



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE ESTRÉS AL MEDIR  
CORTISOL SANGUÍNEO PRODUCIDO DURANTE EL  
MANEJO DE LOS MANATÍES DEL CARIBE (*Trichechus  
manatus manatus*) MANTENIDOS EN CAUTIVERIO EN  
EL ACUARIO DE VERACRUZ A.C.**

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

**NAOMI ELIZABETH GODÍNEZ RÍOS**

TUTORES:

**MVZ Angel García Hernández**

**Dra. Marta C. Romano Pardo**



México, D.F.

2014



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.

**DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE ESTRÉS AL MEDIR  
CORTISOL SANGUÍNEO PRODUCIDO DURANTE EL  
MANEJO DE LOS MANATÍES DEL CARIBE (*Trichechus  
manatus manatus*) MANTENIDOS EN CAUTIVERIO EN EL  
ACUARIO DE VERACRUZ A.C.**

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar este trabajo a mi familia pues sin su apoyo no habría sido posible su realización; José Enrique, María Leticia, Diana, Cinthia, Rafael, Fernanda, Isaías y Matías los amo y aunque no siempre estuvimos de acuerdo este trabajo es para ustedes.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mis tutores el MVZ Angel y la Dra. Marta por creer en este trabajo y todo el apoyo brindado en su realización. También a Ricardo Valdez por ayudarme en el laboratorio con la y principalmente a la MVZ Marina Naranjo por inspirarme e impulsarme a superarme cada día, es mi ídolo y agradezco al cielo haberla conocido.

Al Acuario de Veracruz A.C por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones; al Ricardo e Isabel por apoyar la realización del estudio.

Al personal del Depto. MAAR MVZ Alejandro de la Rosa, MVZ Carlos Cisneros y Biol. Daniela Remes, Dany muchas gracias por permitirme aprender tanto de ti.

Al Depto. de Educación Ambiental pero sobre todo a Carlos Vásquez por sus buenos consejos y la sabiduría para lidiar con los problemas.

Al personal de las diferentes áreas por hacer de mi estancia toda una experiencia muchas gracias.

También quiero agradecer a todas las personas que pude conocer dentro de esas paredes Brenda, Lalo, Paloma, Katherine, Tania, Emma, Jair, Julio, Adriana, Alicia, Luis Javier, Moor y a todo el personal de Delfiniti.

Por ultimo quiero dedicar un especial agradecimiento a los médicos veterinarios del Bioterio del Hospital Central Sur de Alta Especialidad PEMEX. MVZ Guzman el ABC de la vida es la mejor lección que he tenido en la vida, MVZ Licon gracias por las pláticas y los conocimientos compartidos y MVZ Edgar García muchas gracias por aceptarme ahí, enseñarme tantas cosas y ser un pilar en mi formación como médico veterinario. También le doy las gracias a Pepe y al MVZ Manuel por todos los buenos consejos que me dieron durante mi estancia en el Bioterio.

# CONTENIDO

TITULO.....	2
Dedicatoria .....	3
Agradecimientos .....	4
CONTENIDO.....	5
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Orden de los Sirénidos .....	10
1.2. Situación Actual de los Sirénidos .....	12
1.3. Manatí del Caribe ( <i>Trichechus manatus</i> Linnaeus, 1758).....	13
1.3.1. Biología .....	13
1.3.1. Estructura Social .....	19
1.3.2. Comunicación .....	20
1.3.3. Alimentación.....	20
1.3.4. Reproducción.....	21
1.4. Estrés.....	22
1.4.1. Fisiología del Estrés .....	23
1.4.2. Evaluación y Medición del Estrés.....	27
1.5. Entrenamiento Animal .....	29
1.5.1. Condicionamiento Operante .....	31
2. HIPÓTESIS .....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo General .....	34
3.2. Objetivos Específicos.....	34
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	35
4.1. Área de Estudio.....	35
4.2. Instalaciones o Encierro .....	35
4.3. Origen de los Organismos de Estudio .....	37
4.4. Entrenamiento.....	38
4.4.1. Ultrasonido .....	40
4.4.2. Medidas .....	42
4.4.3. Toma de Muestra de Sangre .....	43
4.5. Colecta de las Muestras de Suero .....	44
4.6. Medición de la Concentración de Cortisol en Suero.....	46

5. RESULTADOS .....	48
5.1. Entrenamiento.....	48
5.1.1. Ultrasonido .....	50
5.1.2. Medidas .....	50
5.1.3. Toma de Muestra de Sangre .....	51
5.2. Muestras de Suero.....	52
5.3. Concentraciones de Cortisol.....	53
6. DISCUSIÓN.....	59
7. REFERENCIAS .....	64
ANEXOS.....	72
Anexo 1 Dieta Actual.....	72
Anexo 2 Formato de Morfometrías.....	73
Anexo 3 Glosario de Términos.....	74

## FIGURAS

Figura 1.- Esquematización de la distribución mundial de los miembros del Orden de los Sirénidos, incluyendo la extinta vaca de Steller. ....	12
Figura 2.- Hembra y Cría del manatí Antillano donde se observan las principales características morfológicas como el cuerpo fusiforme, la aleta caudal en forma de remo, el color gris pardusco y los ojos pequeños, entre otros. ....	14
Figura 3.- Dimorfismo sexual en Manatíes, diferencias físicas externas que distinguen a los machos de las hembras, tomado de Berta et al., 2006. ....	18
Figura 4.- Esquema Donde se muestra la ruta hormonal posterior a un estímulo estresante, tomado de Fernández et al., 2008. ....	25
Figura 5.- Croquis de las instalaciones de manatiario. Se muestran las dimensiones tanto de la cuarentena como de la exhibición; la parte azul representa el área técnica, que es el sitio donde se posicionan a los animales para el entrenamiento de la toma de muestra de sangre; en la parte roja se representa el área de la plataforma. ....	36
Figura 6.- A la derecha se observa la toma de ultrasonido dentro del estanque de cuarentena, este se realiza por fuera del estanque mientras que los entrenadores se encuentran en la plataforma con el manatí. A la izquierda se observa la toma de ultrasonido en el estanque de exhibición, este se realiza	

con las 3 personas dentro del agua y el aparato de ultrasonido suspendido en un soporte unido al techo.....	41
Figura 7.- Toma de medidas de cuerpo dentro del estanque de exhibición, se observa una de las primeras aproximaciones con 2 personas para la desensibilización a la cintra métrica. ....	42
Figura 8.- Toma de muestra de sangre en el estanque de exhibición, para mantener el comportamiento se realiza la desinfección completa y la venopunción pero sin extraer sangre. ....	43
Figura 9.- Sitio de punción en la aleta pectoral de un manatí, tomado de Dierauf, 1990. ....	44
Figura 10.- Resumen del orden en que se tomaron las muestras de sangre. ....	46
Figura 11.- Concentración de cortisol sérico de cada uno de los manatíes correspondiente con la muestra tomada durante el manejo convencional o forzado. ....	54
Figura 12.- Concentraciones de cortisol sérico correspondiente al manejo voluntario o entrenamiento; la línea marca el límite de detección por lo que las concentraciones que se encuentran sobre ella, están dentro de la zona de confianza de la curva estándar. ....	55
Figura 13.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Pablo; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 9 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico. ....	56
Figura 14.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Silvia; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 8 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico. ....	56
Figura 15.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Costeña; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 7 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico. ....	57
Figura 16.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Dominga; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 9 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico. ....	57

Figura 17.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Fabián; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 9 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico. ....58

## CUADROS

Cuadro 1.- Criterios utilizados para cada uno de los comportamientos médicos entrenados. ....	39
Cuadro 2.- Promedio de tiempo empleado en cada comportamiento por animal, en el caso del comportamiento de ultrasonido, el tiempo varía según lo que se desea ver. ....	49
Cuadro 3.- Fecha en la que fue tomada la muestra de sangre perteneciente al manejo convencional o forzado. ....	52
Cuadro 4.- Fecha y número de muestras sanguíneas obtenidas de cada manatí durante el periodo de entrenamiento. ....	53

## RESUMEN

GODÍNEZ RÍOS NAOMI ELIZABETH. Determinación del nivel de estrés al medir cortisol sanguíneo producido durante el manejo de los manatíes del Caribe (*Trichechus manatus manatus*) mantenidos en cautiverio en el Acuario de Veracruz A.C. (Bajo la dirección de: MVZ Angel García Hernández y Dra. Marta Romano Pardo)

El manatí del Caribe (*Trichechus manatus manatus*) es una especie considerada en peligro de extinción tanto en nuestro país como internacionalmente, por lo que es importante conocer su fisiología y biología, para crear y mejorar planes de mantenimiento en cautiverio, evitar el estrés y facilitar el manejo médico. Para este trabajo se sometieron a un plan de entrenamiento médico (toma de ultrasonido, morfometrías y muestras de sangre) a 5 ejemplares del manatí del Caribe (*Trichechus manatus manatus*), médicamente sanos alojados en el Acuario de Veracruz A.C. Se tomaron muestras sanguíneas de cada ejemplar durante el manejo médico convencional, posteriormente se sometieron a entrenamiento y se tomaron muestras sanguíneas periódicas conforme avanzó el aprendizaje de dichos comportamientos. Todas las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, se separó el suero en criotubos de 1.2 ml y se congelaron para la posterior realización de radioinmunoanálisis. De 42 muestras analizadas con el RIA-1 sólo 13 entraron en la zona de confianza de la curva estándar; los valores de las muestras restantes se encontraron por debajo del límite de detección del kit (1.58 ng/ml). Todas las concentraciones de cortisol tomadas durante al manejo convencional o forzado fueron las más altas concentraciones detectadas, observándose que el promedio es de 3.49 ng/ml con una desviación estándar (D.E) de  $\pm 0.71$  ng/ml siendo la concentración más alta de 4.51 ng/ml y la más baja de 2.51 ng/ml. De las muestras restantes aunque estaban por debajo del límite de detección se obtuvieron valores teóricos y se realizó una estimación comprobando que el manejo médico por medio del condicionamiento operante ayuda a disminuir las concentraciones de cortisol sanguíneo.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Orden de los Sirénidos

Los sirénidos son los únicos mamíferos marinos herbívoros, se considera que su singular nicho trófico es la clave para el entendimiento de la evolución de su forma e historia de vida y posiblemente explique por qué son tan pocas las especies en este Orden (Colmenero, 1991). Dentro del orden *Sirenidae* se incluyen 2 familias actualmente existentes, la *Dugongidae* (dugongo) y la *Trichechidae* (manatíes) (Jefferson *et al.*, 1993; Dierauf y Gulland. 2001; Berta *et al.*, 2006).

### CLASIFICACIÓN TAXONOMICA

<b>Filo</b>	<i>Cordata</i>
<b>Subfilo</b>	<i>Vertebrata</i>
<b>Clase</b>	<i>Mammalia</i>
<b>Orden</b>	<i>Sirenia</i>
<b>Familia</b>	<i>Dugongidae</i>
<b>Género y especie</b>	<i>Dugong dugon</i> (Müller 1776)
	<i>Hydrodamalis gigas</i> (Zimmermann 1780) †
<b>Familia</b>	<i>Trichechidae</i>
<b>Género y especie</b>	<i>Trichechus senegalensis</i> (Link 1795)
	<i>Trichechus inunguis</i> (Natterer 1883)
	<i>Trichechus manatus</i> (Linnaeus 1758)

La familia *Dugonginae* incluye a la extinta vaca de Steller (*Hydrodamalis gigas*) y al dugongo (*Dugong dugon*) que se encuentra distribuido desde el sureste de África hacia el norte del Mar Rojo, en el Golfo Pérsico y a lo largo de la India Occidental hasta las costas centrales del sur de Australia (Jefferson *et al.*, 1993; Dierauf y Gulland. 2001; Berta *et al.*, 2006).

La familia de los manatíes incluye 3 especies sobrevivientes que son: el manatí Africano (*Trichechus senegalensis*) que se encuentra en aguas costeras, ríos, lagos del oeste y centro-oeste de África; el manatí del Amazonas (*Trichechus inunguis*) es una especie de agua dulce que vive en el río Amazonas y sus afluentes que incluyen Brasil, Colombia, Perú y Ecuador; y el manatí de la Indias Occidentales o del Caribe (*Trichechus manatus*) (Jefferson *et al.*, 1993; Dierauf y Gulland. 2001; Berta *et al.*, 2006; Flores, 2010).

Domning y Hayek (1986) distinguen 2 subespecies del manatí del Caribe con base en la morfología y a la distribución geográfica: El manatí de la Florida (*T. manatus latirostris*) se encuentra en las aguas costeras y los ríos del sureste de los Estados Unidos y el Golfo de México, hasta las costa de Texas y el manatí Antillano (*T. manatus manatus*) se encuentra en las Antillas, el Caribe, las aguas costeras y los ríos de México, América Central y el noreste de América del Sur (Figura 1) (Jefferson *et al.*, 1993; Dierauf y Gulland. 2001; Berta *et al.*, 2006; Flores, 2010).

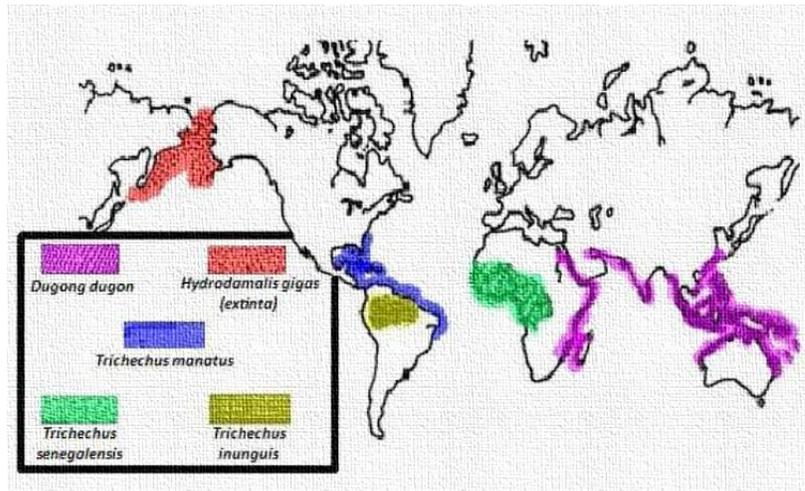


Figura 1.- Esquematación de la distribución mundial de los miembros del Orden de los Sirénidos, incluyendo la extinta vaca de Steller.

## 1.2.Situación Actual de los Sirénidos

Los miembros del Orden *Sireniidae* se encuentran clasificados como especies seriamente amenazadas. Internacionalmente se les considera, tanto al dugongo como a los manatíes, como especies vulnerables, debido a que enfrentan un riesgo de extinción en vida silvestre incluidos dentro de la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (*IUCN* por sus siglas en inglés) (*TheIUCN.org*, 2013). Mientras que la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (*CITES*) contempla al dugongo (*Dugong dugon*) y las 3 especies de manatíes (*Trichechus spp*) dentro del apéndice I que incluyen todas las especies en peligro de extinción. El comercio de especímenes en esas especies se autoriza solamente bajo circunstancias excepcionales (*Cites.org*, 2013).

En México, se ha protegido legalmente al manatí desde el año 1921, con el Decreto de veda permanente contra la caza y explotación del manatí en México. Actualmente el manatí del Caribe (*Tichechus manatus manatus*) es considerado en peligro de extinción, dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 debido a que tanto las áreas de distribución y

el tamaño de la población ha disminuido drásticamente en el territorio Nacional (Colmenero, 1991; Ortega et al., 2010; NOM-059, 2010).

En la década de los setenta, Heinsohn (1976) reportó que en el territorio mexicano podrían habitar 5000 ejemplares desde Tamaulipas hasta la costa de Quintana Roo. Actualmente la distribución se ha fragmentado gravemente, limitándola a 3 regiones en el sureste del país: 1) la región de los ríos y estuarios de Veracruz; 2) la región en la cuenca de los ríos Grijalva y Usumacinta y 3) la región que comprende la costa caribeña y el río Hondo en Quintana Roo. Sin embargo, no se ha podido hacer una estimación nacional por la imposibilidad de observación en aguas turbias y cubiertas de vegetación; se estima que existen entre 1000 y 2000 manatíes, al hacer una revisión de estudios publicados y no publicados (Ortega *et al.*, 2010).

### **1.3. Manatí del Caribe (*Trichechus manatus* Linnaeus, 1758)**

#### **1.3.1. Biología**

El manatí es un mamífero herbívoro totalmente acuático que habita en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Puede vivir durante largos periodos de tiempo en agua dulce, salobre y hábitats marinos, además de que se puede encontrar en aguas claras, turbias y en algunas altamente contaminadas; normalmente prefieren profundidades de agua de entre 0.9 a 2.1 m para el descanso y el pastoreo. Los adultos pueden alcanzar una longitud media de 2.7 a 3 m de longitud, Reeves *et al.* (1992) registraron 4.6 metros de longitud máxima y un peso de 410 a 600 kg, sin embargo, O'Shea (1992) reportó pesos de entre 400 y 900 kg para el Manatí de la Florida, donde las hembras suelen ser más grandes y más pesadas que los machos. En vida libre, se estima que los ejemplares de esta especie pueden llegar a vivir entre 50 y 60 años (Figura 2) (SEMARNAT, 2001; Dierauf, 2010; Flores, 2010; Ortega *et al.*, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).



Figura 2.- Hembra y Cría del manatí Antillano donde se observan las principales características morfológicas como el cuerpo fusiforme, la aleta caudal en forma de remo, el color gris pardusco y los ojos pequeños, entre otros.

Los manatíes son grandes mamíferos de color gris pardusco, aunque el color varía según la edad (los recién nacidos son más oscuros) la cantidad y el tipo de epifitos que cubran la superficie de la piel como por ejemplo, percebes o algas. Son animales fusiformes con cuerpo redondeado y cola aplanada dorso-ventralmente en forma de remo; los sirenios como los cetáceos, utilizan oscilación caudal para generar la propulsión. En comparación con los cetáceos, los manatíes son malos nadadores y son incapaces de alcanzar o mantener altas velocidades. Según Hartman (1979) se inicia el movimiento desde una posición estacionaria por una fase de expansión de la cola, seguido de una fase descendente, que se repite hasta que se establezca un movimiento ondulatorio. Cada golpe de la cola desplaza el cuerpo en posición vertical. No poseen aleta dorsal y las extremidades pectorales o aletas pectorales, las cuales presentan uñas en los extremos, son mucho más móviles y flexibles que las de los cetáceos, con estas se apoyan, tocan, abrazan y sujetan a otros manatíes o su alimento (Dierauf y Gulland, 2001; Berta *et al.*,

2006; Buchholtz *et al.*, 2007; Flores, 2010; Ortega *et al.*, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolda III, 2010).

La cabeza del manatí es de forma piramidal, no tiene cuello aparente, por lo que la cabeza se une directamente al tronco (Dierauf y Gulland, 2001; SEMARNAT, 2001; Berta *et al.*, 2006; Buchholtz *et al.*, 2007; Flores, 2010; Ortega *et al.*, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolda III, 2010). El vómer del manatí Antillano se extiende hasta el borde posterior del foramen incisivo o más allá. La mandíbula inferior es enorme (Berta *et al.*, 2006). La boca posee un belfo superior flexible y prensil que se utiliza para manipular, recolectar y llevar directamente la materia vegetal a la boca; ambos labios son altamente táctiles y contienen múltiples vibrisas modificadas (cerdas) que sirven para rasgar objetos. Además de su uso para la recolección de alimentos, los labios son importantes en la interacción social y la comunicación. Sus ojos son pequeños y ampliamente espaciados entre sí, rodeados de un músculo en forma de esfínter en lugar de parpado; poseen una delgada membrana translúcida que les permite ver mejor bajo el agua y en condiciones de poca luminosidad. La percepción de la profundidad es pobre, pero la agudeza a larga distancia parece ser buena. Los orificios auditivos se encuentran situados detrás de los ojos y apenas son perceptibles, carece de aurículas, aunque poseen un agudo sentido del oído (Dierauf y Gulland, 2001; SEMARNAT, 2001; Chapala *et al.*, 2007; Flores, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

Los manatíes poseen una estructura especializada llena de lípidos (el proceso cigomático del escamoso) que se ha sugerido que sirve en la recepción del sonido de una manera similar a la del canal mandibular graso de los odontocetos. Aunque los manatíes no tienen grasas con ésteres de cera o ácido isovalérico, es decir, "grasa acústica", las densidades de sus tejidos blandos son similares a los de los otros mamíferos y la disposición de los

tejidos dentro de su cabeza puede desempeñar un papel importante en la transmisión de sonido a sus oídos (Ames *et al.*, 2002; Berta *et al.*, 2006; Chapla *et al.*, 2007).

Las fosas nasales están situadas dorsalmente en el hocico y tienen unas válvulas musculares que se cierran durante las inmersiones del manatí. Los pulmones son unilobulados y alargados, estructuras relativamente aplanadas que se encuentran aproximadamente a la altura de los cuerpos vertebrales (Rommel y Reynolds, 2000; SEMARNAT, 2001; Dierauf y Gulland, 2006; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010). Al igual que todos los mamíferos, el manatí posee respiración pulmonar, por lo que cada 2 o 3 minutos emerge a la superficie para respirar, pudiendo realizar apneas de hasta 20 minutos. Cuando los manatíes respiran, intercambian el 90% del aire de sus pulmones, para hacer esto, exhalan muy fuerte cuando su nariz rompe la tensión superficial del agua, aventando una nube de rocío (SEMARNAT, 2001; Dierauf y Gulland, 2006; Quintana-Rizzo y Reynolds, 2000).

Los sirenios han experimentado un alargamiento del tórax, lo que ha dado lugar a un acortamiento de la región lumbar. Una característica distintiva, es que a diferencia de los demás mamíferos acuáticos, el manatí posee 6 vértebras cervicales y el número total de vértebras varía entre 48-54 (C6, T15-19, y LSC 23 a 29). En los sirénidos, las articulaciones de las vértebras en la región lumbo-caudal se reducen y se ven compensadas por el alargamiento de las vértebras dorsales (Berta *et al.*, 2006; Buchholtz *et al.*, 2007). El esternón es un hueso único (manubrio), que presenta una muesca de mediana profundidad en el borde anterior. Sólo los 3 primeros pares de costillas se unen al esternón y los demás son libres de articulación distal (Berta *et al.*, 2006).

El diafragma del manatí se diferencia de otros mamíferos marinos pues el tórax se subdivide en 2 cavidades pleurales horizontales, éstas se encuentran completamente

aisladas una de la otra y de las cavidades pericárdica y abdominal por un par de hemidiafragmas, además no se asocia con el esternón, sino dorsalmente a las costillas. Esta orientación única y la musculatura extrema del diafragma se han relacionado con el control de la flotabilidad (Rommel y Reynolds III, 2000; Berta *et al.*, 2006).

El sistema digestivo del manatí es extraordinario y refleja su dieta herbívora. Los incisivos y caninos fueron remplazados por placas córneas gingivales, hay 2 incisivos vestigiales en cada mandíbula al nacer, pero más tarde estos se reabsorben (Burn, 1986; SEMARNAT, 2001; Berta *et al.*, 2006). Tienen de 7 a 8 molares que no son de forma uniforme, sino que son de diferentes tamaños y están creciendo continuamente, desde el destete y durante toda la vida sustituyendo de forma frontal al anterior al desgastarse por la ingestión accidental de arena y tierra. Otras adaptaciones anatómicas incluyen un estómago simple con una glándula cardiaca, que produce ácido clorhídrico, enzimas digestivas y moco, la glándula cardiaca se abre en el saco principal a través de una única y pequeña abertura (Burn, 1986; Reynolds III y Rommel, 1996; Rommel y Reynolds, 2000; SEMARNAT, 2001; Berta *et al.*, 2006; Flores, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

En comparación con otros herbívoros los sirenios tienen el intestino grueso más largo, de hasta 20 metros y 10 a 15 centímetros de diámetro. El tracto gastrointestinal es caracterizado por un aumento de tamaño en el intestino grueso, al igual que otros herbívoros no rumiantes como los caballos (Burn, 1986; Reynolds III y Rommel, 1996; Rommel y Reynolds, 2000; SEMARNAT, 2001; Berta *et al.*, 2006; Flores, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010). Las características del tracto gastrointestinal aunado a una abundante microflora con tránsito intestinal lento (aproximadamente 6 días), el largo del cuerpo y el bajo contenido de lignina en plantas acuáticas permiten

digerir la celulosa y otros carbohidratos fibrosos de manera altamente eficiente al compararlo con otros herbívoros (Burn, 1986; Reynolds III y Rommel, 1996; Rommel y Reynolds, 2000; SEMARNAT, 2001; Berta *et al.*, 2006; Flores, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

Anatómicamente se puede distinguir a los machos de las hembras (dimorfismo sexual); los machos tienen una abertura genital caudal al ombligo, mientras que las hembras tienen la abertura genital craneal al ano (Figura 3) (Flores, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010). El aparato reproductor de la hembra se encuentra posicionado caudo-lateralmente a los riñones en la fosa del hipogástrico. La hembra tiene 2 prominentes pezones debajo de cada axila; la leche contiene más grasa y proteína que la de otros mamíferos, además contiene poca o nada de lactosa (Pervaiz y Brew, 1986; Larkin, 2000; Dierauf y Gulland, 2001; SEMARNAT, 2001; Rommel *et al.*, 2001; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

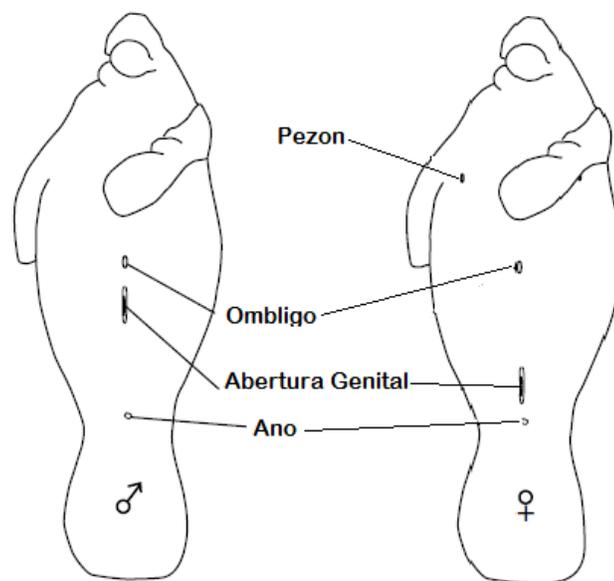


Figura 3.- Dimorfismo sexual en Manatíes, diferencias físicas externas que distinguen a los machos de las hembras, tomado de Berta *et al.*, 2006.

En los machos los testículos son intra-abdominales, localizados en la porción ventral de los hemi-diafragmas y en los márgenes caudo-laterales a los riñones. El epidídimo se origina a lo largo de los márgenes craneo-laterales de cada testículo. La cola del epidídimo se extiende caudo-lateral y ligeramente ventral a los testículos (Rommel *et al.*, 2001).

### **1.3.1. Estructura Social**

Son animales inofensivos, tímidos y moderadamente sociales, a los cuales se les observa frecuentemente en grupos de 2 a 4 individuos. Carecen de organización social permanente, con excepción de la que se establece entre la madre y la cría durante el periodo de lactancia. Fuera de la época reproductiva muestran interacciones caracterizadas por conductas tales como “besuqueos” y contacto físico entre ellos (acariciándose y frotándose). Por el contrario durante la época reproductiva forman agrupaciones durante la actividad de apareamiento, en los sitios en donde se concentra el alimento y durante el invierno se encuentran en las aguas cálidas (SEMARNAT, 2001; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

Se pueden reconocer 3 categorías de edad basadas en la madurez sexual y el comportamiento:

- Crías - manatíes de la mitad del tamaño de un adulto y asociado permanentemente a la madre.
- Jóvenes- son independientes de la madre, pero sexualmente inmaduros.
- Adultos - toman parte en la reproducción, al ser sexualmente maduros.

### **1.3.2. Comunicación**

Los manatíes pueden emitir una amplia gama de sonidos bajo el agua mediante la emisión de sonidos de frecuencia corta y son capaces de escuchar frecuencias de hasta 45 kHz. Los sonidos se han descrito como gorjeos, silbidos o chillidos y pueden durar entre 0.15 y 0.5 segundos (SEMARNAT, 2001; Chapla *et al.*, 2007; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010; Hernández, 2010). Estos sonidos se utilizan normalmente para mantener el contacto con otros adultos, sobre todo en los comportamientos sexuales. Las vocalizaciones son especialmente importantes para mantener la comunicación entre las hembras y las crías lactantes (Dierauf y Gulland, 2001; SEMARNAT, 2001).

### **1.3.3. Alimentación**

Se ha reportado que los manatíes se alimentan de 6 a 8 horas al día y normalmente consumen vegetación húmeda de entre el 4 al 10 % de su peso corporal al día. Los manatíes son generalistas que se pueden alimentar en cualquier nivel de la columna de agua, desde el fondo hasta la superficie, incluyendo la capacidad de tomar la vegetación flotante (Berta *et al.*, 2006; Flores, 2010). Son oportunistas e indiscriminados que se alimentan de una gran variedad de materiales vegetales. En el agua dulce los manatíes se alimentan de hydrilla (*Hydrilla verticillata*), el Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), lechuga de agua (*Pistia philoxeroides*); en el agua salada la hierba manatí (*Syringodium filiforme*) y la de tortuga (*Thalassia testudinum*) (Cambell e Irvine, 1977; Dierauf y Gulland, 2001; Berta *et al.*, 2006). Aunque los manatíes son principalmente herbívoros, también pueden ser detritívoros y coprófagos. Además, consumen una variedad de invertebrados (Cladóceros, Ampelísidos, Insectos, Isópodos, Tanaidáceos y Anípodos), que ingieren junto con los pastos marinos o macrófitas de agua dulce (SEMARNAT, 2001; Flores, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

A diferencia de otros mamíferos marinos, los manatíes gastan poca energía, debido a que son de movimientos lentos y viven en aguas tropicales, por lo que no requieren de mucha energía para regular y mantener constante la temperatura de su cuerpo. Su tasa metabólica es una de las más bajas que se conocen entre los mamíferos, lo que explica su excelente habilidad para mantenerse bajo el agua por mucho tiempo (Bunr, 1986; SEMARNAT, 2001).

#### **1.3.4. Reproducción**

El período reproductivo no está definido en una estación, ya que el cortejo y apareamiento se da en cualquier época del año, aunque el mayor número de partos sucede en la primavera y principios del verano, que es también cuando hay mayor cantidad de alimento. La madurez sexual para las hembras, se presenta entre los 3 y 5 años, además presentan un ciclo estral probable de 28 a 42 días. Cuando los machos alcanzan los 2.7 metros de largo alcanzan la madurez sexual, sus testículos aumentan de tamaño considerablemente (Larkin, 2000; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

En particular los machos viajan grandes distancias durante el año para encontrar hembras con las cuales aparearse mientras éstas son receptivas; la hembra en celo se convierte en centro de atención de varios machos. Esta reunión se denomina manada reproductiva y puede durar hasta un mes, se forman estas manadas con el fin de reunir muchos machos por lo que la hembra se aparee con varios machos durante el periodo de celo y así se incrementa la posibilidad a quedar preñada (SEMARNAT, 2001; Berta *et al.*, 2006; Flores, 2010; Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

En las manadas formadas únicamente para la copulación se presentan violentos empujones para establecer el orden jerárquico entre los machos y determinar el orden para

copular. Durante el apareamiento ambos animales permanecen en una posición horizontal en el agua y la copula se lleva a cabo en una posición ventro-ventral (SEMARNAT, 2010, Berta *et al.*, 2006; Flores, 2010, Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010). Las hembras generalmente tienen a una sola cría por parto, luego de un período de gestación de entre 11 y 14 meses. Se han registrado muy pocos casos de mellizos (Quintana-Rizzo y Reynolds III, 2010).

#### **1.4.Estrés**

El estrés es la respuesta biológica provocada cuando un individuo percibe una amenaza a su *homeostasis*. Sin embargo, no todo el estrés es malo, los estresores agudos se definen como eventos aislados con una corta duración, que viene seguido de un retorno a la *homeostasis*. Por el contrario, si un individuo sobrepasa sus sistemas de control se puede decir entonces que se encuentra en un estado de estrés crónico o sufrimiento (Morberg y Mench, 2000; Dierauf y Gulland, 2001; Galindo y Orihuela, 2004, Trip *et al.*, 2010).

La medición del impacto negativo que pueda tener el estrés sobre un animal tiene una amplia aplicación en la biología de la conservación, manejo de fauna silvestre, ecología conductual y bienestar animal. En animales mantenidos en cautiverio los niveles de estrés sirven para evaluar procedimientos veterinarios, manejos anestésicos, el impacto de diferentes tipos de instalaciones, prácticas de enriquecimiento ambiental, así como la manipulación e incluso el efecto de técnicas de reproducción asistida (Valdespino *et al.*, 2007). Si conocemos el impacto que puedan tener estos manejos podremos mejorar y poner en marcha los planes de manejo de especies en cautiverio y por consiguiente aumentar el grado de salud, bienestar animal e implementar técnicas de investigación sin causar el sufrimiento de los animales.

### **1.4.1. Fisiología del Estrés**

Cuando un animal percibe un estímulo “estresante” (estímulo nocivo que provoca temor, ansiedad o inquietud), ocurre una cadena de cambios fisiológicos en su organismo para enfrentar el problema (Morberg y Mench, 2000; Dierauf y Gulland, 2001; Galindo y Orihuela, 2004; Drucker, 2005). La respuesta al estrés se da en 3 etapas generales: el reconocimiento de un factor de estrés, la defensa biológica contra el estrés y las consecuencias de la respuesta al estrés (Morberg y Mench, 2000; Dierauf y Gulland, 2001).

Una vez que el sistema nervioso central percibe una amenaza, se desarrolla una respuesta fisiológica o de defensa que consiste en una combinación de las 4 respuestas generales de defensa biológica (Morberg y Mench, 2000; Drucker, 2005):

1. La respuesta conductual: En el caso de muchos factores estresantes es la primera respuesta y la más bio-económica, como buscar sombra y el huir o pelear ante un depredador. Sin embargo los animales pueden encontrarse en situaciones en las que sus opciones de comportamiento se ven limitadas o frustradas por confinamiento y desarrollar respuestas estereotípicas relacionadas con el aburrimiento, la frustración y la depresión, (Morberg y Mench, 2000).
2. La respuesta autonómica del sistema nervioso: Durante el estrés, el sistema nervioso autónomo afecta a un número diverso de sistemas biológicos, incluyendo el sistema cardiovascular, el sistema gastrointestinal, las glándulas exocrinas y la médula suprarrenal. Sin embargo, debido a que las respuestas afectan los sistemas biológicos específicos y los efectos son de relativamente corta duración. Por lo anterior, se podría argumentar que la activación de la tensión del sistema nervioso autónomo no

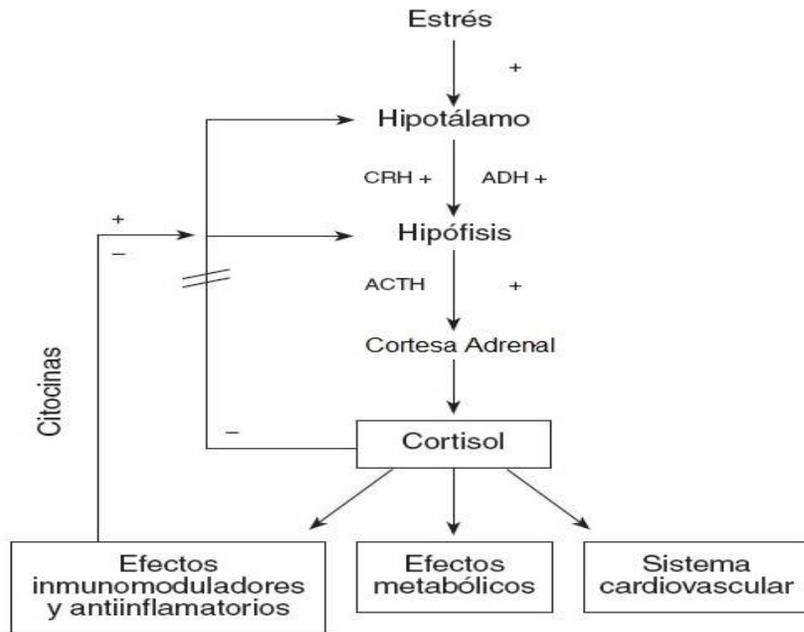
tiene un impacto significativo en el bienestar a largo plazo de un animal (Morberg y Mench, 2000; Dierauf y Gulland, 2001).

3. La respuesta neuroendocrina: Las hormonas secretadas por el sistema neuroendocrino hipotálamo, glándula pituitaria y glándulas periféricas (bazo, adrenales, hígado y tiroides) tienen un amplio efecto de larga duración en el cuerpo. Prácticamente, la totalidad de las funciones biológicas se ven afectadas por el estrés y está claro que las respuestas endocrinas constituyen un componente integral de la respuesta al estrés (Morberg y Mench, 2000; Drucker, 2005).
4. La respuesta inmune: La regulación del sistema inmune durante el estrés es uno de los principales sistemas de defensa relativa a un factor de estrés. Al minimizar el daño celular y tisular de manera que no se pierda la capacidad funcional del tejido muscular por ejemplo durante la huida (Morberg y Mench, 2000; Dierauf y Gulland, 2001; Drucker, 2005; Valdespino *et al.*, 2007; Cunningham y Klein, 2009).

El estímulo nocivo es captado por el hipotálamo que estimula al sistema simpático para la liberación de adrenalina, una catecolamina liberada por la médula adrenal, la cual promueve un incremento en la actividad motora, el ritmo cardíaco y la energía. Estos efectos se realizan a través de la glicólisis y la lipólisis, que movilizan las reservas de energía. En consecuencia, habrá una respuesta inmediata (en segundos) que tiene como finalidad que el animal huya o enfrente al agente estresante. Si el estímulo es de corta duración y el organismo es capaz de regresar a la *homeostasis* entonces es considerado como estrés agudo (Broom y Johnson, 2000; Dierauf y Gulland, 2001; Drucker, 2005; Brousset *et al.*, 2005; Valdespino *et al.*, 2007; Cunningham y Klein, 2009).

Si el estímulo continúa, entre los 2 y 10 minutos después, sucede la activación del eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal (HHA) que resulta en la secreción de las hormonas

esteroides de las glándulas suprarrenales que es una respuesta de especial importancia descrita por Cannon (1935) como la reacción de "lucha o huida". En este caso, el hipotálamo libera la hormona estimulante de la corticotropina (CRF) y vasopresina (VP) que estimula a la glándula hipófisis (pituitaria anterior o adenohipófisis) a liberar hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que llega a la corteza de las glándulas adrenales y promueve la liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo. Mediante la promoción de la absorción de colesterol y su conversión enzimática a cortisol y corticosterona (Figura 4) (Morberg y Minch, 2000; Broom y Johnson, 2000; Dierauf y Gulland, 2001; Drucker, 2005; Brousset *et al.*, 2005; Valdespino *et al.*, 2007; Cunningham y Klein, 2009).



Gastroenterol Hepatol. 2008;

Figura 4.- Esquema Donde se muestra la ruta hormonal posterior a un estímulo estresante, tomado de Fernández et al., 2008.

Los esteroides adrenales salen por difusión hacia los vasos sanguíneos y viajan en la sangre, unidos a la proteína fijadora de corticosteroides (CBG del inglés, *corticosteroid-binding-globulin*) también llamada transcortina y la globulina (menor grado). El 90% de los glucocorticoides se encuentran ligados a estas proteínas mientras que el 10% restantes puede encontrarse libre; normalmente los glucocorticoides tienen una elevación rápida de entre 5 a 10 minutos y alcanzan su nivel máximo de 30 a 60 minutos, estos son rápidamente eliminados de la circulación y la vida media es de 80 a 120 minutos (Drucker, 2005; Cunningham y Klein, 2009).

Como su nombre lo indica, los glucocorticoides tienen un papel importante en la gluconeogénesis mediante la estimulación del hígado para convertir la grasa y la proteína en glucosa para obtener energía; también inhiben la captación de glucosa y la utilización de los mismos por los tejidos periféricos (Dierauf y Gulland, 2001; Drucker, 2005; Brousset *et al.*, 2005; Cunningham y Klein, 2009).

La elevación crónica de glucocorticoides resulta en el catabolismo de proteínas, hiperglucemia, hipertensión, supresión inmune, alteraciones del ritmo circadiano, resistencia a la insulina (diabetes), atrofia muscular y ósea, inhibición de los ciclos reproductivos, aborto, muerte, aumento en la susceptibilidad a una infección y depresión. Los glucocorticoides inhiben la respuesta inmune por varios mecanismos, entre los que destacan: la inducción de apoptosis de células linfoides y la reducción de producción de anticuerpos. Asimismo, producen una redistribución de algunos tipos de leucocitos circulantes, por lo que se observa una reducción en la cantidad de linfocitos, eosinófilos, basófilos y monocitos circulantes (Morberg y Mench, 2000; Dierauf y Gulland, 2001; Drucker, 2005; Brousset *et al.*, 2005; Cunningham y Klein, 2009; Tripp *et al.*, 2010).

El rendimiento mental y el volumen del hipocampo se reducen después de la elevación crónica de corticoides. Teniendo en cuenta las acciones perjudiciales de los glucocorticoides crónicamente elevados, una función importante de estos esteroides es reducir la respuesta del eje HHA al estrés. Esto ocurre a través de la inhibición por retroalimentación negativa, donde los glucocorticoides inhiben aún más la respuesta HHA en los niveles del cerebro y la hipófisis, sin embargo si son estimuladas hasta el agotamiento, el resultado es el sufrimiento e incluso la muerte (Morberg y Mench, 2000; Dierauf y Gulland, 2001; Brousset *et al.*, 2005).

#### **1.4.2. Evaluación y Medición del Estrés**

Uno de los indicadores que se utilizan con frecuencia para la evaluación del bienestar animal y del estrés es el nivel de corticosteroides (Viena FAO, 1984; Pervaiz y Brew, 1986; Romano *et al.*, 2010). El radioinmunoanálisis (RIA) es la técnica más ampliamente utilizada para la determinación de las concentraciones de hormona en fluidos y tejidos corporales. Estos ensayos, utilizan anticuerpos específicos para la hormona como la proteína de unión. Los anticuerpos contra muchos antígenos están disponibles comercialmente y otros pueden ser producidos mediante la inmunización de conejos, ovejas, cobayos o caballos. El RIA es un ensayo de unión competitiva que combina la especificidad de una inmunoreacción con la sensibilidad de un método radioquímico (Viena FAO, 1984; Arce *et al.*, 2006).

La información proporcionada por los datos de cortisol se ha enriquecido cuando se realizan estudios paralelos de comportamiento. Los datos complementarios, como la historia clínica del animal que proporciona información sobre la salud, la reproducción, etcétera, son muy útiles. Este enfoque multidisciplinario da una mejor comprensión del

bienestar animal y cómo hacer frente a condiciones de estrés (Pedernera-Romano *et al* 2006; Romano *et al.*, 2010).

Las hormonas y sus metabolitos se pueden medir en diversos fluidos corporales y tejidos. No obstante, el suero es la muestra preferida para la mayoría de los análisis hormonales, debido a que la mayoría de los diferentes sueros animales son bastante estables al conservarlos en refrigeración e incluso en congelación. Mediante las muestras de sangre también se pueden observar las fases agudas de la respuesta al estrés ayudándonos de un hemograma y bioquímica sanguínea, para detectar cambios en los parámetros normales como consecuencia de los cambios hormonales descritos anteriormente (Punto 1.4.1 fisiología del estrés). Se puede observar cetosis, hiperlipidemia, hiperglucemia, acidosis metabólica, leucocitosis, entre otros. (Dierauf y Gulland, 2001; Drucker, 2005; Arce *et al.*, 2006; Cunningam y Klein, 2009).

Sin embargo, existen métodos no invasivos para la medición del cortisol en diferentes fluidos biológicos como la saliva, las heces y la orina que son de gran ayuda en el monitoreo de hábitats y especies tanto silvestres como en cautiverio; así como las repercusiones que las actividades humanas puedan tener sobre éstas (Dierauf y Gulland, 2001; Brousset *et al.*, 2005), como por ejemplo, la contaminación y ecoturismo en leones marinos (*Zalophus californianus californianus*) en el Golfo de California (Pedernera-Romano *et al.*, 2006), fragmentación del hábitat de los monos araña (*Ateles geoffroyi*) y aulladores (*Alouatta pigra*) en la península de Yucatán (Martínez-Mota *et al.*, 2007; Rangel-Negrin *et al.*, 2009), evaluación de planes de enriquecimiento en felinos cautivos (Brousset, 2003), el impacto que los visitantes tienen sobre las especies exhibidas en zoológicos (Villanueva, 2005; Pifarré *et al.*, 2012), diferencias entre alojamientos y tipos de encierro que sean más eficientes para incrementar el bienestar animal como por

ejemplo el tamaño, el tipo de luz (solar o artificial), plantas, juguetes o distractores (Luna, 2012).

## **1.5. Entrenamiento Animal**

El entrenamiento de los animales es un proceso antropogénico antiguo, que se remonta a la época en que el hombre domesticó al lobo hace 12 000 años y ha ido modificándose el concepto desde entonces. Las sociedades primitivas no solo ocuparon a los animales como fuente de alimento sino que se les entrenó para que sirvieran como medio de transporte y fuente de trabajo (Wood, 2005).

El método de entrenamiento se basaba en la dominación de los animales, es decir, el entrenador ocupaba el lugar del macho alfa dentro de la jerarquía. Este tipo de entrenamiento, aunque era principalmente *castigo*, se justificó basándose en la imitación los procesos naturales y por lo tanto, no se consideró que causaran problemas de bienestar animal. En este momento, la investigación sobre el *castigo* animal ha demostrado que es ineficaz como método de entrenamiento de animales, ya que los *comportamientos* no deseados tienden a reaparecer. En cambio, las ideas que la psicología comparada nos ha dado sobre el *aprendizaje* animal, abrieron nuevas posibilidades de entrenamiento para los animales de manera más eficiente (Young, 2002).

Fue hasta la década de 1940 que Skinner y sus estudiantes empezaron a utilizar el conocimiento sobre el reflejo condicionado para entrenar a los animales. Skinner descubrió que podía modificar y predecir la conducta de los animales y en 1938 publicó su revolucionario libro “La conducta de los organismos”, el cual marcó una nueva era para los entrenadores. La psicología del *aprendizaje* y sus efectos sobre el

*comportamiento* fue estudiado científicamente en experimentos controlados de laboratorio (Young, 2002; Wood, 2005).

Ya en la década de los cincuenta, Hediger estableció que “uno de los problemas más urgentes en la biología de los jardines zoológicos estriba en la falta de ocupación de los animales cautivos, proponiendo que el juego y el entrenamiento deberían utilizarse como una terapia ocupacional. Por lo anterior los albergues en los zoológicos deberían contener todo lo que fuera importante para que un animal se comporte de la misma forma que los individuos en vida libre. Posteriormente, en los años setenta, Osborne demostró que muchos de los animales prefieren trabajar por el recurso (comida) que obtenerlo libremente sin realizar ningún trabajo, a este fenómeno se le denominó “*Contrafreeloanding*” (Osborne, 1977; Young, 2002; Galindoy Orihuela, 2004; Melfi, 2013).

El entrenamiento permite que los animales cooperen voluntariamente en procedimientos veterinarios y de manejo con la disminución de métodos de contención física y química; también que los animales aprendan a tolerar un *estímulo* desagradable o una situación que cause miedo y produce una mejora de la salud y aptitud física mediante la actividad física que el entrenamiento supone (Morberg y Mench, 2000; Young, 2002; Melfi, 2013).

Un animal que entienda lo que se requiere de él, a través del entrenamiento, mejor se adapta a su entorno y, posteriormente, tendrá un mejor cuidado y salud en general. Actualmente se consideran 6 razones principales para entrenar a los animales mantenidos en cautiverio en zoológicos y acuarios. (Wood, 2005)

1. Manejo y cuidado (Husbandry).

2. Ejercicio.

3. Estimulación mental.

4. Educación.

5. Investigación.

6. Diversión.

### **1.5.1. Condicionamiento Operante**

Existen dos tipos de conducta aprendida: condicionamiento clásico y operante. El primero, también conocido como Pavloviano, es un tipo de aprendizaje basado en una respuesta psicológica o involuntaria provocada por un estímulo, el *aprendizaje* juega un papel pasivo. El segundo es un tipo de aprendizaje donde la probabilidad de que un *comportamiento* específico aumente o disminuya, se debe a la consecuencia (refuerzo) que se presenta cada vez que el *comportamiento* es exhibido, por lo que el sujeto trata de asociar el placer o el desagrado de la consecuencia con el *comportamiento* exhibido, el *aprendizaje* en este caso se considera activo (Brust, 1967; Ramirez, 1999; Young, 2002; Wood, 2005; Melfi, 2013).

El condicionamiento es más difícil de establecer y a veces imposible si no existe una *motivación* o tendencia a satisfacer ciertos impulsos como el hambre, por lo que un animal con poca *motivación* adquiere un reflejo condicionado con un mayor número de repeticiones (Brust, 1967).

El condicionamiento operante depende altamente del *refuerzo*, este puede ser positivo como comida, caricias, juguetes, interacción social, etc., o negativo en el cual se debe ignorar la conducta aplicando el menor refuerzo posible (*LSR*), terminar la sesión (*Time outs*) o no dar *reforzadores positivos*. Por otro lado se puede utilizar una fuerza externa

como correas para ejercer presión para que el animal avance o se coloque en la posición indicada, en el caso de mamíferos acuático se pueden utilizar redes dentro del estanque para el cambio de estanques o entrada a cuarentenas (Brust, 1967; Ramirez, 1999; Young, 2002; Wood, 2005).

Dentro del *refuerzo positivo* existen 2 tipos: a) el *reforzador primario* que es algo que el animal necesita para sobrevivir, una necesidad biológica, por ejemplo, alimento, agua o espacio. b) el *reforzador secundario*, que a diferencia del anterior, es lo que el animal quiere o desea como el contacto físico, juguetes o interacción social. Por esta razón, los planes de entrenamiento por medio del condicionamiento operante son diseñados para que el animal aprenda un comportamiento tan rápido y eficientemente como sea posible (Brust, 1967; Ramirez, 1999; Young, 2002; Wood, 2005).

## **2. HIPÓTESIS**

El manejo médico por medio del condicionamiento operante disminuye las concentraciones de cortisol sanguíneo (hormona del estrés) en manatís del Caribe (*Trichechus manatus manatus*) mantenidos en cautiverio en el Acuario de Veracruz A.C.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Determinar el nivel de estrés, a través de la medición de las concentraciones de cortisol en sangre, durante el manejo médico para toma de muestras sanguíneas, morfometrías y ultra sonido a manatíes del Caribe (*T. manatus manatus*).

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la concentración de cortisol presente en la sangre de Manatíes del Caribe (*T. manatus manatus*) en cautiverio durante el manejo médico convencional.
- Medir la concentración de cortisol sanguíneo en manatíes del Caribe (*T. manatus manatus*) en cautiverio durante el proceso de entrenamiento, para establecer si disminuye o aumenta durante el manejo médico por medio del condicionamiento operante.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Área de Estudio**

El trabajo se realizó dentro de las instalaciones del Acuario de Veracruz A.C que se encuentra en el puerto de Veracruz, sobre el bulevar Manuel Ávila Camacho s/n, Col. Flores Magón, Veracruz, sobre el playón de hornos. Se encuentra en las coordenadas son 19° 11' 14.8" latitud norte y 96° 07' 19.8" longitud oeste. Su construcción se inició en 1990 y fue abierto al público en 1992, en el año de 1998 se remodeló completamente (Acuario.com).

### **4.2. Instalaciones o Encierro**

El Acuario de Veracruz cuenta con un "Manatiario", que almacena un total de 370000 litros de agua salobre, constituido por dos partes: una pecera de exhibición de 3.5 m de profundidad y una cuarentena de 2 m de profundidad. El estanque de cuarentena se comunica al estanque de exhibición mediante una compuerta que mide 1.20 m (Figura 5).

Las instalaciones se construyeron en el año 2000 como parte de la primera fase de remodelación y ampliación, de acuerdo a los requerimientos para el mantenimiento de los mamíferos acuáticos en cautiverio según la NOM-135-SEMARNAT-2004.

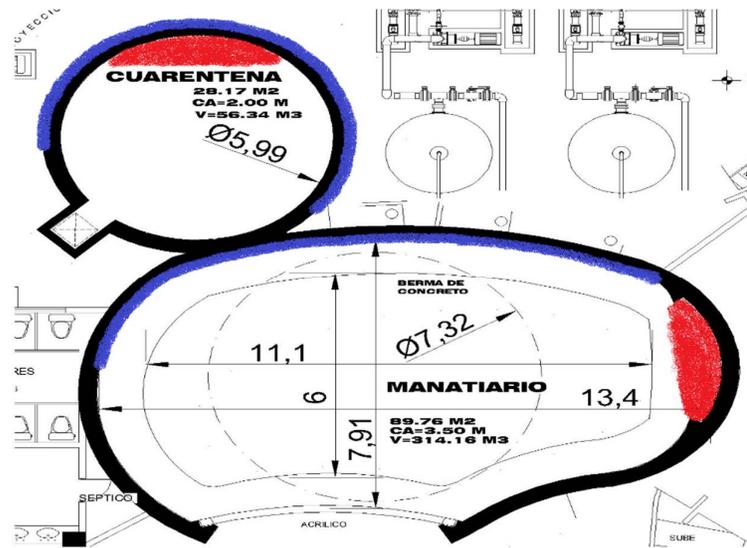


Figura 5.- Croquis de las instalaciones de manatiario. Se muestran las dimensiones tanto de la cuarentena como de la exhibición; la parte azul representa el área técnica, que es el sitio donde se posicionan a los animales para el entrenamiento de la toma de muestra de sangre; en la parte roja se representa el área de la plataforma.

El estanque de exhibición cuenta con dos ángulos de observación para el público uno donde se pueden apreciar a los ejemplares por debajo del agua (acrílico principal) y el otro solo a media agua (acrílico secundario); sobre éste existe una plataforma de 2.3 m de ancho. A la parte técnica (área de trabajo donde solo tiene acceso el personal) se ingresa por una puerta corrediza; en el extremo opuesto a los acrílicos de observación existe una banqueta de 40 cm de ancho que sirve para el tránsito del personal para la alimentación y es el lugar para el entrenamiento fuera del agua, sobre éste se encuentra un techo que deja una abertura al centro del estanque para que los animales puedan recibir los rayos del sol.

La cuarentena no contaba con ninguna estructura que permitiera al personal permanecer de pie dentro del agua (plataforma sumergible), por lo que se construyó una plataforma removible. El estanque se encuentra techado completamente y no cuenta con paredes por lo que está ventilado y el sol entra en las tardes. El pasillo que lo rodea completamente mide 1.2 m de ancho. En el lado contrario a la compuerta, que lo comunica con el estanque

de exhibición, se encuentra suspendida una grúa para facilitar la movilización (introducción y traslado) y el pesaje de los ejemplares.

### **4.3. Origen de los Organismos de Estudio**

Dentro del Acuario de Veracruz A.C, actualmente se encuentran en resguardo 5 ejemplares del manatí del Caribe (*T. manatus manatus*). Esta institución ha sido pionera en la manutención de esta especie en cautiverio ya que recibió a los primeros manatíes de una captura incidental. Así mismo fue el lugar de nacimiento de la primera cría de manatí en cautiverio en México, llamada Marina nacida en el 2004.

Los manatíes identificados como Pablo y Silvia fueron los primeros en llegar a la institución el 6 de Marzo de 1998 con una edad aproximada de 1 mes. Ambos ejemplares se capturaron incidentalmente con red de cerco en el sistema lagunar de Alvarado, cerca de la comunidad de Arbolillo. Se mantuvieron durante una semana en un corral dentro de la misma laguna esperando ver a su madre o al grupo para poder liberarlos y que no murieran. Sin embargo, al no ver a su familia en 5 días se decidió trasladarlos al Acuario para su rehabilitación.

La hembra identificada con el nombre de Costeña, fue capturada en el sistema lagunar de Alvarado en la comunidad de San Juan, el 12 de septiembre de 2002, con una edad aproximada de 3 años. Cuando llegó a la institución presentaba una amputación de la aleta pectoral derecha a la altura de la articulación húmero-cubito radial, producto de traer enredados varios cabos de nylon por aproximadamente 5 meses.

La hembra identificada con el nombre de Dominga, llegó al Acuario el 18 de Septiembre de 2002, con una edad aproximada de 3 meses. Se capturó en el sistema lagunar de Alvarado en la comunidad de Pajarillos y permaneció un mes en un corral de malla

mosquitera dentro de la misma laguna, donde se le ofrecía leche de soya y suero oral de 3 a 4 veces al día.

El macho identificado con el nombre de Fabián es la tercera cría nacida en cautiverio el 16 de Agosto de 2009, los padres son Silvia y Pablo que fueron los primeros ejemplares recibidos en el Acuario de Veracruz.

#### **4.4. Entrenamiento**

En el año 2011, la Bióloga Daniela Remes Rodríguez entrenadora del Acuario de Veracruz A.C, quien trabajó con delfines durante 3 años, comienza un plan de entrenamiento para los manatís, de manera que se inició con 2 de los ejemplares que se encontraban en el estanque de cuarentena, Costeña y Dominga; mientras que en el estanque de exhibición se encontraban los manatís Silvia, Pablo y Fabián.

Previo a comenzar el entrenamiento, se *desensibilizó* a los manatís para que tomaran el alimento de la mano del entrenador y se acercaran a la orilla del estanque con una *señal de llamada*, que consiste en golpear la superficie del agua con la mano.

El plan de entrenamiento comenzó con la modificación de la dieta, se cambiaron los horarios de alimentación recorriendo las lechugas de las 14:00 a las 16:30 horas; la “botana” se utilizó para las sesiones de entrenamiento como *reforzador primario*, la composición de la dieta completa se puede ver en el Anexo 1. La “botana” empleada (manzana, jitomate, pepino y calabacita italiana que se alterna con betabel, papa y zanahoria) se pesa individualmente, se lava y se corta en trozos de aproximadamente 2 cm de grosor. Cada manatí cuenta con un contenedor marcado con su nombre donde se coloca su ración y que se utiliza durante las sesiones de entrenamiento.

El entrenamiento comenzó condicionando el “*bridge*”, *asociando* el sonido de un silbato a la obtención de comida (*refuerzo*) y se asignaron *estaciones*. Posteriormente para el entrenamiento de la posición ventral se utilizó una *cadena* de comportamientos con ayuda de una boya unida a un tubo de PVC (“*target*”). Sin embargo, la entrenadora también se encargaba de los delfines y por cuestiones de operatividad laboral el entrenamiento se suspendió y los comportamientos entrenados fueron: *bridge*, *estación*, posición ventral y algunas *aproximaciones* para el *comportamiento* de toma de muestra de sangre y de ultrasonido.

El plan de entrenamiento está enfocado en los comportamientos médicos necesarios para el protocolo de salud; para este trabajo se tomaron los *comportamientos* de toma de muestras sanguíneas, morfometrías y realización de ultrasonido. En el Cuadro 1 se describen los criterios de los comportamientos entrenados. El primer y segundo comportamiento forman parte del *manejo* semestral contemplado en el plan de salud y dado que la institución ha sido pionera de la reproducción en cautiverio se tomó el comportamiento de ultrasonido para diagnóstico y seguimiento de la gestación.

**Cuadro 1.- Criterios utilizados para cada uno de los comportamientos médicos entrenados.**

<b>COMPORTAMIENTO</b>	<b>CRÍTERIO UTILIZADO</b>
<b>Toma de muestra de sangre</b>	Posición ventral y horizontal al entrenador, el animal se debe dejar manipular la aleta pectoral, realizar asepsia de esta para después venopuncionar y obtener la muestra necesaria.
<b>Medidas</b>	Posición ventral o dorsal (según se requiera) y horizontal o vertical al entrenador (según se requiera), el animal se debe dejar tomar las medidas morfométricas requeridas.
<b>Ultrasonido</b>	Posición ventral o lateral (según se requiera) y horizontal al entrenador, el animal se debe dejar pasar el transductor por el cuerpo y mantenerse relajado.

El entrenamiento fue realizado mediante la técnica de condicionamiento operante, puesto que los manatís contaban con entrenamiento previo solo nos concentramos en los comportamientos médicos, para este fin se utilizó un **programa de refuerzo continuo** tanto primario como secundario. Para el *refuerzo primario* se utilizaron los alimentos de la denominada “botana”, además de la facilidad de transporte y administración los animales mostraron un gran gusto por ésta. Los *refuerzos secundarios* se definieron como el “*bridge*”, las caricias y palmaditas; ambos *refuerzos son positivos*. En cambio se aplicaron *time out, time out extendido y LSR* como *reforzadores negativos* cuando un comportamiento no fue el solicitado o no cumplió con el criterio establecido para cada comportamiento.

#### **4.4.1. Ultrasonido**

Para el comportamiento de toma de ultrasonido se utilizó un equipo portátil SonoSite 180PLUS and SonoHeart Elite ®. Se inició con la *desensibilización* al sonido y las vibraciones que el transductor provoca cuando está dentro del agua.

El manatí se debe colocar en posición decúbito ventral manteniendo el vientre en la superficie del agua. Al iniciar la sesión se ponen en *estación* a los manatís y se da la indicación a uno de ellos para que se acerque a la plataforma y utilizando el *estímulo discriminativo (SD)*, que se designó para el giro en el entrenamiento previo, para que gire sobre su eje y se posicione a lo largo de la plataforma. Una persona realiza el ultrasonido mientras que las otras sostienen la cabeza y el pedúnculo con la finalidad de mantenerlo recto sobre la superficie del agua y ayudarlo a levantar la cabeza para respirar (Figura 6).



Figura 6.- A la derecha se observa la toma de ultrasonido dentro del estanque de cuarentena, este se realiza por fuera del estanque mientras que los entrenadores se encuentran en la plataforma con el manatí. A la izquierda se observa la toma de ultrasonido en el estanque de exhibición, este se realiza con las 3 personas dentro del agua y el aparato de ultrasonido suspendido en un soporte unido al techo.

Durante las primeras sesiones se introdujo el transductor en el agua mientras los animales permanecían en *estación*, cada *aproximación* tuvo como meta que el animal permaneciera completamente relajado; una vez que los animales permanecieron tranquilos en su *estación* se procedió a *desensibilizar* la presencia de personas en la plataforma y que el animal realizara el giro dentro de ésta, para colocarse en posición ventral, con ellos presentes; las *aproximaciones* se iniciaron con una persona y se fueron introduciendo otras 2, la primer persona en entrar al agua es la que proporciona el refuerzo mientras los demás permanecen por detrás. Una vez concluida esta parte se procedió a pasar el transductor por la parte ventral del animal y cuando el comportamiento fue *aprendido* se realizaron los ultrasonidos normales para la visualización de las estructuras internas.

#### 4.4.2. Medidas

Para el comportamiento de medidas se utilizó una cinta métrica de plástico de 4 m de largo y un formato donde se anotan todas las medidas tomadas, ver Anexo 2. Se inició con la *desensibilización* al contacto de la cinta con la piel en la parte ventral del cuerpo y la cabeza.

La toma de medidas se hace en dos fases: la primera corresponde a las medidas de la cabeza y se realiza con 2 personas desde la orilla del estanque, una persona levanta la cabeza y la otra toma las medidas; la segunda corresponde a las medidas del cuerpo y se realiza con 3 personas en la plataforma que se colocan en la misma posición para realizar el ultrasonido (Figura 7).



Figura 7.- Toma de medidas de cuerpo dentro del estanque de exhibición, se observa una de las primeras aproximaciones con 2 personas para la desensibilización a la cinta métrica.

Para las medidas de cabeza se inició tomando la barbilla y levantando ligeramente la cabeza hasta sacarla completamente del agua mientras el manatí se encuentra en *estación* y se les fue pasando la cinta por diferentes partes de la cabeza, cuando permanecieron relajados con la cinta se comenzó a hacer simulaciones de las medidas a tomar hasta que estuvieran relajados el mayor tiempo posible. Para las medidas del cuerpo se inició

ocupando la posición en plataforma pasando la cinta por el cuerpo y posteriormente haciendo la simulación de la toma de medidas de circunferencia y largo del cuerpo hasta que el animal permaneció relajado durante la toma de todas las medidas.

#### 4.4.3. Toma de Muestra de Sangre

Para el comportamiento de toma de muestra de sangre se utilizó un estilete de acero inoxidable, material para desinfección, aguja hipodérmica calibre 21G con punta roma, aguja hipodérmica calibre 22 Vacutainer ®. Se inició con la *desensibilización* de la aleta a la manipulación, desinfección y venopunción.

Para este comportamiento se necesitó de la presencia de 2 personas, una se encarga de sujetar la aleta pectoral y presentarla a la persona que manipula, desinfecta y realiza la venopunción (Figura 8).



Figura 8.- Toma de muestra de sangre en el estanque de exhibición, para mantener el comportamiento se realiza la desinfección completa y la venopunción pero sin extraer sangre.

Las *aproximaciones* para este comportamiento iniciaron con la caricia y presión con la uña en el sitio de venopunción, cuando el manatí se mostró relajado se continuó con la desinfección de la zona y cuando relajó la postura de la aleta se combinó la desinfección con la punción con el estilete, con *aproximaciones sucesivas* se aumentó la fuerza de

punción hasta que cada manatí lo tolero. Entonces el estilete se substituyó por una aguja de punta roma y posteriormente por la aguja completa para penetrar la piel. Por último, se procedió a la venopunción para obtener la muestra de sangre. Durante todo el procedimiento el manatí debería mantener la posición decúbito ventral con la aleta pectoral relajada, es decir, sin jalarla, girarla o moverla.

#### 4.5. Colecta de las Muestras de Suero

A todos los manatís se les tomaron muestras de sangre del plexo braquial en la cara anterior de la aleta dorsal, que se encuentra en el espacio interóseo entre el radio y el cúbito (Figura 9). Primero se palpó el espacio interóseo entre el radio y el cubito, a continuación se realiza la desinfección de la zona con clorhexidina al 10%, se embroca con yodo y se realiza la venopunción. La punción se puede realizar con un dispositivo alado Vacutainer ® en el caso de animales jóvenes y hembras de talla menor o para machos y hembras de gran tamaño un adaptador y aguja de calibre 22 Vacutainer ®.

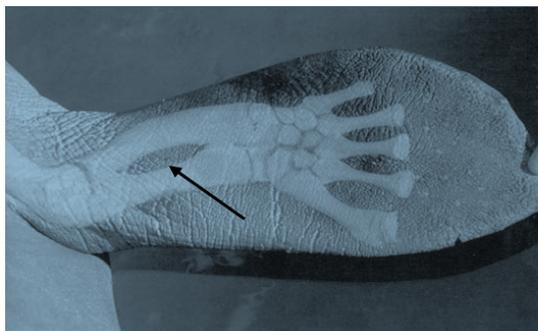


Figura 9.- Sitio de punción en la aleta pectoral de un manatí, tomado de Dierauf, 1990.

Cada muestra se etiquetó con los siguientes datos: nombre del ejemplar, fecha, tipo de *manejo* (convencional o condicionado) y hora de toma de la muestra. Una vez que la muestra se temperó fue centrifugada a 3000 revoluciones por minuto (rpm) por 15

minutos. Posteriormente se procedió a coleccionar el suero con una pipeta Pasteur plástica de 1 ml en criotubos de tapón de rosca con capacidad de 1.2 ml, etiquetados con los mismo datos que los tubos donde se colectó la sangre. Los sueros se mantuvieron en congelación a -10°C en el Acuario de Veracruz A.C hasta su traslado al laboratorio del Departamento de Fisiología del CINVESTAV-IPN, para la realización de la prueba de radioinmunoanálisis (RIA).

Para la determinación de los niveles de cortisol se tomaron muestras de sangre en 2 etapas durante el año 2012 y el 2013.

En la primera etapa se tomó una muestra sanguínea de cada animal durante el *manejo* forzado o convencional, primer semestre del año 2012, que se les realiza como parte del manejo semestral incluido en el plan de salud que tiene el Acuario de Veracruz A.C para los manatíes. Este procedimiento consiste en aislar a los manatíes a manejar en el estanque de cuarentena, sellar la compuerta y bajar el nivel del agua hasta que quedan totalmente en seco. Una vez que la cuarentena está completamente seca los médicos junto con personal de mantenimiento y los buzos (aproximadamente 7 personas) bajan y realizan las morfometrías, toma de muestra sanguínea, revisión física general y pesaje de cada organismo, el personal extra (mantenimiento y buzos) se utiliza como apoyo durante la contención física de los animales para la toma de muestras sanguíneas y para colocarlos en la camilla que se sujeta a una grúa con la báscula y así poder pesarlos. Este manejo se llevó a cabo en aproximadamente 3 horas por cada 2 ejemplares y no fue posible realizarlo con todos los manatíes el mismo día.

Después de este *manejo* convencional o forzado, los manatíes se sometieron a un plan de entrenamiento y no se les realizó ningún otro tipo de *manejo* forzado durante el periodo de entrenamiento. Para continuar con la segunda fase se tomaron muestras sanguíneas

sucesivas de los mismos manatís mediante el entrenamiento médico, esto quiere decir no sacar al animal, empleando un máximo de 3 personas y un tiempo de 3 horas en la maniobra completa de todos los manatís. Después de obtener la primera muestra de sangre voluntaria se tomaron muestras sucesivas según sea el avance del entrenamiento de sangre y de los demás comportamientos médicos. Una vez que el *comportamiento* ya estuvo *aprendido* se tomaron las últimas muestras (Figura 10).

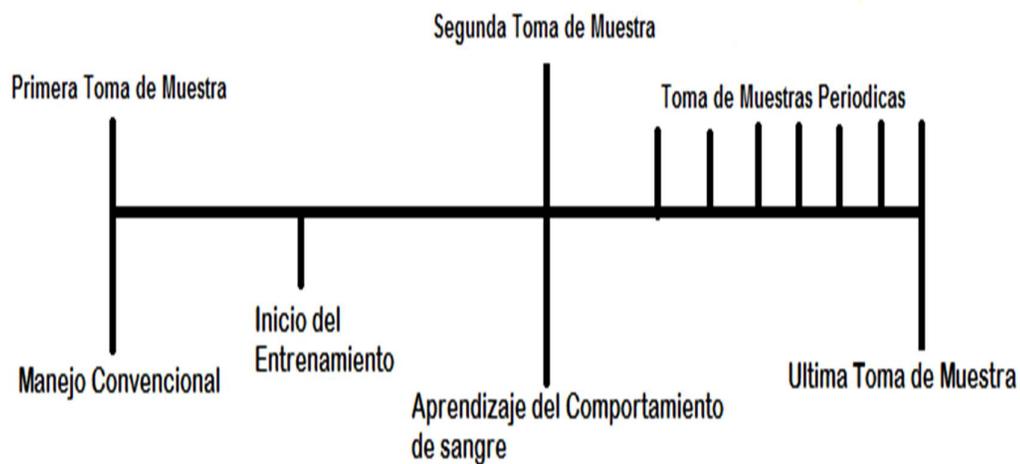


Figura 10.- Resumen del orden en que se tomaron las muestras de sangre.

#### 4.6. Medición de la Concentración de Cortisol en Suero

La determinación del cortisol se realizó mediante la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida con yodo I<sup>25</sup>. Se ocupó un juego de reactivos comercial de patente (Cot-CT2 Bio International®, France) y se siguieron las indicaciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo según el producto es de 4.6 nmol/L, con una especificidad de 100% para la detección directa de cortisol en suero, Villanueva, (2008) valido esta prueba para suero en manatís del Caribe (*T. manatus manatus*).

Todas las muestras se midieron por duplicado en tubos preparados con anticuerpos monoclonales de conejo específicos para cortisol a los que se le agregó una cantidad conocida de cortisol marcado con el yodo radiactivo (500  $\mu$ l) y una cantidad de la muestra de suero (20  $\mu$ l). Posteriormente, las muestras se leyeron en un contador gamma (Contador Cobra II Gamma Counting System, Packard Int. Co®) durante 1 minuto. Las concentraciones de cortisol se obtuvieron mediante la curva estándar que se obtuvo por regresión lineal utilizando los porcentajes de unión y la concentración de los estándares del juego de reactivos utilizado.

Se corrió un primer Radioinmunoanálisis (RIA-1) siguiendo las indicaciones del proveedor para la determinación directa de suero y se utilizó una curva estándar con 7 puntos: 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 75 nmol/L. También se corrió un segundo Radioinmunoanálisis (RIA-2) siguiendo las indicaciones del proveedor para la determinación en saliva y se utilizó una curva estándar de 7 puntos: 0, 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, y 62.50 nmol/L, esto para poder detectar concentraciones más bajas y ampliar el rango de medición.

Una vez obtenida la concentración de cortisol sanguíneo (Hormona que se utiliza como marcador de estrés) en cada uno de los 2 manejos (convencional y entrenamiento) se determinó si las concentraciones de cortisol aumentaron o disminuyeron durante el entrenamiento en comparación a la concentración obtenida al realizar el manejo convencional.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Entrenamiento

El 7 de julio del 2012 fue el inicio de la segunda etapa del presente trabajo que tuvo una duración de 45 semanas. Durante las primeras semanas se obtuvo el adiestramiento y la teoría necesaria para apoyar en el entrenamiento de estos *comportamientos*, en las semanas posteriores se puso en práctica la teoría y se participó activamente en las sesiones diarias.

Las sesiones de entrenamiento se iniciaron alrededor de las 11:30 horas. La primera sesión se utilizó para hacer un reconocimiento del estado de atención y *motivación* que posee cada manatí y realizar ajustes en cuanto al plan de trabajo de ese día, para esto se colocan en posición de *estación* y se les da un poco de comida (*magnitud* baja). Las sesiones terminaron a las 17:30 horas, aunque hubo días en que se extendieron hasta las 18:00 horas. Otros en las que se acortaron a las 15:00 horas con el fin de terminar las sesiones diarias positivamente y el *comportamiento* se aprendiera evitando así la *frustración*. De igual manera la duración de cada sesión fue muy variable durante todo el periodo; en promedio una sesión corta tiene una duración de 10 a 15 minutos y una larga puede extenderse hasta 45 minutos, este tiempo también varía según el *comportamiento* entrenado (Cuadro 2).

**Cuadro 2.- Promedio de tiempo empleado en cada comportamiento por animal, en el caso del comportamiento de ultrasonido, el tiempo varía según lo que se desea ver.**

<b>COMPORTAMIENTO</b>	<b>PROMEDIO DE DURACIÓN</b>
Toma de Muestra de Sangre	10 - 15 min
Medidas	30 - 40 min
Ultrasonido	15 - 45 min

El número de sesiones diarias varió según el avance mostrado por el manatí con cada *comportamiento*, al inicio del entrenamiento las sesiones fueron tantas como el número de *aproximaciones sucesivas* necesarias para que el *comportamiento* fuera aprendido. Una vez aprendido el comportamiento, las sesiones disminuyeron por consiguiente solo se ocuparon las sesiones para mantener y mejorar los tiempos de permanencia, posiciones o estado de relajación del animal.

Se determinó que el *comportamiento* más dificultades representa en el *aprendizaje* es el de sangre, por lo que se decidió llevarlo a cabo de 3 a 4 veces por semana intercalándolo con los otros *comportamientos*.

Un día a la semana (lunes, día de descanso de la entrenadora) solo se realizaron repeticiones generales, es decir, *reforzar* las *estaciones*, caricias, seguimiento y juguetes o enriquecimiento. Los juguetes consisten en aros de plástico (ula-ula), que se dejan flotando en el agua con comida en el centro y pelotas con agua dentro. Algunos de los manatís solo se acercaban a los objetos para comer pero tanto Fabián como Dominga se metían en el aro colocándolo a la altura de las axilas para nadar con él y morderlo. Además, como parte del enriquecimiento en algunas ocasiones se le colocaron las

lechugas atoradas en un tapete de plástico, que se coloca en el fondo del estanque para que ellos lo ramoneen. Adicional a esto se *desensibilizó* a los animales para el cepillado de sus cuerpos para retirar algas y detritos celulares.

Todos los manatíes completaron exitosamente el entrenamiento de los 3 *comportamientos* médicos y el cepillado de sus cuerpos. Sin embargo, cada uno tuvo un *aprendizaje* diferente en cuanto a los tiempos y *adaptación* a cada *manejo*.

### **5.1.1. Ultrasonido**

Los manatíes Silvia, Dominga y Fabián *aprendieron* rápidamente el comportamiento de ultrasonido por lo que las sesiones de mantenimiento se concentraron en incrementar el tiempo de permanencia en la posición y este tiempo depende del tiempo que el médico veterinario necesite para realizarlo. Pablo tardó en girarse dentro de la plataforma, pero no mostró ningún problema una vez *aprendido* esto. Costeña fue la más sensible al sonido y vibraciones por ello las sesiones de *desensibilización* fueron dirigidas a ella hasta que permaneció en *estación*. Sin embargo, aunque también mostró cierta *aversión* a girarse en la plataforma el reto fue que permaneciera en la posición con el ultrasonido encendido, por lo que se necesitaron varias sesiones para que lo aceptara. El comportamiento fue aprendido por todos los manatíes en 10 semanas.

### **5.1.2. Medidas**

Para las medidas de cuerpo, una vez que aprendieron a girarse en la plataforma fue fácil la *desensibilización* de la cinta métrica en el cuerpo, sin embargo, para Costeña también tomo más tiempo pues presentó una mayor *aversión* al roce con la cinta métrica, comparada con los demás.

En cuanto a las medidas de cabeza el reto más grande ya hubo que *desensibilizar* la zona de los ojos para que al tomar las medidas cerca de esta zona no se asustaran y bajaran la cabeza. Por otro lado, la zona de la boca presentó un punto de confusión ya que los manatís pensaban que al acercar las manos a la boca era comida lo que se traía en las manos y trataban de morder la cinta métrica, pero con unas pocas sesiones entendieron la diferencia y todos completaron el entrenamiento en 6 semanas.

### **5.1.3. Toma de Muestra de Sangre**

Este comportamiento fue el más tardado en *aprender* para la mayoría de los manatís, porque la *aversión* mostrada hacia la venopunción fue muy alta. La desinfección de la zona no representó mayor dificultad.

Dominga fue la primera en *aprender* el comportamiento y de la cual se obtuvo la primera muestra sanguínea voluntaria en una semana posterior al inicio del entrenamiento, con un mínimo de sesiones se fue manteniendo el comportamiento y la toma de muestras sanguíneas fue relativamente constante.

Silvia fue la tercera en *aprender* el comportamiento a las 8 semanas, sin embargo debido a que se encontraba gestando su 5° cría, no podía mantenerse en posición ventral por mucho tiempo, por lo cual una persona en la plataforma sostenía su aleta caudal. Una vez que nació la cría se le retiró este apoyo y la toma de muestras sanguíneas fue relativamente constante. Los entrenamientos solo se suspendieron durante el primer mes de lactación, sin embargo, el retomar el comportamiento no represento mayor problema.

Pablo y Fabián tardaron 9 y 5 semanas, respectivamente, en *aprender* el comportamiento pero ambos tuvieron una *regresión* y se reinició con las primeras *aproximaciones*. Cuando se logró avanzar a la venopunción nuevamente se *estancaron en el aprendizaje*

pues al momento de terminar la desinfección se retiraban e incluso no regresaban a la estación. Por lo cual se decidió hacer una combinación de *aproximaciones* y así retomar el comportamiento para *desensibilizar* la zona, pero sin mostrar un patrón definido para evitar que se quitaran de la posición. La toma de muestras se hizo cada 15 días con el fin de mantener la conducta y no caer nuevamente en una *regresión*.

Costeña fue la que tuvo más problemas para *aprender* el comportamiento, al tardar 20 semanas en darse por *aprendido*; la diferencia entre cada *aproximación* fue mínima. También presentó una *regresión del aprendizaje* a tal grado que se tuvo que enseñar la posición decúbito ventral nuevamente, al final se decidió que la toma de muestras se hiciera cada 15 días con el fin de mantener la conducta y evitar así una *regresión*.

## 5.2. Muestras de Suero

En total se tomaron 42 muestras sanguíneas de 5 ejemplares del manatí del Caribe (*Trichechus manatus manatus*) durante los años 2012 y 2013. De las muestras de sangre 5 pertenecen al *manejo* convencional y fueron obtenidas durante los meses de abril y mayo del 2012 como parte del *manejo* semestral del plan de salud (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Fecha en la que fue tomada la muestra de sangre perteneciente al manejo convencional o forzado.

MANATÍ	FECHA (2012)
Pablo	Abril 25
Silvia	Mayo 11
Costeña	Mayo 9
Dominga	Mayo 4
Fabián	Abril 25

Mientras que las muestras de sangre que se tomaron durante el entrenamiento fueron recogidas a partir del mes de junio del 2012 hasta mayo del 2013 (Cuadro 4).

**Cuadro 4.- Fecha y número de muestras sanguíneas obtenidas de cada manatí durante el periodo de entrenamiento.**

MANATÍ	2012					2013				
	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY
<b>Pablo</b>	-	-	13	-	3	-	-	7 y 22	7 y 19	4 y 15
<b>Silvia</b>	-	-	11 y 20	4	28	-	16	20	-	3
<b>Costeña</b>	-	-	-	-	28	-	15	-	4 y 19	3 y 15
<b>Dominga</b>	12	10	27	-	28	17	15 y 27	22	-	-
<b>Fabián</b>	-	10	-	-	-	-	17	6 y 22	5 y 19	3 y 15

Todas las muestras se trataron de tomar durante un mismo rango de hora para evitar diferencias en las concentraciones de cortisol, debido al ciclo circadiano, sin embargo esto no fue posible para todas las muestras y por lo tanto se tomaron en 2 periodos. 33 de las muestras se tomaron entre las 11:00 y las 15:00 horas y las 9 muestras restantes fueron de entre las 15:30 y las 18:00 horas.

### 5.3. Concentraciones de Cortisol

De 42 muestras analizadas con el RIA-1, sólo 13 mostraron concentraciones de cortisol que entraron en la zona de confianza de la curva estándar. Los valores de las muestras restantes se encontraron por debajo del límite de detección del juego de reactivos (1.58 ng/ml). Todas las concentraciones de cortisol que corresponden al manejo convencional

o forzado fueron las concentraciones más altas detectadas, observándose que el promedio fu de 3.49 ng/ml con una desviación estándar (D.E) de  $\pm 0.71$  ng/ml, siendo la concentración más alta de 4.51 ng/ml y la más baja de 2.51 ng/ml (Figura 11).

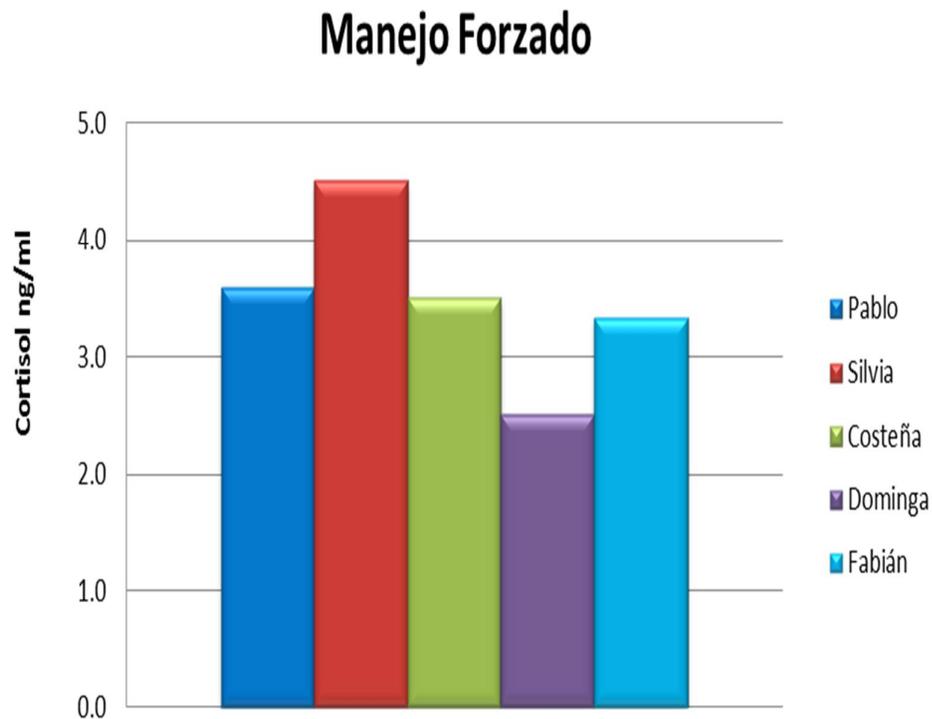


Figura 11.- Concentración de cortisol sérico de cada uno de los manatés correspondiente con la muestra tomada durante el manejo convencional o forzado.

Las 8 muestras restantes, que entraron dentro del límite de detección, corresponden al periodo de entrenamiento de los 5 manatés. El valor más alto detectado para este manejo fue de 2.16 ng/ml, mientras que el más bajo fue de 1.58 ng/ml, con un promedio de 1.71 ng/ml y una D.E. de  $\pm 0.21$  ng/ml (Figura 12).



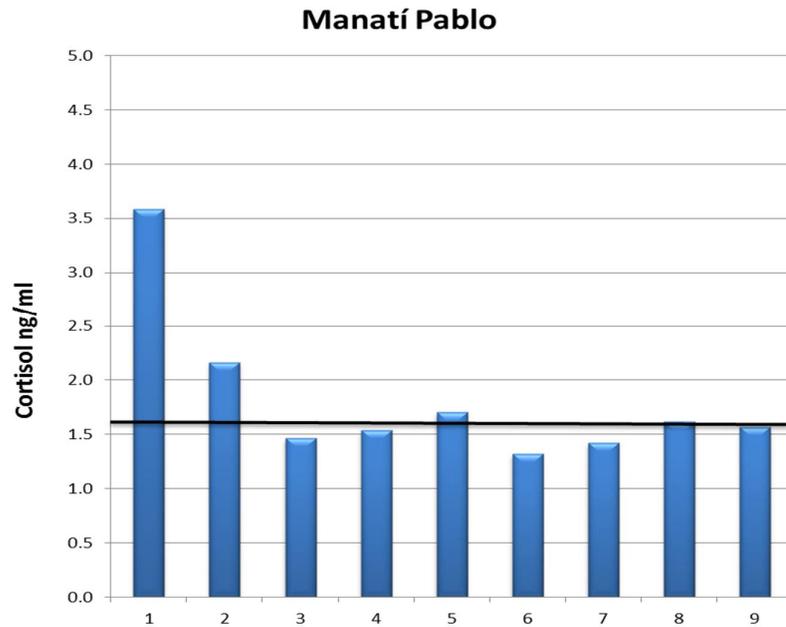


Figura 13.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Pablo; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 9 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico.

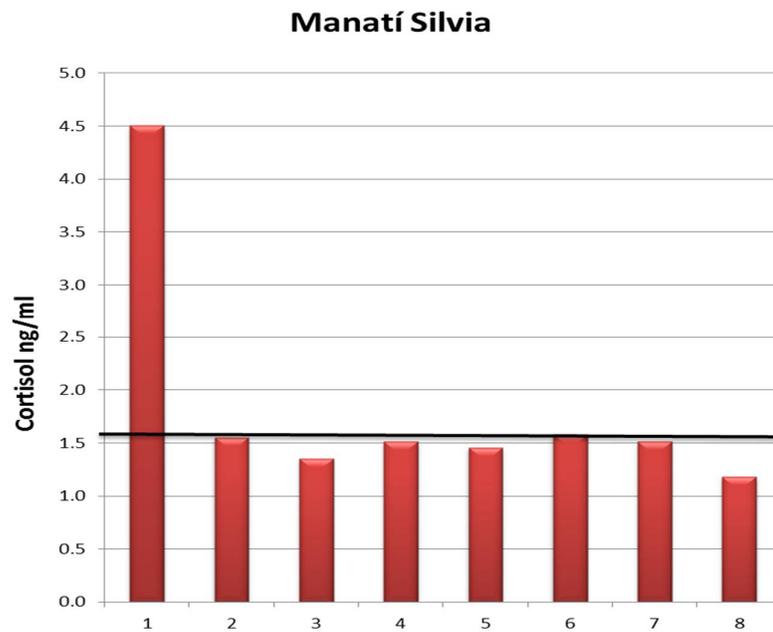


Figura 14.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Silvia; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 8 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico.

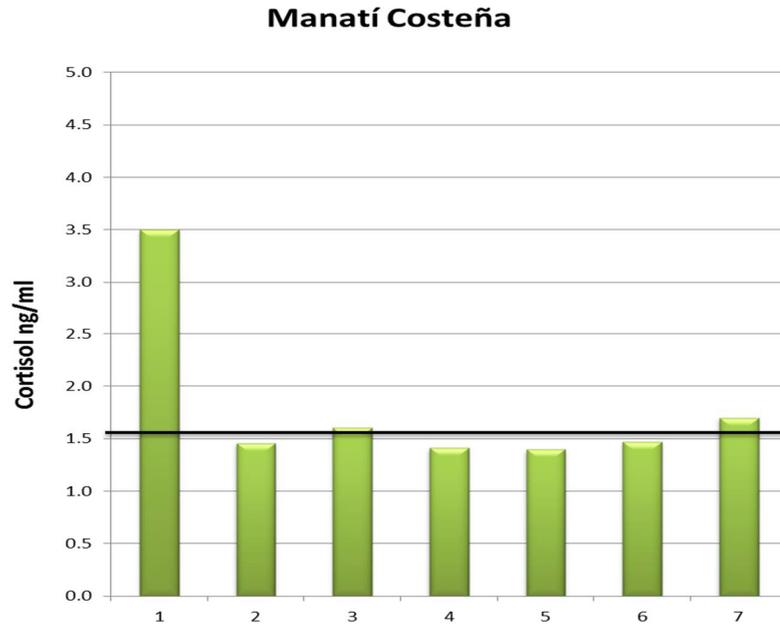


Figura 15.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Costeña; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 7 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico.

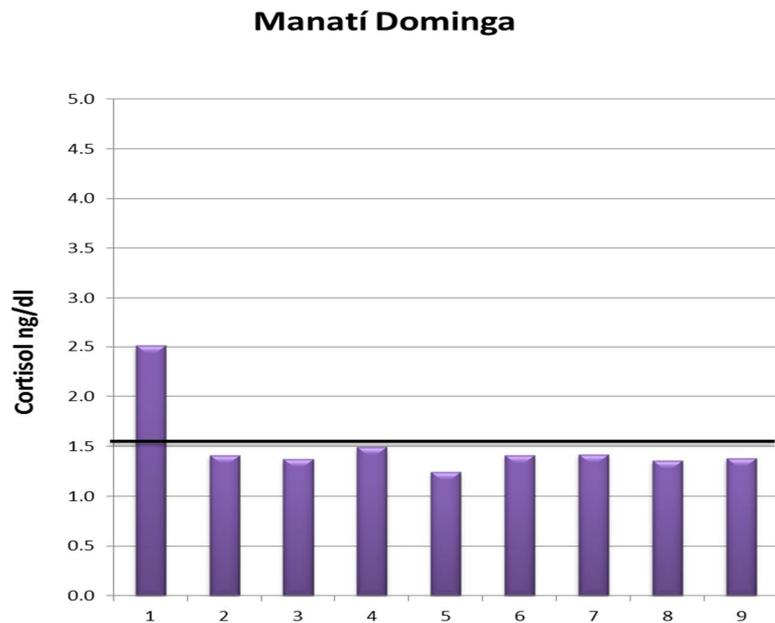


Figura 16.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Domingo; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 9 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico.

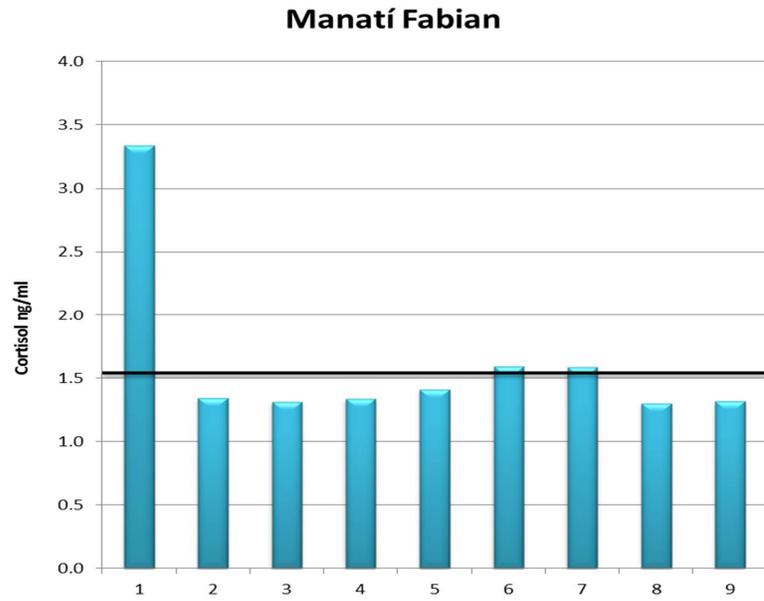


Figura 17.- Concentraciones de cortisol sanguíneo del manatí Fabián; La columna marcada con el número 1 representa el manejo forzado, del número 2 al 9 son las correspondientes al manejo voluntario o entrenamiento en orden cronológico.

Los resultados del RIA-2 fueron similares a los obtenidos por el RIA-1, por lo que no se tomaron en cuenta en este estudio debido a que RIA-1 se realizó sin modificación de la técnica validada para esta especie por Villanueva (2008).

## 6. DISCUSIÓN

Según Ochoa (2012), México cuenta, hasta el 2011, con 10 sitios donde se mantienen en cautiverio a 29 ejemplares de la subespecie del Caribe (*T. manatus manatus*). Estas instituciones además de apoyar la investigación, contribuir a la educación ambiental y colaborar con el rescate y rehabilitación de huérfanos, débiles o heridos, también tienen como objetivo reproducir y/o recuperar la especie. Del total de las instituciones, se sabe que Dolphin Discovery, Xcaret y Xel-Ha contemplan un plan de entrenamiento. Aunque el Acuario de Veracruz fue pionero en el mantenimiento en cautiverio del manatí, fue hasta el 2011 que se inició su entrenamiento de los ejemplares, y es gracias a su apoyo en la colaboración del presente estudio, que finalmente se implementa un plan de entrenamiento médico para poder facilitar y agilizar los manejos médicos contemplados en el plan de manejo que la institución tiene de la especie.

Brando (2010) sostiene que el entrenamiento de comportamientos médicos, es una excelente herramienta en la práctica de la medicina veterinaria, al facilitar los procedimientos de monitoreo, diagnóstico y tratamiento. Al comienzo de este trabajo, las revisiones médicas y toma de muestras sanguíneas se realizaban cada 6 meses, pero sí se requería realizar algún manejo extra como la aplicación de tratamientos, curaciones, implante de micro chip, lectura de micro chip, diagnósticos de gestación, entre otros, se tenía que programar según a la disponibilidad de los encargados del área y del personal de apoyo. Sin embargo, con el entrenamiento se comprobó que los procedimientos veterinarios como la toma de muestras, ultrasonido y medidas, se pueden realizar con mayor frecuencia y con menor riesgo de lesionar al animal y al personal.

Dos Santos *et al.* (2005), menciona que el tiempo de permanencia en la toma de ultrasonido fue de 30 minutos, mientras que en este estudio se logró un mayor tiempo de permanencia, siendo de 45 min. En el presente estudio las medidas se obtuvieron dos semanas antes que en el trabajo de Dos Santos y colegas.

Colbert *et al.* (2001) y Bauer *et al.* (2010), si obtuvieron muestras de sangre a diferencia de Dos Santos, sin embargo, no mencionan el tiempo que tardaron en dar por aprendido el comportamiento. Durante el presente estudio el comportamiento de toma de muestras de sangre fue el que más variaciones presentó, con un intervalo de entre 1 y 20 semanas entre los ejemplares para ser aprendido el comportamiento.

Negrete (2003), entrenó un grupo de 4 manatíes en el Centro de Convivencia “YUMKA“, por un lapso de 15 semanas y en ese periodo de tiempo no fue suficiente, ya que la mayoría de los comportamientos médicos no fueron aprendidos por todos los ejemplares. Sin embargo, al igual que en el presente estudio, se demostró que la técnica de condicionamiento operante con refuerzo positivo es altamente efectiva y que los manatíes se adaptan rápidamente a pesar de ser una especie considerada como tímida. Es evidente que el entrenamiento de los manatíes puede facilitar los procedimientos veterinarios y la investigación de los procesos biológicos para un mayor entendimiento de la especie y así diseñar planes de manejo en cautiverio y conservación de especies en vida libre.

Colbert *et al.* (2001) y Bauer *et al.* (2010), iniciaron el entrenamiento de dos ejemplares de manatíes en cautiverio por medio del condicionamiento operante; estos autores observaron que el entrenamiento permite una mayor comodidad y facilidad para la toma de muestras biológicas y medidas, esto ha aumentado las posibilidades de la evaluación de la salud, investigaciones fisiológicas y recopilación de datos biológicos de referencia en la subespecie de la Florida (*T. manatus latirostris*). Este trabajo es la base para las

investigaciones de este tipo en la subespecie del Caribe (*T. manatus manatus*) pues al ser subespecies con diferencias morfológicas y de distribución, es probable que también existan diferencias fisiológicas y de comportamiento.

Los estudios sobre las concentraciones de cortisol y su repercusión en el estado de salud de los manatíes es limitado y la mayoría han sido realizados en la subespecie de Florida (*T. manatus latirostris*). El primero de los trabajos fue realizado por Ortíz *et al.*, (1998), donde obtuvieron un promedio de 1.5 ng/ml  $\pm$  0.4; los ejemplares en el estudio fueron sometidos a una privación de agua dulce y se observó un incremento en las concentraciones de cortisol durante las horas de privación.

Manire *et al.*, (2003), midieron nuevamente las concentraciones de cortisol sanguíneo en esta especie. Los manatíes dentro de este trabajo fueron entrenados para proporcionar muestras sanguíneas voluntariamente y se sometieron a la simulación de transporte donde se midió el cortisol liberado a las 4.5 y 7.5 horas. Se determinó un promedio de 2.0 ng/ml basal con un incremento de 8 ng/ml y 21 ng/ml, respectivamente. Por otro lado Tripp *et al.*, (2011), clasificaron a los manatíes de su estudio según el estado de salud en tres categorías, donde los saludables o cautivos tuvieron un rango de 1 a 8 ng/ml, mientras que los saludables rehabilitados con un rango de 2 a 12 ng/ml y por último los enfermos un rango de 10 a 53 ng/ml. Dado que estas concentraciones fueron obtenidas por métodos diferentes y diferentes juegos de reactivos del RIA y con una subespecie diferente a la de este estudio no se puede realizar una comparación. Sin embargo, los valores de cortisol en sangre encontrados en los manatíes en este trabajo son cercanos a los hallados en la subespecie de la Florida entrenados y que en este caso se encuentran dentro de la categoría de saludables o cautivos al igual que los manatíes participantes en el presente estudio.

Los únicos estudios en México donde se miden las concentraciones de cortisol en la subespecie del Caribe (*T. manatus manatus*), fueron realizados por Villanueva (2005; 2008), con manatíes de vida libre y en cautiverio. Todas las muestras fueron obtenidas por medio de la captura y contención física de los ejemplares (manejo forzado) teniéndose concentraciones de cortisol dentro de un rango de 2.07 a 7.14 ng/ml. En estos trabajos se utilizaron como individuos de estudio los mismos cinco manatíes del Acuario de Veracruz, donde se obtuvo un promedio de 3.91 ng/ml, lo cual no difiere mucho del promedio obtenido en el presente estudio (3.49 ng/ml) durante el manejo forzado. Sin embargo, al comparar ambos promedios con el obtenido con el entrenamiento (manejo voluntario) que fue de 1.71 ng/ml, se observa una clara disminución de la concentración sérica de cortisol de casi el 50% por lo que podemos concluir que el entrenamiento en los manatíes no representa un factor estresante significativo y que ayuda efectivamente a disminuirlo durante los procedimientos veterinarios.

Morgan (2007) identificó mayoría de los factores que pudieran ser fuente de estrés en cautiverio, como la proximidad de personas, los sonidos, la iluminación artificial, los olores, los sustratos y la restricción de movimiento, entre otros. Durante este estudio se observó que el entrenamiento permite a los animales desviar la atención y adaptarse a estos estímulos para reducir el estrés, en este caso lo pudimos corroborar con la desensibilización al sonido producido por el transductor del ultrasonido. Esta respuesta fue de especial importancia en el manatí Costeña al ser la que más problemas tuvo con el aprendizaje de los comportamientos médicos.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo abren la puerta a muchas posibilidades de estudio de la fisiología de los manatíes del Caribe (*T. manatus manatus*) y con ello facilitar los manejos de especies en cautiverio. Además se demostró una clara diferencia entre el manejo forzado y el manejo voluntario o entrenamiento, dado que algunas muestras están por debajo del límite de detección de la curva estándar para cortisol, por lo que sería importante usar una técnica más sensible para que todas las muestras estén dentro del rango del RIA con tritio H<sup>3</sup>. Esta prueba se utiliza para detectar concentraciones de cortisol en saliva, que detecta concentraciones de hormona en picogramos y así obtener las concentraciones precisas para realizar un análisis más profundo del proceso de entrenamiento y sus implicaciones en el bienestar animal.

## 7. REFERENCIAS

Acuario de Veracruz A.C, © 2011. Obtenida Enero 30 de 2014, de:

<http://www.acuariodeveracruz.com/>

Ames, A.L., Van vleet, E.S. & Reynolds III, J.E. (2002) Comparison of lipids in selected tissues of the Florida manatee (Order Sirenia) and bottlenose dolphin (Order Cetacea; Suborder Odontoceti). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132:625–634.

Arce, V.M., Catalina, P.F. & Mallo F. (Eds) (2006) *Endocrinología*. Universidad de Santiago de compostela, Servicio de publicaciones ed Universidad de vigo.

Bauer, G. B., Colbert, D. E., & Gaspard III, J. C. (2010) Learning about manatees: a collaborative program between New College of Florida and Mote Marine Laboratory to conduct laboratory research for manatee conservation. *International Journal of Comparative Psychology* 23(4): 811-825.

Berta, A., Sumichs, J.L. & Kovacs, K.M. (2006) *Marine Mamamals. Evolutionary Biology*. 2nd ed. United States of America: Academic Press.

Brando S.I. (2010) Advances in husbandry training in marine mammal care programs. *International Journal of Comparative Psychology* 23(4): 777-791.

Broom, D.M. & Johnson, K.G. (Eds) (reprinted 2000) *Stress and Animal Welfare*. USA: Kluwer Academic Publishers.

Brousset H-J D.M. (2003) Efecto de Enriquecimiento Ambiental sobre el Bienestar de tres Especies de Felinos Mexicanos en Peligro de Extinción (Ocelote, Marga y

Jaguarundi) Mantenidos en Cautiverio. Tesis de Doctorado. México, D.F., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Brousset H-J D.M., et al. (2005) Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. (Artículo de revisión) Revista Veterinaria México, 36 (3); 325-337.

Brust C.H. (1967) Condicionamiento y Memoria. La Palabra y el Hombre 44: 763-793.

Buchholtz, E.A., Booth, A.C. & Webbink K.E. (2007) Vertebral Anatomy in the Florida Manatee, *Trichechus manatus latirostris*: A Developmental and Evolutionary Analysis. The Anatomical Record 290:624–637.

Burn, D.M. (1986) The Digestive Strategy and Efficiency of the West Indian Manatee, *Trichechus manatus*. Camp. Biochem. Physiol. Vol. 85A, No. I, pp. 139-142.

Campbell, H.W & Irvine, A.B. (1977) Feeding ecology of the West Indian manatee *Trichechus manatus* Linnaeus. Aquaculture 12: 249-251.

Chapla, M.E., Nowacek, D.P., Rommel, S.A. & Sadler, V.M. (2007) CT scans and 3D reconstructions of Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) heads and ear bones. Hearing Research 228:123–135.

Cites.org (2013) Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Appendices I, II and III. Obtenida Marzo 30 de 2014, de <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>

Colbert, D.E., et al. (2001) Husbandry and research training of two Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). Aquatic Mammals 27: 16-23.

- Colmenero, R.L.C. (1991) Propuesta de un Plan de Recuperación para la Población del Manatí *Trichechus manatus* de México. Anales del Instituto de Biología – UMAN, Serie Zoológica 62 (2): 203-218.
- Cunningham, G.J. & Klein, G.B. (Eds) (2009) Fisiología Veterinaria. 4ª edición, España: ELSEVIER.
- Dierauf, A.L. & Gulland, D.F.M. (2001) CRC Handbook of Marine Mammal Medicine. 2º ed. United States of América: CRC Press LLC.
- Drucker C.R. (2005) Fisiología Médica. México: Editorial el Manual Moderno.
- Flores, C.L. (2010) Aspectos Biológicos de los Sirénidos *Trichechus manatus* Linnaeus, 1758 en México. Revista BIOCYT (Biológica, Ciencia y Tecnología), 3 (9): 122-134.
- Galindo, M.F.A. & Orihuela, T.A. (Eds) (2004) Etología Aplicada. México, D.F, UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Hernández B.Y.N. (2010) Repertorio vocal del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en el Sisitema Lagunar de Alvarado (SLA), Veracruz. Tesis de maestria en manejo de ecosistemas marinos y costeros. Veracruz, Tuxpan Universidad Veracruzana.
- Jefferson, T.A., Leatherwood, S. & Webber, M.A. (1993) Species Identification Guide: Marine Mammals of the World. United Nations Environment Prograded Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma: FAO.

- Larkin, I.L.V. (2000) Reproductive endocrinology of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*): estrous cycles, seasonal patterns and behavior. Doctoral dissertation EUA, Florida, University of Florida.
- Lima, D.S., Vergara-Parente, J.E., Young, R.J., & Paszkiewicz, E.R.I.K.A. (2005) Training of Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758 as a management technique for individual welfare. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 4(1): 61-68.
- Luna, B., et al. (2012) Comportamiento de mantenimiento y niveles de cortisol de toninas (*Tursiops truncatus*) en instalaciones cerradas y abiertas. *Revista Veterinaria México*, 43 (2); 103-112.
- Manire C.A., et al. (2003) Alterations in blood and urine parameters in two Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from simulated conditions of release following rehabilitation. *Zoo Biol* 22:103–120.
- Martínez-Mota, R., et al. (2007) Effects of forest fragmentation on the physiological stress response of black howler monkeys. *Animal Conservation* 10: 374–379.
- Melfi V. (2013) Is Training Zoo Animals Enriching?. *Applied Animal Behavior Science* 147:299– 305.
- Moberg, G.P. & Mench, J.A. (Eds) (2000) *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. Wallingford : CABI.
- Morgan, K.N., & Tromborg, C.T. (2007) Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, 102(3), 262-302.

Negrete, A.C. Condicionamiento Operante para la Realización de Procedimientos Veterinarios en el Manatí del Caribe (*Trichechus manatus manatus*). Tesis de Licenciatura. México, D.F., Facultad de Medicina Veterinaria.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SEMARNAT-2010, PROTECCION AMBIENTAL-ESPECIES NATIVAS DE MÉXICO DE FLORA Y FAUNA SILVESTRES-CATEGORIAS DE RIESGO Y ESPECIFICACIONES PARA SU INCLUSION, EXCLUSION O CAMBIO-LISTA DE SPECIES EN RIESGO. Última modificación Diciembre 30, 2010.

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. Última modificación Agosto 27, 2004

Ochoa, P.A.G. (2012) El papel de acuarios y parques acuáticos en la conservación del manatí (*Trichechus manatus*) en México. Tesis de Maestría. México, Veracruz. Instituto de Ecología Xalapa.

Ortega A.A., Olivera G.L.D., Morales V.B., Colmenero R.L.C., Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (compiladores) (2010) Programa de Acción para la Conservación de la Especie: Manatí (*Trichechus manatus manatus*). CONANP, México, DF: 69 pp.

Ortíz, R.M., Worthy, G.A., & MacKenzie, D.S. (1998) Osmoregulation in wild and captive West Indian manatees (*Trichechus manatus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 71(4), 449-457.

- Osborne S.R. (1977) The Free Food (Contrafreeloading) Phenomenon: A Review and Analysis. *Animal Learning and Behavior* 5 (3): 221-235.
- Pedernera-Romano, C., et al. (2006) Salivary Cortisol in Captive Dolphins (*Tursiops truncatus*): a non-invasive technique. *Animal Welfare* 15: 359-362.
- Pedernera-Romano, C., et al. (2010) Serum Cortisol in California Sea Lion Pups (*Zalophus californianus californianus*). *Animal Welfare* 19: 275-280.
- Pervaiz, S. & Brew, K. (1986) Composition of the milks of the bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) and the Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*). *Camp. Biochem. Physiol.* Vol. 84(2):357-360.
- Pifarré, María, et al. (2012) The Effect of Zoo Visitors on the Behaviour and Faecal Cortisol of the Mexican Wolf (*Canis lupus baileyi*). *Applied Animal Behaviour Science* 136: 57-62.
- Quintana-Rizzo E. & Reynolds III J.E. (compiladores) (2010) Plan de Manejo Regional para el Manatí de las Indias Occidentales (*Trichechus manatus*). Informe Técnico del PAC 48. Programa Ambiental del Caribe del PNUMA, Kingston, Jamaica.
- Ramirez K. (1999) *Animal Training: Successful Animal Management through Positive Reinforcement*. USA, Chicago: John G. Shedd Aquarium.
- Rangel-Negrín, A., et al. (2009) Stress in Yucatan Spider Monkeys: Effects of Environmental Conditions on Faecal Cortisol Levels in Wild and Captive Populations. *Animal Conservation* 12: 496-502.

- Reynolds, III J.E & Rommel, S.A. (1996) Structure and Function of the Gastrointestinal Tract of the Florida Manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *The Anatomical Record* 245:539-558.
- Romano M.C., et al. (2010) Stress in Wildlife Species: Noninvasive Monitoring of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 17:209-212.
- Rommel, S.A. & Reynolds III, J.E. (2000) Diaphragm Structure and Function in the Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*). *The Anatomical Record* 259: 41-51.
- Rommel, S.A., Pabst, D.A. & Mclellan, W.A. (2001) Functional Morphology of Venus Structures Associated with the Male and Female Reproductive Systems in Florida Manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *The Anatomical Record* 264:339–347.
- SEMARNAT (2001) Proyecto de conservación, recuperación y manejo del manatí *Trichechus manatus* en México. SERIE PREP num. 11.
- TheIUCN.org (2013) Red List of The Threatened Species: *Trichechus manatus*. Obtenida Marzo 30 de 2014, de <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/22103/0>
- Tripp K.M., et al. (2010) Evaluation of Adrenocortical Function in Florida Manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Zoo Biology* 29: 1–15.
- Valdespino, C., et al. (2007) Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: Evolución de una metodología no invasiva. (ensayo) *Acta Zoológica Mexicana* 23 (3): 151-180.

Viena. FAO (1984) Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction. Technical Reports N° 233. IAEA.

Villanueva C. (2005) Determinación de cortisol en el Manatí Antillano (*Trichechus manatus manatus*). Tesis de Licenciatura en Biología. México Tabasco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Villanueva G.C. (2008) Evaluación del efecto del público sobre el comportamiento y los niveles de cortisol en el manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*). Tesis de Maestría en Ciencias. México, D.F., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Wood S. L. (2005) ABC of the Animal Training: Study Guide. México, Cancun.

Young R.J. (2002) Uncloaking the Magician: Contributions of Comparative Psychology to Understanding Animal Training. *International Journal of Comparative Psychology* 15:174-185.

# ANEXOS

## Anexo 1 Dieta Actual

Composición de la Dieta ofrecida en el Acuario de Veracruz Actualmente, las lechugas conforman el 50 % del total de la dieta (el total se divide en 3 comidas al día, sin embargo la primera comida se dividió a la mitad, una parte se da libremente y la otra se utiliza en las sesiones de entrenamiento) mientras que los vegetales y la botana conforman el otro 50 % (vegetales 37.5 % y botana 12.5%), las lechugas y los vegetales se dan diario y la botana se alterna, un día betabel, papa y zanahoria, y al siguiente se da calabacita, jitomate, manzana y pepino.

 **Registro de Consumo de Vegetales**  
**Manatíes Juveniles - Adultos**

Depto. de Manejo Acuático, Avés y Peces  
Fecha: 04 DE MAYO 2013

COSTEÑA-DOMINGA-SILVIA

Hora	Especie	C. pzas.	P. I / g.	P. F. / g.	Consumo gramos	Realizó	Validó		
06:00 hrs	Lechuga larga		6200			NOÉ M.			
	Lechuga romana		6270						
17:00 hrs	Lechuga larga		6100			NAOMI G.			
	Lechuga romana		6100						
14:30 hrs	Calabacita italiana	590	500	580		NAOMI G.			
	Jitomate	600	600	570					
	Manzana	590	600	570					
	Pepino	580	610	560					
	Betabel	S.	C.	D.					
	Papa								
21:00 hrs	Zanahoria		1810			NAOMI G.			
	Acelga		4700						
	Ajofaia		3670						
	Berro		1550						
	Brocoli		1470						
19:00 hrs	Chicharo en vaina		2910						
	Col		3840						
	Ejote		2910						
	Espinaca		1450						
	Lechuga larga		6110						
	Lechuga romana		6100						
	<b>Total</b>								

C. pzas = Cantidad de piezas      P. I / g = Peso Inicial / gramos      P. F. / g = Peso Final / gramos      N/O = No se ofrece

Observaciones

 **Registro de Consumo de Vegetales**  
**Manatíes Juveniles - Adultos**

Depto. de Manejo Acuático, Avés y Peces  
Fecha: 05 de MAYO 2013

PABLO-FABIÁN

Hora	Especie	C. pzas.	P. I / g.	P. F. / g.	Consumo gramos	Realizó	Validó
06:00 hrs	Lechuga larga		2650			ARIEL P.	
	Lechuga romana		2670				
17:00 hrs	Lechuga larga		2630			NAOMI G. KATHERINE M.	
	Lechuga romana		2650				
14:30 hrs	Calabacita italiana					NAOMI G.	
	Jitomate						
	Manzana						
	Pepino	P.	F.				
	Betabel	570	250				
	Papa	560	240				
19:00 hrs	Zanahoria	580	230			KATHERINE M. NAOMI G.	
	Acelga		640				
	Ajofaia		2020				
	Apio		1570				
	Berro		1510				
19:00 hrs	Brocoli		720				
	Chicharo en vaina		900				
	Col		1890				
	Ejote		400				
	Espinaca		780				
	Lechuga larga		2640				
	Lechuga romana		2630				
	<b>Total</b>						

C. pzas = Cantidad de piezas      P. I / g = Peso Inicial / gramos      P. F. / g = Peso Final / gramos      N/O = No se ofrece

Observaciones

## Anexo 2 Formato de Morfometrías

15 de Mayo 2014

### REVISION SEMESTRAL MANATI

NOMBRE \_\_\_\_\_ N° DE MICROCHIP \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: MACHO

PESO: \_\_\_\_\_

### DATOS MORFOMETRICOS PARA MANATI.

Todas las medidas son líneas rectas de punto a punto excepto las marcadas con un asterisco. Reporte diámetros y longitud de aletas únicamente en organismos frescos use sistema métrico decimal.

- 1.- Extremo del hocico a la aleta caudal.:
- 2.- Extremo del hocico al centro de la abertura anal:
- 3.- Extremo del hocico al centro de la abertura genital:
- 4.- Extremo del hocico al centro del ombligo:
- 5.- Extremo del hocico al origen anterior de las aletas pectorales. \_\_\_\_\_
- 6.- Extremo del hocico al centro del ojo \_\_\_\_\_
- 7.- Extremo del hocico al centro del meato auditivo externo \_\_\_\_\_
- 8.- Centro del ojo al centro del meato auditivo externo. \_\_\_\_\_
- 9.- Distancia de ojo a ojo por el dorso. \_\_\_\_\_
- 10.- Centro del ojo al centro de la a abertura nasal \_\_\_\_\_
- 11.- Longitud de la extremidad anterior, del origen anterior al extremo de esta. \_\_\_\_\_
- 12.- Longitud de la extremidad anterior, de la axila al extremo de esta. \_\_\_\_\_
- 13.- Anchura máxima de la extremidad anterior. \_\_\_\_\_
- 14.- Longitud perpendicular de la teta. \_\_\_\_\_
- 15.- Base de la aleta caudal al extremo de esta \_\_\_\_\_
- 16.- Anchura máxima de la aleta caudal. \_\_\_\_\_
- 17.- Diámetro de la base de la cola:
- 18.- Diámetro a la altura del ano:
- 19.- Diámetro a la altura del ombligo:
- 20.- Diámetro a la altura de la axila \_\_\_\_\_
- 21.- Diámetro sobre poro genital:
  
- 22.- Grosor de la piel  
Dorsal----- lateral..... ventral-----
  
- 23.- Grosor de la capa de grasa.  
Externa: dorsal----- latera----- ventral-----  
Interna: dorsal-----lateral-----ventral-----

### **Anexo 3 Glosario de Términos**

**Adaptación.**- Ajuste a nuevos entornos, caracterizado por una disminución en la excitación.

**Aprendizaje.**- Un cambio relativamente permanente en un patrón de respuesta que ocurre como resultado de prácticas reforzadas; comportamiento que ha sido modificado como resultado de la experiencia de un organismo.

**Aproximación.**- El proceso de aproximación consta en reforzar respuestas parciales o preliminares encaminadas a lograr que el organismo produzca la forma completa de la respuesta deseada.

**Aproximación Sucesiva.**- El proceso escalonado por el cual se logra aproximar un comportamiento hacia un acto deseado a través del refuerzo selectivo de aquellos comportamientos que llevan al acto deseado.

**Asociación.**- Proceso a través del cual un organismo conecta entre sí elementos relacionados como percepciones, memorias o ideas.

**Aversión.**- Tener antipatía o evitar algo.

**Bridge (Estímulo puente).**- Estímulo que señala con precisión en el tiempo y el momento preciso de un comportamiento deseado y forma un puente en el espacio de tiempo entre ese punto y el momento en el cual el organismo puede recibir su recompensa. El puente significa “Sí, eso es lo que quiero y aquí viene tu reforzador”.

**Cadena.**-Son 2 o más comportamientos enlazados juntos como una unidad. Un comportamiento produce las condiciones que hacen posible el comportamiento que sigue. El estímulo que enlaza los comportamientos sirve como ambos refuerzo condicionado, manteniendo la topografía y la frecuencia de los comportamientos producidos, así como el estímulo, estableciendo el motivo para los comportamientos que siguen. Una serie de comportamientos enlazados por estímulos que actúan como ambos refuerzo condicionado y estímulo discriminante. Las cadenas siempre son entrenadas revertiendo la secuencia.

**Castigo.**- Presentación de un estímulo adverso, doloroso o la eliminación de la oportunidad de obtener un refuerzo, lo cual disminuye la probabilidad de que perdure la respuesta que lleva al castigo.

**Comportamiento.**- Término amplio para connotar todas las respuestas, manifiestas o implícitas, musculares o glandulares, de un organismo. Una respuesta o un acto observable o mensurable.

**Comportamiento Estereotípico.**- Una respuesta repetitiva que no varía por períodos prolongados de tiempo. Generalmente aparecen por falta de estimulación.

**Desensibilización.**- El proceso de cambiar la percepción de un animal con respecto a un evento, negativo o positivo, pero generalmente negativo, a una percepción neutra, la cual se hace evidente por la falta de respuesta del animal hacia el evento cuando se compara con la previa línea de base. La reducción o desaparición de una respuesta, lograda por la asociación de un refuerzo positivo con la presentación del estímulo.

**Estación (sustantivo).**- Una posición asignada para un animal y designada por el entrenador.

**Estación (verbo).**- La acción de un animal para mantenerse en una posición asignada, generalmente en una postura fija, por un período de tiempo que es designado por el entrenador.

**Estancamiento de Aprendizaje.**- Un período en el cual el progreso temprano en el aprendizaje parece haberse detenido y el progreso se ha paralizado; el estancamiento es seguido por un nuevo período de progreso.

**Estímulo.**- Un objeto o evento externo o interno que causa una alteración en el comportamiento de un organismo. Un evento mensurable que puede tener un efecto sobre el comportamiento. El objeto o evento debe tener suficiente intensidad para que el organismo lo perciba antes de que sea un estímulo para ese organismo.

**Estímulo Discriminativo (SD).**- Es una señal aprendida para un comportamiento específico. Discrimina un comportamiento de otro y solicita un comportamiento condicionado.

**Frustración.**- Obstáculo del entorno o personal que previene que un organismo obtenga una meta deseada; también, una condición causada por el bloqueo de una meta. Comportamiento emocional impulsado por la frustración o interrupción de la actividad que busca la meta.

**Homeostasis.**- Es el conjunto de mecanismos que mantienen el balance en el funcionamiento interno corporal, en contra de los estímulos ambientales que tienden a desestabilizarlos.

**LSR (Menor refuerzo posible).**- Es cuando no hay una respuesta por parte del entrenador por un intervalo de tiempo corto. No dura más de unos cuantos segundos y se presenta exactamente al mismo que tiempo que si se entregara un reforzador al tener un buen comportamiento.

**Magnitud.**- Se refiere al tamaño, fuerza o duración del refuerzo o de la recompensa que sigue al comportamiento.

**Manejo.**- Administración fisiológica y psicológica a largo plazo que asegura la viabilidad de una especie.

**Motivación.**- Término general que se refiere a las fuerzas que regulan el comportamiento que es asumida por impulsos, necesidades, o deseos y se dirige hacia objetivos. Las variables no-estímulos que controlan el comportamiento; nombre general para el hecho de que los actos de un organismo están parcialmente determinados, en cuanto a dirección y fuerza, por su propia naturaleza y/o estado interno.

**Privación.**- Ocurre cuando un refuerzo primario o uno secundario fuertemente condicionado se retiene por un período de tiempo.

**Programa de Refuerzo.**- Se refiere a las condiciones bajo las cuales se entrega un refuerzo. Cuando un programa de refuerzo dado entra en vigor, el refuerzo sólo puede ser obtenido por el organismo que cumple con los requisitos específicos del programa. Los programas de refuerzo continuo y variable son los programas más importantes para el adiestramiento de animales.

**Programa de Refuerzo Continuo.**- Es un programa predecible. Después de cada comportamiento correcto, al sujeto le dan exactamente el mismo reforzador

**Programa de Refuerzo Variable.**- Es un programa impredecible. Después de cada comportamiento correcto, el sujeto recibe un reforzador diferente. Lo impredecible del programa previene que el animal sepa que reforzador obtendrá con una conducta correcta. Éste tipo de programas mantiene un alto nivel de motivación, provee diversidad de estímulos al mantener al animal adivinando sus reforzadores, es una buena técnica para mantener las conductas.

**Refuerzo.**- Es un estímulo que aumenta la probabilidad de que el comportamiento se repita en un futuro. El refuerzo debe ocurrir al terminar la conducta y debido a la misma. Generalmente, cualquier condición que fortalece el aprendizaje.

**Refuerzo Negativo.**- Todo aquello que el animal trata de evitar, sin embargo es diferente a un castigo ya que el animal tiene la opción de evitar el refuerzo negativo.

**Refuerzo Positivo.**- Todo aquello que el animal quiere o necesita y quiere más de este, por lo que la conducta será repetida para obtenerla. Existen 2 tipos de reforzamiento positivo, primario (incondicionado) y secundario (condicionado).

**Refuerzo Primario (Reforzador Incondicionado).**- Un evento que refuerza y que no depende de un aprendizaje para lograr sus propiedades como reforzador. Cualquier cosa de valor intrínseco para un organismo; como ejemplos están las necesidades biológicas por alimento, agua, sexo y necesidades sociales.

**Refuerzo Secundario (Reforzador Condicionado).**- Un estímulo cuyo valor como refuerzo se deriva de un condicionamiento previo, el cual fue asociado con un refuerzo primario; cuando se le está dando forma a un comportamiento con condicionamiento operante, el estímulo puente se transforma en el refuerzo secundario cuando se empareja con el refuerzo. Una vez que el condicionamiento ha ocurrido, la distinción entre refuerzo primario y secundario se hace menos clara. Un refuerzo secundario inicialmente, no es una recompensa para el organismo, pero este se condiciona por su asociación con otros refuerzos primarios deseados.

**Regresión.**- El regreso a un estado mental, de comportamiento, o de aprendizaje anterior. Se dice que un organismo ha regresado cuando su comportamiento previamente condicionado ha vuelto a un estado de desarrollo anterior. La regresión puede ser el resultado de frustración o simplemente de haberse olvidado.

**Señal de Llamada.**- El proceso de mandar o llamar a un animal desde un punto en donde está estacionado hacia otro, usando un sonido como estímulo condicionado o para traerlo de vuelta a la estación.

**Target.**- Blanco u objetivo, objeto que el animal tiene que tocar con alguna parte del cuerpo. El proceso de estimular a un animal para que toque un punto u objeto en particular.

**Tiempo Fuera (Time-out).**- El cese de todos los refuerzos, incluyendo el contacto personal, por un intervalo de tiempo, con la intención de extinguir un comportamiento indeseable. El entrenador se retira con los reforzadores del área de entrenamiento por varios minutos.

Las 3 razones más comunes para usarlos.

- a) Cuando LRS no ha funcionado.
- b) Nivel pobre de atención.
- c) Cuando consideras que hay una alta probabilidad de que continuar no producirá los resultados deseados.

**Tiempo Fuera Extendido (Time-out extendido).**- El entrenador se retira con los reforzadores del área de entrenamiento hasta la siguiente sesión de entrenamiento. La sesión es concluida. Se utiliza cuando no hay atención absoluta del animal.