marine Mammals of the World*. National Audubon Society. Alfred A. Knopf. New York. 527 pp.

Rodríguez-Fernández, JM., García-Acero, M., Franco, P. (2013). Neurobiología del estrés agudo y crónico: su efecto en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y la memoria. *Universitas Médica*. 54(4): 472-494.

Romero, P., Marlyn, H., Uribe-Velásquez, L., Sánchez, J. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne: stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming. *Biosalud*. 10(1): 71-87.

Sánchez Gómez, A. (2018). Valoración de los programas de nado como enriquecimiento ambiental para *Tursiops truncatus* (delfín nariz de botella). (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México. Pp.20-32.

Sánchez Okrucky, R., Morales Vela, B. (2016). Niveles de cortisol en delfines *Tursiops truncatus* vinculados a programas interactivos con humanos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*. 17(9): 1–9.

Schmitt, T., *et al.* (2010). Baseline, diurnal variations, and stress-induced changes of stress hormones in three captive beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Marine Mammal Science*. 26 (3): 635-647.

Selye, H. (1950). *The physiology and pathology of exposure to stress. A treatise based on the concepts of general adaptation syndrome and the diseases of adaptation*. Montreal: Acta Inc.

Sheriff, MJ., *et al.* (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. 166: 869-887.

Shirihai, H., Jarrett, B. (2006). *Whales, dolphins and seals. A field guide to the marine mammals of the world*. 1^a ed. A & C Black. p. 384.

Sigma Aldrich. Antibody Purification using Protein A, Protein G, or Protein L Agarose, Sigma Aldrich. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/antibodies/antibodies-application/protocols/antibody-purification.html> (consultado: 13 de julio de 2018)

St Aubin, DJ., Ridgway, SH., Wells, RS. (1996). Dolphin thyroid and adrenal hormones: circulating levels in wild and semi-domesticated *Tursiops truncatus*, and influence of age, sex, and season. *Mar Mamm Sci.* 12: 1–13.

St. Aubin, DJ., Dierauf, LA. (2001). Stress in marine mammals. In: Dierauf, L.A., Gulland, F.M.D. (Eds.), *Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease and Rehabilitation*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 253–269.

Stephan, H., Frahm, H., Baron, G. (1981). New and revised data on volumes of brain structures in insectivores and primates. *Folia Primatologica.* 35: 1–29.

Suzuki, M., *et al.* (2003) Diurnal and annual changes in serum and cortisol concentrations in IndoPacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) and killer whales (*Orcinus orca*). *Gen Comp Endocrinol.* 132: 427–433.

Sweeney, JC. (1993). Blood sampling and other collection techniques in marine mammals. In: Fowler me, editor. *Zoo and wild animal medicine Current Therapy.* 3^a ed. Philadelphia: WB Saunders. Pp. 425-428.

The University of Toledo. (2011). Guidelines for Blood Collection: Rodents and Rabbits. Department of Laboratory Animal Resources, The University of Toledo. Disponible en:https://www.utoledo.edu/depts/dlar/docs/Guidelines%20for%20Blood%20Collection_Rodents%20and%20Rabbits.pdf

Thomas, O., Kohl, A., Carl, A., Ascoli. (2014). Immunoassays. Chapter 15. *Antibodies A Laboratory Manual.* 2.

Trone, M., Kuczaj, S., Solangi, M. (2005). Does participation in Dolphin-Human Interaction Programs affect bottlenose dolphin behaviour. *Appl Anim Behav Sci.* 93(3–4): 363–74. Torres Courchoud., Pérez Calvo, J.I. (2016). Biomarcadores y práctica clínica. *An Sist Sanit Navar.* 39(1): 5-8.

Turnbull, BS., Cowan, DF. (1998). Myocardial contraction band necrosis in stranded cetaceans. *Journal of Comparative Pathology.* 1(18): 317-327.

Ugaz Ruiz, C., Sánchez, A., Galindo, F. (2009). Comportamiento social e individual de un grupo de toninas (*Tursiops truncatus*) en instalaciones abiertas y cerradas. *Veterinaria México.* 40(4): 381–387.

Ugaz, C., Valdez, .A., Romano, MC., Galindo, F. (2013). Behavior and salivary cortisol of captive dolphins (*Tursiops truncatus*) kept in open and closed facilities. *Vet Behav: Clin Appl Res.* 8(4): 285–290.

Wild, D. (2013). Immunoassay for beginners. Chapter 1.2. *The Immunoassay Handbook.* 4.

Zárate, S., *et al.* (2014). Efectos del estrés sobre los procesos de plasticidad y neurogénesis: una revisión. *Universitas Psychologica.* 13(3): 15-47.

Anexos

Anexo 1. Soluciones

Amotiguador de carbonatos

0.05M, pH 9.6

	1 litro	500ml
Na₂CO₃	1.59 g	0.795 g
NaHCO₃	2.93 g	1.46 g
NaN₃	0.2 g	0.1 g
H₂O desionizada	1 l	500 ml

Una vez mezclado todo medir el pH (9.6 y ajustar con NaOH. Almacenamiento a 4°C

Amotiguador de fosfatos salinos (PBS)

0.1M, pH7

	1 litro	500 ml
NaH₂PO₄ (0.2M)	10.842 g	5.421 g
Na₂HPO₄ (0.2M)	17.324 g	8.662 g
NaCl	8.7 g	4.35 g
BSA	1 g	0.5 g
H₂O desionizada	1 l	500 ml

Antes de agregar el BSA, medir el pH (7.0) y ajustar con NaOH. Almacenamiento a 4°C.

Solución de lavado Stock 10X

	1 litro	500 ml
NaCl 1-5 M	87.66 g	43.83 g
Tween 20 0.5%	5 ml	2.5 ml
H₂O desionizada	1 l	500 ml

A partir de aquí se prepara a 1X cuando se vaya a utilizar. Almacenamiento a temperatura ambiente.

Solución de citrato.

0.05M, pH 4

Cantidad	Ácido cítrico	H₂O_d
1 litro	9.605 g	1 l
500 ml	4.8 g	500 ml

Ajustar pH 4 con NaOH. Almacenamiento a 4°C

Solución de Bloqueo 1%

0.1M, pH7

	100 ml
PBS	100ml
BSA	1 g

Almacenamiento a 4°C.

Solución Glicina 0.1M, pH 2.5

Reactivo	Cantidad por litro
Glicina (C₃H₈O₃)	9.2g
H₂O bidestilada (cbp)	1l

Ajustar pH y almacenamiento a 4°C.

Anexo 2. Biometría y química sanguínea

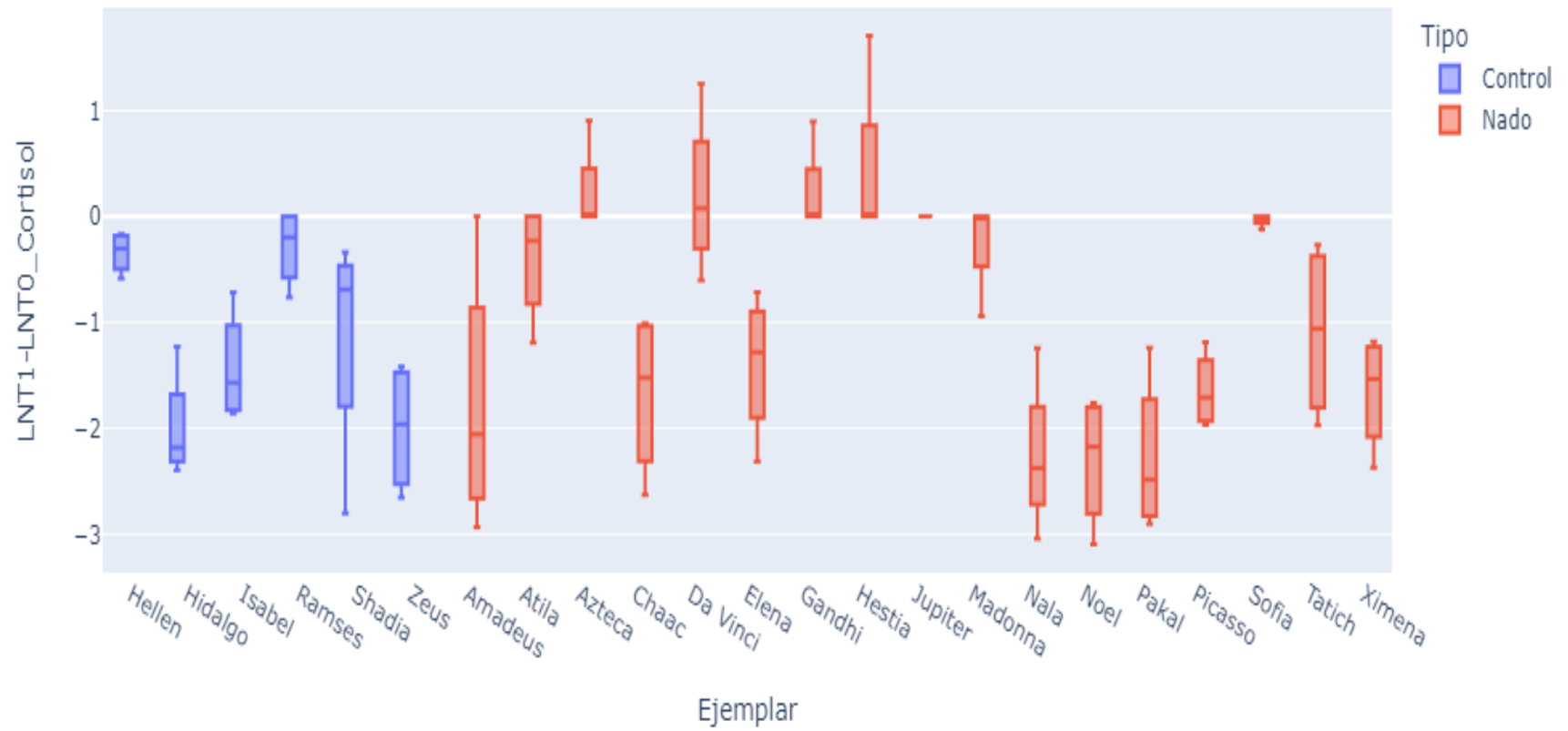
	DREAMS			AKUMAL				MAROMA			
DOLPHIN	HESTIA	SOFIA	HELLEN	ELENA	NOEL	JIMENA	ISABEL	AMADEUS	NALA	PAKAL	HIDALGO
VET REPORTING											
DATE	29/07/19	29/07/19	29/07/19	30/07/19	30/07/19	30/07/19	30/07/19	07/08/19	07/08/19	07/08/19	07/08/19
HEMATOLOGY											
RBC (3.0-3.7)	3.6	2.5	2.4	4.01	3.29	3.16	3.17	3.38	2.8	2.89	2.93
Hb (13.5-15.5 g/dl)	14.1	15.6	13	14.3	14.6	14	14.3	15.5	14.3	12.9	15
Ht (38-44%)	41	42	38	38	41	37	40	45	42	34	46
MCV (115-135 fl)	113.889	168	158.3333	94.7631	124.62	117.08861	126.183	133.136095	150	117.647	156.99659
H.C.M.(38-48 pg)	39.1667	62.4	54.16667	35.6608	44.3769	44.303797	45.1104	45.8579882	51.0714	44.6367	51.194539
C.M.H.C.(34-36 g/dl)	34.3902	37.14286	34.21053	37.6316	35.6098	37.837838	35.75	34.4444444	34.0476	37.9412	32.608696
WBC (5000-9000)	6,925	4,200	4,800	3,475	4,450	6925	5,950	4,775	4,875	4,250	4,750
Neutrophils (55-75)	57	69	59	59	68	62	69	63	51	55	66
(2750-6750)	3947.25	2898	2832	2050.25	3026	4293.5	4105.5	3008.25	2486.25	2337.5	3135
Linfocytes (12-35)	24	24	23	29	15	32	21	19	32	29	20
(600-3150)	1662	1008	1104	1007.75	667.5	2216	1249.5	907.25	1560	1232.5	950
Monocytes (2-6)	0	1	1	2	2	0	2	5	5	8	5
(100-540)	0	42	48	69.5	89	0	119	238.75	243.75	340	237.5
Eosinophils (2-18)	19	6	17	10	15	6	8	13	12	8	9
(100-1620)	1315.75	252	816	347.5	667.5	415.5	476	620.75	585	340	427.5
ESR (4-17 at 60 min)	6	9	31	8	9	9	5		7	5	5

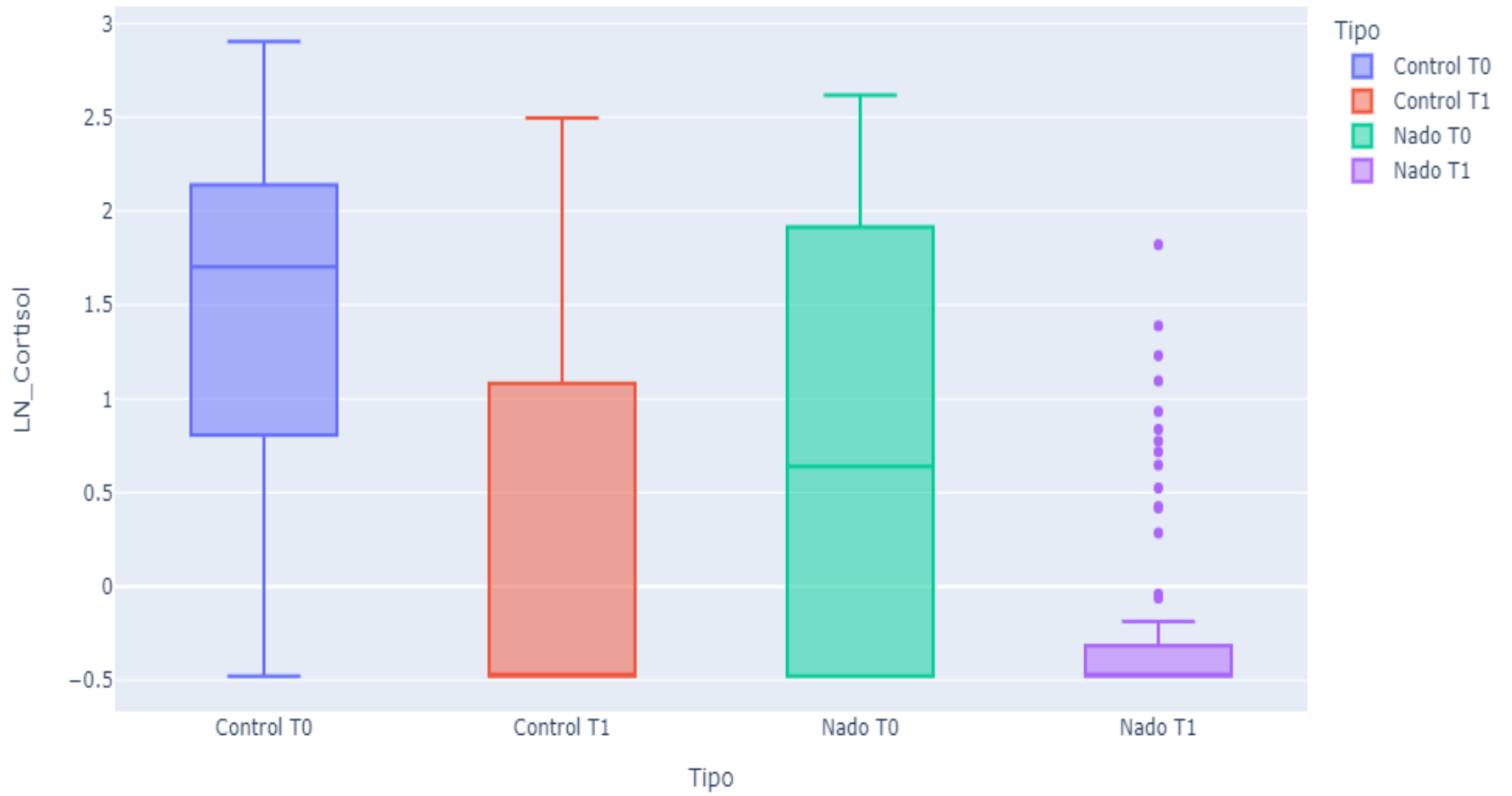
	DREAMS			AKUMAL				MAROMA			
DOLPHIN	HESTIA	SOFIA	HELLEN	ELENA	NOEL	JIMENA	ISABEL	AMADEUS	NALA	PAKAL	HIDALGO
SERUM CHEMISTRY											
TP & ALBUMIN											
Total Proteins (6-7.8 g/dl)	5.7	6.8	7.5	6.2	6.1	6.8	6.7	6.1	7.4	6.9	5.8
Albumin (4.3-5.3 g/dl)	3.6	4.4	4.2	3.8	4.1	4	4	3.6	4.6	3.9	4
Globulines (1.3-2.5 g/dl)	2.1	2.4	3.3	2.4	2	2.8	2.7	2.5	2.8	3	1.8
BLOOD CHEMISTRY											
Glucose (90-170 mg/dl)	84	106	80	87	84	95	93	81	87	101	86
BUN (42-58 mg/dl)	49.3	36.7	62.2	57	68	54.3	56.9	50.5	56.8	50.9	56.6
Creatinine (1-2 mg/dl)	1.2	1.2	1.6	1.2	1	1.3	1.2	1.39	1.92	1.5	1.59
HEPATIC PROFILE											
Total Bilirubine (0.1-0.2 mg/dl)	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.9	0.1	0.1	0.2
AST-TGO (190-300 U/L)	318	270	933	207	150	155	208	474	183	412	248
ALT-TGP (28-60 U/L)	26	31	75	27	16	20	24	66	27	51	31
ALK P (300-1300 U/L)	428	1088	303	768	535	543	614	296	805	395	766
GGT (30-50 U/L)	14	22	144	22	20	28	24	18	22	53	16
CK (100-250 U/L)	167	111	76	86	97	153	123	100	85	103	146
LDH (350-500 U/L)	450	536	897	455	449	449	512		454	624	580
ELECTROLITES											
Calcium (8.5-10 mg/dl)	8.8	9.3	9	8.7	9.3	9.8	9	9.9	10.2	8.7	8.5
Phosphorus (4-6 mg/dl)	4.9	5.7	4.5	5.6	3.9	5.5	4.8	4.2	4.5	4.6	5
Sodium (153-158 mEq/l)	153	152	146	150	152	152	150	156	151	150	153
Potassium (3.2-4.2 mEq/l)	3.7	3.2	4.2	3.2	3.6	3.1	3.3	4	3.4	3.8	3.5
Chloride (113-115 mEq/l)	120	119	111	116	118	117	115	127	120	118	121
Amylase	8	40	7	6	7	8	8	11	7	7	8
Lypasa	59	8	106	55	70	60	48	87	70	80	110

	PUERTO AVENTURA				COZUMEL				ISLA MUJERES			
DOLPHIN	ATILA	CHAAC	TATICH	ZEUS	RAMSES	JUPITER	GANDHI	DAVINCI	AZTECA	MADONNA	PICASSO	SHADIA
VET REPORTING												
DATE	08/08/19	08/08/19	08/08/19	08/08/19	19/08/19	19/08/19	19/08/19	19/08/19	26/08/19	26/08/19	26/08/19	26/08/19
HEMATOLOGY												
RBC (3.0-3.7)	3.42	3.7	3.7	4.1	3.7	3.37	3.11	3.25	3.01	3.3	3.01	2.61
Hb (13.5-15.5 g/dl)	14.3	16.1	14.7	15.3	15.2	15.3	13.4	14.2	12.8	13	12.9	11.5
Ht (38-44%)	40	49	48	46	44	42	41	40	40	38	39	33
MCV (115-135 fl)	116.959	132.432	129.73	112.195	118.919	124.6291	131.833	123.077	132.89	115.1515	129.568	126.437
H.C.M.(38-48 pg)	41.8129	43.5135	39.7297	37.3171	41.0811	45.40059	43.0868	43.6923	42.5249	39.39394	42.8571	44.0613
C.M.H.C.(34-36 g/dl)	35.75	32.8571	30.625	33.2609	34.5455	36.42857	32.6829	35.5	32	34.21053	33.0769	34.8485
WBC (5000-9000)	4,725	6,275	5,100	8,350	6,300	3,200	6,100	6,150	3375	4375	3750	4075
Neutrophils (55-75)	50	59	35	76	70	68	66	61	68	60	53	72
(2750-6750)	2362.5	3702.25	1785	6346	4410	2176	4026	3751.5	2295	2625	1987.5	2934
Linfocytes (12-35)	36	27	26	14	20	22	24	21	23	33	40	25
(600-3150)	1701	1694.25	1326	1169	1260	704	1464	1291.5	776.25	1443.75	1500	1018.75
Monocytes (2-6)	8	3	6	7	0	0	0	0	1	2	0	2
(100-540)	378	188.25	306	584.5	0	0	0	0	33.75	87.5	0	81.5
Eosinophils (2-18)	6	11	23	3	10	13	10	18	8	5	7	1
(100-1620)	283.5	690.25	1173	250.5	630	416	610	1107	270	218.75	262.5	40.75
ESR (4-17 at 60 min)	4	4	5	2	6	3	12	4	8	18	59	4

	PUERTO AVENTURA				COZUMEL				ISLA MUJERES			
DOLPHIN	ATILA	CHAAC	TATICH	ZEUS	RAMSES	JUPITER	GANDHI	DAVINCI	AZTECA	MADONNA	PICASSO	SHADIA
SERUM CHEMISTRY												
TP & ALBUMIN												
Total Proteins (6-7.8 g/dl)	6.5	7	6.1	6.3	6.8	7.6	7	6.4	8	6.4	6.2	7.7
Albumin (4.3-5.3 g/dl)	4.6	4.6	4	3.9	4.4	4.7	4.4	4.4	4	4.2	4.1	4.3
Globulines (1.3-2.5 g/dl)	1.9	2.4	2.1	2.4	2.4	2.9	2.6	2	4	2.2	2.1	3.4
BLOOD CHEMISTRY												
Glucose (90-170 mg/dl)	88	103	94	100	100	101	127	106	108	75	87	79
BUN (42-58 mg/dl)	45.7	44.4	44.5	47.8	57.1	63	57.4	61	64.5	51.1	57.3	52.1
Creatinine (1-2 mg/dl)	1.8	1.76	1.39	1.19	1.51	1.94	0.95	1.45	1.3	1.01	1.71	1.66
HEPATIC PROFILE												
Total Bilirubine (0.1-0.2 mg/dl)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
AST-TGO (190-300 U/L)	298	255	200	145	245	320	213	287	312	325	271	293
ALT-TGP (28-60 U/L)	42	29	22	24	29	36	23	40	41	39	29	56
ALK P (300-1300 U/L)	485	439	389	199	761	369	715	616	258	225	106	158
GGT (30-50 U/L)	33	14	34	39	36	40	27	23	19	39	16	104
CK (100-250 U/L)	112	94	72	59	120	103	211	139	148	154	190	58
LDH (350-500 U/L)	618	471	345	328	504	534	602	606	447	488	397	507
ELECTROLITES												
Calcium (8.5-10 mg/dl)	8.9	8.9	8.6	9.1	9.3	9.5	9.8	9.6	8.6	8.9	9.7	9.7
Phosphorus (4-6 mg/dl)	4.2	5.5	4.2	5.1	6.4	4.5	4.8	4.6	4.6	4.5	6	4.1
Sodium (153-158 mEq/l)	154	141	151	153	144	149	145	145	147	144	144	144
Potassium (3.2-4.2 mEq/l)	4.4	3.1	3	3.2	3.5	4	3.5	3.6	3.8	3.6	4	3.2
Chloride (113-115 mEq/l)	119	108	118	117	112	113	114	114	112	110	109	110
Amylase	7	7	7	7	7	7	8	6	7	7	7	7
Lypasa	100	80	108	77	46	127	50	132	53	61	79	50

Anexo 3. Resultados obtenidos de los test Kolmogorov–Smirnov y la U de Mann-Whitney.





Te agradezco por haber concluido de leer el documento.

E.A.S.B.