

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en
Biología Ambiental**

**Valoración de los programas de nado como enriquecimiento
ambiental para *Tursiops truncatus* (delfín nariz de botella)**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Anayr Sánchez Gómez

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Anayr Sánchez Gómez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Edgar Alfonso López Landavery

MPVM. Julio Alfonso Mercado Rodríguez



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Anayr Sánchez Gómez © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Anayr Sánchez Gómez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biología Ambiental.

**Valoración de los programas de nado como enriquecimiento ambiental
para *Tursiops truncatus* (delfín nariz de botella)**

Resumen aprobado por:

Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo
Director de tesis

Tursiops truncatus es el mamífero marino más abundante en cautiverio donde puede encontrar situaciones de estrés. El enriquecimiento ambiental es una manera de disminuir el estrés, considerando las interacciones humano-animal, una interacción positiva. Se evaluaron los programas de nado como enriquecimiento ambiental en cinco instalaciones de la empresa Dolphin Discovery, Quintana Roo, mediante biometría y química sanguínea como estudio de salud general, enzimas asociadas a daño muscular para determinar el efecto de los programas de nado en las alteraciones musculares, concentraciones de ácido láctico para evaluar la demanda energética durante el día y niveles de cortisol en sangre en *T. truncatus* antes y después del primer y último programa de nado del día. La biometría y química sanguínea mostraron cambios estadísticamente significativos ($p > 0.05$) en diferentes parámetros indicando niveles subclínicos que podrían estar influyendo en los demás resultados, así como en la salud a largo plazo de los individuos. Los valores de enzimas musculares se encontraban en su mayoría por encima y debajo del rango normal, sin embargo, no se encontró una alteración estadísticamente significativa antes y después del primer programa de nado. El análisis de ácido láctico mostró valores por debajo del registrado en vida libre para *T. truncatus* y un aumento significativo en las concentraciones a lo largo del día, esperado debido al gasto energético. Los niveles de cortisol fueron más altos antes del primer programa de nado, ya que esta hormona está en la parte alta de su ciclo circadiano en mamíferos, y se obtuvo una disminución estadísticamente significativa a lo largo del día; no hay un efecto acumulativo. No se encontró prueba de daño muscular, ni estrés en los delfines de Dolphin Discovery antes y después del primer y último programa de nado del día. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre los parámetros medidos con locación, sexo, edad y tiempo en cautiverio de los individuos.

Palabras clave: Estrés, enriquecimiento ambiental, biometría, química sanguínea, enzimas hepáticas, ácido láctico, cortisol

Abstract of the thesis presented by **Anayr Sánchez Gómez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Environmental Biology

**Swimming programs assessment as environmental enrichment
for *Tursiops truncatus* (bottlenose dolphin)**

Abstract approved by:

Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo
Thesis Director

Tursiops truncatus is the most abundant captive marine mammal, where it can be under stress. Environmental enrichment is a means for decreasing stress, and where human-animal interactions are considered positive. We evaluated swimming programs as environmental enrichment in five Dolphin Discovery installations in Quintana Roo, using blood biometry and chemistry as indicators of general wellbeing, enzymes associated to muscle damage to determine the effect of swimming programs in muscles, lactic acid concentrations to evaluate energy demand through the day and blood cortisol levels in *T. truncatus* before and after the first and last swimming performance of the day. The blood's biometry and chemistry showed statistically significant effects ($p > 0.05$) in several parameters, pointing to subclinical levels that could be affecting other results, as well as the long term health of the sampled individuals. Muscle enzyme values were, for the most part, either above or below the normal range, nonetheless, there was no statistically significant difference before and after the first swimming program. Lactic acid analyses gave values below those registered in the wild for *T. truncatus*, and a considerable increase in concentration throughout the day, as expected with energy expenditure. Cortisol levels were higher before the first swimming performance, as this hormone is at its highest level in the morning in mammalian circadian rhythms, a statistically significant decrease was shown through the day, we didn't find a cumulative effect. There was no evidence of muscle damage or stress for *T. truncatus* at Dolphin Discovery before and after the first and last swimming performances of each day. There was no statistical relationship between measured parameters with location, sex, age, and length of capture of the dolphins.

Keywords: Stress, environmental enrichment, biometry, blood chemistry, hepatic enzymes, lactic acid, cortisol

Dedicatoria

*A mi madre, hermano, tía y nana,
porque son mi vida entera.*

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), al posgrado de Ciencias de la Vida y al departamento de Biología Ambiental, por aceptarme y permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

A mi Director de Tesis el Dr. Horacio de la Cueva, por darme la oportunidad de colaborar en este proyecto tan bonito, por estar siempre disponible para asesorarme con un buen café, por sus enseñanzas y todo el apoyo brindado.

A la Dra. Clara E. Galindo por aceptarme en su laboratorio, por su orientación y apoyo a lo largo del proyecto. Además a todos los miembros de su laboratorio por sus recomendaciones durante los labmeetings, principalmente a Lolis y Edna por su apoyo en la elaboración de la metodología en laboratorio. Así mismo al Dr. Edgar López por su tiempo, ayuda y paciencia durante todos los métodos de laboratorio.

A la Dra. Carmen Paniagua, por su cariño y apoyo durante todo el proyecto, y por su tiempo para brindarme asesorías al momento de hacer la presentación y redacción de la Tesis, además de prestarme el equipo para el transporte de las muestras por parte de Subnargena.

Al MPVM. Julio Mercado por sus enseñanzas sobre el tema y ayudarme en toda la parte veterinaria a lo largo del proyecto, y por permitirme participar en el curso de Bienestar Animal en cautiverio como ponente y platicar sobre el proyecto.

A la empresa Dolphin Discovery, al Dr. Roberto Sánchez Okrucky y a los veterinarios y entrenadores de los delfinarios de Quintana Roo por permitirme continuar con la segunda parte de este proyecto a beneficio de estos animales tan maravillosos, por recibirme en sus instalaciones, el apoyo del material, así como en la toma de muestras y el análisis de datos que se llevaron a cabo dentro de las instalaciones.

Al personal administrativo de CICESE por el apoyo en trámites académicos, en especial a Eva Robles por su cariño y auxilio durante todos los trámites e impresiones necesarios para la realización del proyecto y la Tesis.

A mi familia que estuvo al pendiente todo el transcurso de esta etapa de mi vida, brindándome su cariño y apoyo incondicional, mi mamá, hermano, tía Luly, nana, tíos Bebo y Magda, y mis 5 bebés, los amo.

A mis amigos m&s Alberto, Brenda, Gorri y Macareno por ser los mejores y siempre estar ahí para cualquier situación, los quiero. A Epas, Samantha, Sarahí, Mariana, Jessica, Duahmet, Felipe, José Manuel, Shimo, Soto, Darlene, Aguilar, Juve, Vane y los que faltan! Por apoyarme, la carrilla, consejos, por hacer mi vida más feliz y el cariño de cada uno, los adoro. Y a mis demás amigos del posgrado de Ecología Marina y Ciencias de la Tierra, por brindarme su amistad, por esas noches de diversión y retas siempre bien merecidas.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Estrés	4
1.1.1 Reconocimiento del estresor y respuesta biológica	4
1.1.2 Respuesta adaptativa al estrés	5
1.1.3 Mediciones de estrés.....	6
1.1.3.1 Cortisol.....	6
1.1.3.2 Enzimas musculares.....	7
1.1.3.3 Ácido Láctico.....	8
1.2 Biometría y química sanguínea: Estudio de salud general	8
1.3 <i>Tursiops truncatus</i>	9
1.3.1 <i>Tursiops truncatus</i> en cautiverio	9
1.3.2 Instalaciones de cautiverio	11
1.3.3 Actividades de entretenimiento	11
1.4 Enriquecimiento ambiental.....	11
1.5 Justificación.....	13
1.6 Hipótesis	14
1.7 Objetivos.....	14
1.7.1 Objetivo general	14
1.7.2 Objetivos particulares.....	14
Capítulo 2. Metodología	16
2.1 Zona de estudio	16
2.2 Delfines	16
2.3 Toma de muestras de sangre.....	17
2.4 Biometría sanguínea	17
2.5 Obtención del Suero y Plasma	18
2.6 Química sanguínea y enzimas musculares.....	18

2.7 Concentración de ácido láctico.....	19
2.8 Evaluación del cortisol	19
2.9 Análisis estadístico.....	20
Capítulo 3. Resultados	21
3.1 Delfines	21
3.2 Biometría y química sanguínea.....	21
3.2.1 Relación albumina-globulina (A/B).....	23
3.3 Enzimas asociadas a daño muscular	23
3.4 Concentraciones de ácido láctico	24
3.5 Niveles de cortisol en suero.....	24
Capítulo 4 Discusión	26
4.1 Biometría y química sanguínea.....	26
4.2 Enzimas asociadas a daño muscular	27
4.3 Concentraciones de ácido láctico	28
4.4 Cortisol en suero.....	29
Capítulo 5. Conclusiones	32
Capítulo 6. Recomendaciones	33
Literatura citada	34
Anexo I	37
Anexo II	41
Anexo II	51
Anexo III	52
Anexo IV	62
Anexo V	64

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa donde se muestra la ubicación de las cinco instalaciones de Dolphin Discovery Quintana Roo, en donde se realizó el presente estudio. Imagen satelital de Google Earth.....	16
Figura 2: Medias y error estándar de las concentraciones de ácido láctico antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).....	24
Figura 3: Medias y error estándar de los niveles de cortisol en suero antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).....	25
Figura 4. Relación del PC1 en eje x, con el PC2 en eje y en base a la locación de los delfinarios.....	48
Figura 5. Relación del PC1 en eje x, con el PC2 en eje y en base al sexo de los individuos.....	48
Figura 6. Relación del PC1 en eje x, con el PC2 en eje y en base a la edad de los individuos.....	48
Figura 7. Relación del PC2 en eje x, con el PC1 en eje y en base a la locación de los delfinarios.....	48
Figura 8. Relación del PC2 en eje x, con el PC1 en eje y en base al sexo de los individuos.....	49
Figura 9. Relación del PC2 en eje x, con el PC1 en eje y en base a la edad de los individuos.....	49
Figura 10. Medias y error estándar de los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4)	56
Figura 11: Medias y error estándar de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).....	56
Figura 12: Medias y error estándar de los niveles de fosfatasa alcanina (ALKP) antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4)	57
Figura 13: Medias y error estándar de los niveles de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4)	57
Figura 14: Medias y error estándar de los niveles de gamma creatina quinasa (CK) antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).....	58

- Figura 15: Medias y error estándar de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4)58
- Figura 16. Curva de calibración obtenida con los valores estándar del kit. En el eje X se encuentran los niveles de cortisol en ng/ml, mientras que en el eje Y se observan los valores de la densidad óptica (absorbancia) obtenida en las muestras estándar.....64
- Figura 17. Línea de tendencia polinómica mostrando la ecuación para transformar los datos. En el eje X se encuentran los niveles de cortisol en ng/ml, mientras que en el eje Y se observa el valor de uno dividido entre los valores de densidad óptica de las muestras estándar.....64

Lista de Tablas

Tabla 1: Información general de los delfines muestreados.....	21
Tabla 2: Parámetros de biometría y química sanguínea.....	37
Tabla 3: Resultados de biometrías sanguíneas.....	41
Tabla 4: Resultados de químicas sanguíneas.....	43
Tabla 5: Medias y pruebas de T pareadas de biometría sanguínea.....	44
Tabla 6: Medias y pruebas de T pareadas de química sanguínea.....	45
Tabla 7: Análisis de componentes principales (PCA).....	46
Tabla 8: Relación de los parámetros de biometría sanguínea mediante PCA.....	46
Tabla 9: Relación éntrelos individuos muestreados mediante PCA.....	47
Tabla 10: Relación albumina-globulina.....	50
Tabla 11: Medias de la relación albumina-globulina (A/G).....	50
Tabla 12: Simbología y significados para el análisis estadístico correspondiente a enzimas musculares, ácido láctico y cortisol.....	51
Tabla 13: Resultados de enzimas asociadas a daño muscular.....	52
Tabla 14: Medias de AST, ALT, ALKP, GGT, CK y LDH.....	54
Tabla 15: ANOVA de AST.....	59
Tabla 16: ANOVA de ALT.....	59
Tabla 17: ANOVA de ALKP.....	60
Tabla 18: ANOVA de GGT.....	60
Tabla 19: ANOVA de CK.....	61
Tabla 20: ANOVA de LDH.....	61
Tabla 21: Concentraciones de ácido láctico.....	62
Tabla 22: Medias de las concentraciones de ácido láctico.....	63
Tabla 23: ANOVA de las concentraciones de ácido láctico.....	63

Tabla 24: Niveles de cortisol en suero.....65

Tabla 25: Medias de los niveles de cortisol en suero.....65

Tabla 26: ANOVA de los niveles de cortisol en suero.....66

Capítulo 1. Introducción

Tursiops truncatus, el delfín nariz de botella o tonina es el mamífero marino más abundante en cautiverio (WDCS, 2016). Durante los primeros cautiverios se utilizó para entretenimiento humano, con el tiempo, los delfines se han utilizado en rehabilitación física y emocional de las personas. Incluso estos organismos se han utilizado por los militares debido a su inteligencia y habilidades (Ugaz et al., 2013). Por otra parte, los delfines han fomentado la educación ambiental, permitiendo a los humanos el acercamiento con estos animales. Sin embargo, desde mediados de 1970 el público comenzó a cuestionar la ética del cautiverio (WDCS, 2016).

Todos los animales en cautiverio y vida libre padecen de estrés. Éste es una respuesta biológica provocada por una amenaza (estresor) a su homeostasis (Moberg y Mench, 2000). Los animales en cautiverio tienen que sobrellevar cambios ambientales, físicos y sociales, relacionados con el diseño de los encierros, cambios en su alimentación y grupos sociales, todos los cuales provocan alteraciones en el comportamiento individual y su interacción grupal (Luna-Blassio et al., 2012).

Una manera de disminuir el estrés en cautiverio es mediante el enriquecimiento ambiental, siendo esto cualquier técnica diseñada para mejorar la función biológica de un animal en cautiverio a través de modificaciones a su medio ambiente. Los enriquecimientos van de acuerdo a la especie y a la función de la situación, e incluyen el enriquecimiento visual, auditivo, olfativo, táctil, alimenticio, estructural, social e interacciones humano-animal (Delfour y Beyer, 2011; Bahe, 2014). Las interacciones con los cuidadores y el entrenamiento adecuado permiten al animal escoger participar, lo cual es útil para ganarse su confianza, permitir encuentros cercanos con el animal, facilitando las consultas médicas veterinarias (Claxton, 2011).

El nado con humanos es una actividad de entretenimiento, que podría considerarse un enriquecimiento positivo para los delfines ya que fomenta la interacción social, la curiosidad y el juego. De este modo se incrementan las posibilidades de que los delfines desarrollen sus habilidades naturales, los comportamientos propios de su especie, así como el mantenimiento y la mejora de su bienestar (Claxton, 2011).

Sin embargo, el anterior supuesto no ha sido confirmado, siendo pocos los estudios publicados sobre la influencia que tiene el medio ambiente en el bienestar de delfines en cautiverio. La mayoría de ellos ha sido en instalaciones cerradas, pero no en instalaciones comunicadas con cuerpos de agua naturales o abiertas. Una menor cantidad de estudios se han publicado sobre el impacto que tiene el enriquecimiento ambiental en su bienestar.

En 2012, Luna-Blassio y colaboradores realizaron un estudio de comportamiento y niveles de cortisol en sangre de *T. truncatus* en instalaciones abiertas y cerradas con el fin de ampliar la información acerca de los indicadores de bienestar, y el cuidado y manejo en cautiverio. Los resultados indicaron que los niveles de cortisol no fueron influenciados por el tipo de instalación en donde se encontraban los organismos. Sin embargo, los resultados del comportamiento indican que las instalaciones abiertas influyen positivamente en la conducta de *T. truncatus*, probablemente por la calidad del espacio y la percepción animal del entorno.

Ugaz y colaboradores en 2013, midieron los estados del comportamiento individual y niveles de cortisol salival de *T. truncatus* en instalaciones abiertas y cerradas. En general, los resultados de comportamiento mostraron que los delfines mantenidos en instalaciones abiertas pasaban más tiempo nadando en patrones lineales, lo que demostraba menor estrés, en comparación con los patrones circulares de los delfines en instalaciones cerradas. Por otro lado, los delfines en instalaciones abiertas también tenían un menor nivel de cortisol salival que los de instalaciones cerradas. Para futuros estudios sugirieron incluir otros indicadores de bienestar como la función reproductiva y medidas de salud para conocer más sobre las relaciones del diseño de las instalaciones y el bienestar de los delfines.

El estudio de Delfour y Beyer en 2011, fue diseñado para medir el interés de los delfines y las reacciones de comportamiento hacia objetos introducidos en sus instalaciones. Los resultados revelaron una correlación positiva entre los comportamientos interactivos y de interés. Algunos delfines mostraron tener juguetes favoritos, sin embargo, sólo el 50% de los objetos fueron manipulados directamente. Estos descubrimientos demostraron que los delfines no tratan a todos los objetos como juguetes y los cambios en su comportamiento debido a la presentación de los objetos, no necesariamente indican un efecto de enriquecimiento.

Rangel-Martínez (2014), investigó si los programas de nado con humanos actuaban como actividades de enriquecimiento. El estudio se llevó a cabo en seis instalaciones de Dolphin Discovery, Quintana Roo, cuatro abiertas, dos cerradas, en donde se determinó la eficiencia de los programas de nado en la reducción del estrés utilizando técnicas clínicas de laboratorio comparando enzimas hepáticas y niveles de cortisol en sangre antes y después de los programas de nado. Además se determinó si los parámetros fisicoquímicos: temperatura, salinidad, pH, cloro y concentración de bacterias coliformes del agua de cada delfinario se encontraban en los rangos establecidos en la NOM-135 SEMARNAT, y se encontró que sólo una de las instalaciones cerradas no cumplía con el rango establecido de temperatura por la NOM. En cuanto a las enzimas hepáticas, los delfines de un delfinario con instalaciones abiertas presentaron una disminución significativa en una de seis enzimas analizadas. También se observó una disminución en la concentración de cortisol en sangre después de los programas de nado, pero sólo los machos presentaron diferencias significativas. Por lo tanto, el estudio no encontró evidencia de daño muscular, ni estrés por cortisol en los delfines involucrados en los programas de nado.

Hasta la fecha son pocas las investigaciones relacionadas con la producción de ácido láctico y la fisiología del ejercicio de *T. truncatus*. Williams y colaboradores (1993) investigaron las respuestas fisiológicas y energía locomotora de dos *T. truncatus* ejercitándose. El consumo de oxígeno, ritmo cardíaco, frecuencia respiratoria y concentración de lactato en sangre después del ejercicio fueron determinadas para los individuos ya sea cargando una célula de carga o nadando junto a un barco. Se encontró que el lactato aumentó después que los delfines hicieron ejercicio empujando la célula de carga y los valores no fueron diferentemente significativos a las demás variables analizadas. Concluyeron que el gasto energético de estos mamíferos es bajo en comparación con otros mamíferos marinos o semi acuáticos.

En este trabajo se evaluó si los programas de nado con humanos actúan como actividades de enriquecimiento ambiental para *T. truncatus*, comparando los niveles de estrés antes y después de los programas de nado. Se hicieron mediciones antes y después del primer programa de nado del día y se compararon con momentos similares en el último programa del día, de tal manera que pudimos cuantificar si existe o no un efecto de estrés acumulativo durante los programas de nado de un día. Se compararon otras variables que consideramos importantes, como las características

de edad, sexo y tiempo en cautiverio de cada delfín y el tipo de instalación, para así determinar si representan una variable significativa en la respuesta de estrés. Se evaluaron los niveles de cortisol en sangre, enzimas asociadas a daño muscular, concentraciones de ácido láctico, además se estimó el estado de salud general de cada individuo mediante biometrías y químicas sanguíneas para saber si algún resultado pueda atribuirse, cuando menos parcialmente, al estado de salud de los sujetos experimentales.

1.1 Estrés

Los animales responden a los cambios o a los retos en su medio ambiente mediante una variedad de mecanismos anatómicos, fisiológicos, bioquímicos, inmunológicos y de comportamiento. Una variedad de combinaciones de estas respuestas han sido descritas como respuesta al estrés (Ewbank, 1985). Moberg y Mench (2000) definen el estrés como la respuesta biológica provocada cuando un individuo percibe una amenaza a su homeostasis. La amenaza es conocida como 'estresor'.

La respuesta al estrés se divide en tres etapas: el reconocimiento del estresor, la defensa biológica contra el estresor y las consecuencias de la respuesta al estrés. Es esta última etapa la que determinará si un animal está bajo estrés o simplemente experimenta un breve episodio en su vida que no tendrá un impacto significativo en su bienestar (Moberg y Mench, 2000).

1.1.1 Reconocimiento del estresor y respuesta biológica

La respuesta al estrés se inicia con el sistema nervioso central cuando percibe una amenaza potencial, aunque no sea una amenaza significativa, es la percepción de la amenaza la que es crítica. Es por esto que los estresores psicológicos pueden ser devastadores. Éstos causan cambios biológicos significativos en el animal, los cuales podrían no tener valor para que el individuo se alivie del estresor percibido. Una vez que el sistema nervioso central percibe la amenaza, este desarrolla una respuesta biológica o defensa biológica, que consiste en una combinación de las respuestas de defensa biológica: la respuesta de comportamiento, respuesta autónoma del sistema nervioso, y la respuesta neuroendocrina o respuesta inmune (Moberg, 1985).

En el caso de muchos estresores, la primera y sin duda la respuesta biológicamente más común es la del comportamiento, el animal podría evadir al estresor exitosamente simplemente alejándose de la amenaza. Las respuestas con base al comportamiento no son apropiadas para todos los estresores, y los animales también podrían encontrarse en situaciones en donde las opciones son limitadas o arriesgadas (Moberg y Mench, 2000). Esto es especialmente una preocupación cuando el comportamiento del animal está limitado por el confinamiento, como es el caso de los animales en cautiverio.

Como segunda línea de defensa de un animal durante el estrés es el sistema nervioso autónomo. Durante el estrés, este sistema afecta a varios sistemas biológicos, incluyendo el sistema cardiovascular, gastrointestinal, las glándulas exocrinas y la médula adrenal. Los resultados son cambios en el ritmo cardíaco, presión sanguínea y actividad gastrointestinal. Las respuestas autónomas afectan sistemas biológicos muy específicos y los efectos biológicos son relativamente de corta duración, se puede decir que la activación del estrés del sistema nervioso autónomo no tiene un impacto significativo en el bienestar del animal a largo plazo (Moberg y Mench, 2000).

A diferencia de los efectos del sistema nervioso autónomo, las hormonas secretadas por el sistema neuroendocrino hipotalámico-pituitario tienen un efecto de larga duración en el cuerpo. Virtualmente todas las funciones biológicas que son afectadas por el estrés, incluyendo la capacidad inmunológica, reproducción, metabolismo y comportamiento, son reguladas por estas hormonas pituitarias (Moberg y Mench, 2000).

1.1.2 Respuesta adaptativa al estrés

La respuesta fisiológica al estrés momentáneo es considerada adaptativa porque dirige la energía del organismo a las funciones que aumentan su supervivencia y pospone las que no son necesarias en el momento. Sin embargo, si el factor estresante no desaparece y los niveles de estrés permanecen elevados por más de algunos días, se provoca una variedad de consecuencias negativas amplias, esta situación se conoce como estrés crónico. Estos efectos negativos aparecen como patologías en el largo plazo e incluyen la depresión del sistema inmune, favoreciendo un incremento en la susceptibilidad a enfermedades; la inhibición de la reproducción, la pérdida de tejido muscular y el decremento en la capacidad de aprendizaje (Moberg, 1985).

1.1.3 Mediciones de estrés

Para medir el estrés se usan otros métodos además del análisis de comportamiento, el cual puede indicar estrés, pero no puede indicar cuantitativamente el nivel del mismo. En este estudio se midió el estrés mediante las concentraciones de cortisol, una hormona que se libera en respuesta al estrés que suprime al sistema inmunológico; las enzimas hepáticas asociadas a daño muscular, que aumentan su concentración durante el estrés físico y la concentración de ácido láctico, el cual aumenta cuando hay una demanda grande y rápida de energía en tejidos.

1.1.3.1 Cortisol

Para comprender los efectos del estrés en el sistema inmune es importante estudiar los mecanismos individuales de la inmunosupresión en él. Quizás el mecanismo más sencillo para definir es el de la inmunosupresión causada por el incremento en los niveles de cortisol en sangre. Una respuesta general del cuerpo hacia el estrés es la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (por sus siglas en inglés, ACTH) de la glándula pituitaria anterior, la cual estimula la corteza adrenal para incrementar la síntesis y la secreción del cortisol o hidrocortisona (Moberg, 1985).

La exposición prolongada o constante a estresores, que incrementa los niveles de cortisol en sangre da lugar a la supresión del sistema inmune. Los glucocorticoides y la noradrenalina inhiben el funcionamiento de los sistemas con mayor gasto energético, digestivo, crecimiento e inmune, con el fin de que el organismo utilice esa energía para hacer frente a la situación de estrés (Gómez y Escobar, 2006).

En gran parte de los estudios para medir cortisol en delfines se utiliza la técnica de radioinmunoensayo (por sus siglas en inglés, RIA), siendo un método muy sensible que proporcionó un avance importante en la identificación y cuantificación de antígenos y anticuerpos en mezclas complejas mediante un etiquetado radioactivo para detectar el alcance de la reacción (Lackie, 2013; Petty et al., 2016; Moticka, 2016). Otros estudios trabajan con la técnica de ELISA competitivo, siendo un proceso competitivo de unión ejecutado por el antígeno original (antígeno muestra) y el antígeno complementario. El procedimiento de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés, ELISA) competitivo es diferente en algunos aspectos a los demás tipos de ELISA. En este caso el anticuerpo primario (sin marcar) se incuba con antígeno de muestra, después los

complejos anticuerpo-antígeno se añaden a las placas de 96 pocillos que se recubren previamente con el mismo antígeno, y el anticuerpo unido se elimina lavando la placa (mientras más antígeno haya en la muestra, menos anticuerpos podrán unirse al antígeno en el pozo, de ahí la “competencia”), de aquí se agrega el anticuerpo secundario específico del anticuerpo primario y el conjugado de enzima, por último se agrega un sustrato y las enzimas restantes provocan una señal cromogénica o fluorescente. Cuanto mayor es la concentración del antígeno de la muestra, más débil es la señal eventual. La principal ventaja del ELISA competitivo es la capacidad de utilizar muestras crudas o impuras y aun así unirse selectivamente a cualquier antígeno que pueda estar presente (Sino Biological, 2017).

Para el actual estudio se utilizó el kit DRG Cortisol ELISA, siendo un ensayo en fase sólida de inmunoabsorción unido a enzimas, basado en el principio de unión competitiva en donde los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un foco antigénico en la molécula cortisol. En las muestras, el cortisol compite con un conjugado cortisol-peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Seguido de la incubación el conjugado no unido se lava. La cantidad de conjugado peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra del individuo (DRG Instruments GmbH, 2017).

1.1.3.2 Enzimas musculares

Una manera de determinar si hay daño muscular es mediante las enzimas asociadas. Estas normalmente se encuentran presentes en la sangre como resultado de la renovación celular y pueden aumentar su concentración durante el estrés físico, por el incremento de la permeabilidad celular y el daño a células musculares (Rangel-Martínez, 2014). Los niveles anormalmente altos de estas enzimas pueden indicar daño hepático, alteraciones en el flujo biliar, daño en músculo esquelético, enfermedades del sistema nervioso central, etc. (Dierauf y Gulland, 2001).

Para medir las enzimas hepáticas musculares, además de otros parámetros bioquímicos los veterinarios recomiendan el uso de un autoanalizador IDEXX (Vet-Test), el cual destaca por su flexibilidad, precisión y facilidad de uso gracias a su tecnología de placa seca que minimiza los

efectos de las sustancias que pueden interferir en un análisis. Las placas cuentan con una capa de extensión en donde la muestra se distribuye uniformemente, una capa de filtración donde filtra cualquier sustancia que interfiera con los resultados, una capa reactiva en donde el reactivo reacciona con la muestra, la capa indicadora en donde la muestra que ha reaccionado se acumula para el análisis espectral y por último, la capa de soporte con interfaz óptica (IDEXX laboratories, 2017).

El nado con delfines es una actividad física que puede ocasionar daño muscular en los delfines por el esfuerzo que realizan en las actividades de entretenimiento (Alaniz, 2010) con sus entrenadores y visitantes, como el cargarlos con sus hocicos, pasearlos por las instalaciones.

1.1.3.3 Ácido Láctico

A medida que los animales realizan ejercicio hasta agotarse, comienzan a respirar más rápido mientras intentan transferir más oxígeno a los músculos activos. El músculo genera la mayor parte de su energía utilizando métodos aeróbicos, es decir, con oxígeno. Sin embargo, algunas circunstancias requieren una producción de energía más rápida de lo que nuestros cuerpos pueden suministrar adecuadamente oxígeno. En esos casos, los músculos que trabajan generan energía anaerómicamente. Esta energía proviene de la glucosa a través de la glucólisis, proceso en que la glucosa se descompone o se metaboliza en una sustancia llamada piruvato. Cuando el músculo tiene mucho oxígeno, el piruvato es transportado a una vía aeróbica para ser desglosado para obtener más energía, pero cuando el oxígeno está limitado, el músculo convierte temporalmente el piruvato en lactato, que permite que la descomposición de la glucosa, y por lo tanto, la producción de energía continúe (Roth, 2006).

1.2 Biometría y química sanguínea: Estudio de salud general

Los análisis de sangre realizados en una evaluación de salud se interpretan en conjunto con un examen clínico y un historial médico previo. La hematología es la manera de estudiar los elementos de la sangre, y es de gran importancia para la identificación temprana de un mal físico o una enfermedad. Variaciones en el tamaño, forma y número de las células sanguíneas genera una idea temprana del funcionamiento de la sangre y la médula ósea donde se hace la sangre, además de los factores clínicos que pueden afectarla (Kerr, 2002).

Las pruebas bioquímicas miden las sustancias químicas transportadas por la sangre. Las pruebas clave indican el nivel de funcionamiento del hígado y los riñones. También miden los niveles de azúcar y grasas circulando el cuerpo (Kerr, 2002). Las enzimas musculares antes mencionadas son parte de las pruebas químicas.

1.3 *Tursiops truncatus*

Tursiops truncatus, también conocido como delfín nariz de botella común o tonina recibe su nombre del latín *Tursio* (delfín) y del sufijo griego –ops (aparición), *truncatus* deriva del latín *trunco-* (truncado), refiriéndose a sus dientes aplanados como una característica de identificación. Estos delfines tienen una distribución cosmopolita, se encuentra en la mayoría de los océanos cálidos templados y tropicales del mundo, tanto en las costas como fuera de estas. Son reconocidos por su apariencia generalizada, la cual consiste en un tamaño mediano, cuerpo robusto, aleta dorsal encorvada moderadamente, y una coloración oscura. La longitud de los adultos va de los 2.5 m a 3.8 m, variando de acuerdo a la distribución geográfica. La dieta de *T. truncatus* consiste de una gran variedad de peces y calamares (Perrin et al., 2008).

Tursiops truncatus presenta un gran espectro de movimientos, incluyendo migraciones estacionales, residencia periódica, y una combinación de movimientos ocasionales de larga distancia y residencia local repetida. Normalmente se encuentran en grupos de 2 a 15 individuos, aunque se han encontrado grupos de más de 1000 especímenes. La composición de los grupos tiende a ser dinámica en cuanto a sexo, edad, condición reproductiva, relaciones familiares e historias de afiliación. Las hembras pueden llegar a vivir hasta 57 años, y los machos hasta 48. La madurez sexual depende de la región, pero en general las hembras entran en la madurez a los 5-13 años, mientras que en los machos ocurre a los 9-14 años (Perrin et al., 2008).

1.3.1 *Tursiops truncatus* en cautiverio

El cautiverio de los mamíferos marinos se expande desde el siglo XIX hasta nuestros días. En los años 1860 y 1870 las primeras belugas y delfines fueron capturadas y llevadas a acuarios por todo Estados Unidos y Europa. Marineland de Florida, E.E. U.U., abrió sus puertas en 1938 y en 1947 fue el hogar

del primer delfín nariz de botella nacido en cautiverio. El uso de delfines en cautiverio comenzó como entretenimiento para los humanos, con el tiempo se han usado para tratar a personas que necesitan de rehabilitación física y emocional e incluso para ayuda militar; debido a su inteligencia y habilidades únicas. La industria fue creciendo y en la actualidad hay varias entidades de la República Mexicana que cuentan con delfinarios como Quintana Roo, Jalisco, Guerrero, Sonora, Distrito Federal y Baja California Sur (Alaniz, 2010).

Tursiops es el género de delfines que más se encuentra en cautiverio alrededor del mundo. Dentro de Estados Unidos, aproximadamente el 70% de los delfines en cautiverio se mantienen en exhibición, mientras el resto es principalmente usado para investigación y propósitos militares. La mejora de las instalaciones y el incremento de conocimiento acerca de los requisitos para el cuidado de los delfines ha llevado a un incremento en el éxito de mantenimiento de largo plazo de los animales, al punto donde los nacimientos y los rangos de supervivencia en las mejores instalaciones, se aproximan y, probablemente en algunos casos, superen a las poblaciones en vida libre (Perrin et al., 2008).

Sobre la composición de los grupos en cautiverio, se han observado jerarquías dominantes, con machos adultos grandes dominando a los demás compañeros del recinto, hembras formando jerarquías menos rígidas, con las hembras más grandes dominando a las más pequeñas. El contacto y la postura son usados para establecer y mantener las jerarquías (Perrin et al., 2008).

Tursiops truncatus al igual que otros mamíferos marinos que han sido mantenidos en cautiverio, tienen que enfrentar factores de estrés que son demandantes sobre sus habilidades adaptativas, situación que repercute negativamente sobre su bienestar. Estos animales tienen que sobrellevar cambios ambientales físicos y sociales, relacionados con el diseño de los encierros, cambios en su alimentación y grupos sociales, que provocan alteraciones en el comportamiento individual y su interacción grupal (Luna-Blassio et al., 2012). Sin embargo, no todo el estrés es negativo, ya que algunas situaciones estresantes como el explorar un nuevo elemento en su ambiente o el apareamiento, usualmente son vistos como benéficos (RSPCA, 2016).

1.3.2 Instalaciones de cautiverio

Las instalaciones en cautiverio para delfines pueden ser tanto cerradas, como abiertas. Las cerradas consisten en infraestructuras (piscinas de construcción compleja) donde el agua es regulada por sistemas de filtración, y la temperatura, pH y otras características son controladas para mantener una calidad óptima. Las instalaciones abiertas son infraestructuras para el confinamiento de mamíferos marinos en su medio natural, el cual recibe intercambio de agua del exterior ya sea por flujo de mareas u otras fuentes (NOM-135-SEMARNAT, 2004). El diseño de las instalaciones y la incorporación de factores ambientales están mejorando continuamente. Por otro lado, la instalación debe ser adecuada y capaz de alojar grupos sociales compatibles y apropiados (CCAC, 2014).

1.3.3 Actividades de entretenimiento

Las actividades de entretenimiento que realizan los delfines en cautiverio consisten en los programas de nado, “acariciar y alimentar” y la terapia asistida por delfines, conocida como delfinoterapia (Curtin y Wilkes, 2007). Los programas de nado y el “acariciar y alimentar” son las actividades más comunes de los delfinarios, estas consisten en sesiones de aproximadamente 40 a 60 minutos con un grupo de personas en contacto directo con los delfines, en donde hay experiencias de aprendizaje, interacciones, besos, paseos sobre sus aletas pectorales, paseos donde son impulsados sobre el hocico de dos delfines, etc. (Dolphin Discovery, s/f).

1.4 Enriquecimiento ambiental

Una manera de disminuir el estrés en cautiverio es mediante el enriquecimiento ambiental, el cual constituye los esfuerzos para disminuir la pobreza del medio ambiente incluyendo variables como la composición de los grupos, la diversidad de la dieta, el espacio físico del recinto (instalación) y las interacciones entre cuidadores, visitantes y animales. Enriquecimiento animal se define como cualquier técnica diseñada para mejorar la función biológica (incrementar el éxito reproductivo, incrementar el fitness o la salud en general) de un animal en cautiverio a través de modificaciones a su medio ambiente (Delfour y Beyer, 2011; Bahe, 2014).

Las técnicas de enriquecimiento pueden ser usadas para reforzar la apariencia de los comportamientos deseados como comportamiento exploratorio, juego, interacción social, etc., disminuir la frecuencia de comportamientos indeseados como comportamientos agresivos, estereotípicos, automutilación, disminuir malos comportamientos alimenticios, coprofagia y regurgitación, y reducir el exceso de comportamientos auto-dirigidos. Los tipos de enriquecimiento van de acuerdo a la especie y a la función de la situación, e incluyen el enriquecimiento visual como espejos y televisiones; auditivos como vocalizaciones animales o música; olfativos, esencias naturales o artificiales; alimenticios, que incluyen búsqueda, captura, extracción de alimento disperso, entero, escondido o vivo; táctiles, como proveer pelotas, cajas y otros objetos; estructurales, cambios en el espacio físico del recinto; sociales, añadiendo o retirando compañeros; interacciones humano-animal, interacciones positivas entre animales y cuidadores, o animales y visitantes (Delfour y Beyer, 2011; Bahe, 2014).

Un factor clave que contribuye a como los animales en cautiverio reaccionaran a su medio ambiente es la relación con humanos. Las interacciones con los cuidadores y el entrenamiento adecuado permiten al animal escoger participar, lo cual es útil para ganarse su confianza, permitir encuentros cercanos con el animal, y así facilitar las consultas médicas veterinarias (Claxton, 2011).

Parte del enriquecimiento animal en los delfinarios es justamente la interacción humano-animal, en este caso el nado con delfines. Esta actividad puede considerarse un enriquecimiento positivo ya que fomenta la interacción social, la curiosidad y el juego. De este modo se incrementan las posibilidades de que los delfines desarrollen sus habilidades naturales, los comportamientos propios de su especie, así como el mantenimiento y la mejora de su bienestar (Claxton, 2011). Es debido a esto que el enriquecimiento animal es tan importante para el bienestar de los delfines en cautiverio, como lo es la nutrición y la medicina veterinaria.

Uno de los problemas que enfrenta el enriquecimiento ambiental es comprobar la eficiencia de las diferentes actividades. Una de las técnicas más utilizadas es la etología que conlleva a observaciones del comportamiento, lo cual tiene como principal ventaja el hecho de que usa métodos no invasivos para estudiar indirecta y directamente las reacciones de los animales hacia los programas en cautiverio (Delfour y Beyer, 2011). Por otro lado, como desventaja, es difícil hacer observaciones diariamente y por periodos largos (Claxton, 2011; Delfour y Beyer, 2011). Al trabajar con

comportamiento basado en observación humana no se tiene una seguridad absoluta de su efecto, sino más bien es una suposición. Es por esto que es útil y necesario el uso de análisis moleculares para obtener un estudio más completo, verídico, comprobable y repetible.

El enriquecimiento ambiental es un campo muy amplio, sin embargo, los enriquecimientos se centran más en mamíferos y otros vertebrados terrestres, a comparación de los mamíferos marinos (Claxton, 2011). Por otro lado, hay menos estudios de *T. truncatus* en cuanto al efecto del ambiente y el enriquecimiento ambiental sobre su comportamiento y el bienestar (Delfour y Beyer, 2011; Luna Blassio et al., 2012; Ugaz et al., 2013).

1.5 Justificación

Debido a que la mayoría de los estudios relacionados en el bienestar de *Tursiops truncatus* en cautiverio están basados en análisis ecológicos sin más evidencia cuantitativa de apoyo, se realizó una evaluación del bienestar mediante análisis químicos y hematológicos para obtener un estudio más completo.

La mayoría de los estudios que hay sobre enriquecimiento ambiental en cautiverio para *T. truncatus* son con base en la introducción de objetos novedosos a sus instalaciones, por lo que se hace necesario hacer un análisis más profundo sobre el impacto que tienen los programas de nado con humanos en el bienestar de *T. Truncatus* y si éstos proporcionan un enriquecimiento ambiental positivo.

Estudios previos tanto moleculares como etológicos sobre el impacto de los programas de nado hacen una comparación entre el antes y después de un mismo programa de nado, en este caso se llevó a cabo una comparación entre el antes y después del primer programa de nado del día con el antes y después del último, para identificar si hay cambios significativos a lo largo del día en las variables seleccionadas.

1.6 Hipótesis

La evaluación del estado de salud general de *Tursiops truncatus* mediante biometría y química sanguínea no mostrará cambios estadísticamente significativos del primer al último programa de nado del día.

Las concentraciones de enzimas musculares en *Tursiops truncatus* antes y después del primer y último programa de nado no tendrán un cambio estadísticamente significativo.

Las concentraciones de ácido láctico en *Tursiops truncatus* tendrán cambios estadísticamente significativos pero clínicamente aceptables antes y después del primer y último programa de nado, debido al gasto de energía a lo largo del día.

Los niveles de cortisol de *Tursiops truncatus* antes y después del primer y último programa de nado no mostraran un cambio estadísticamente significativo, de manera que no demuestre un efecto acumulativo.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Evaluar si los programas de nado actúan como actividades de enriquecimiento ambiental para *Tursiops truncatus*, comparando los niveles de distintas variables antes y después del primer programa del día, junto con el antes y después del último programa.

1.7.2 Objetivos particulares

- Evaluar el estado de salud general de *Tursiops truncatus* a través de la biometría y química sanguínea en individuos problema y controles negativos antes del primer y último programa de nado del día para determinar la influencia de la salud en los resultados experimentales.

- Evaluar los niveles de las enzimas asociadas al daño muscular en individuos problema y controles negativos antes y después del primer y último programa de nado del día, para obtener la influencia de estos en la salud general de *Tursiops truncatus*.
- Evaluar las concentraciones de ácido láctico en individuos problema y controles negativos antes y después del primer y último programa de nado del día, para obtener la influencia de estos en la salud general de *Tursiops truncatus*.
- Evaluar los niveles de cortisol en sangre en individuos problema y controles negativos antes y después del primer y último programa de nado del día, para obtener la influencia de estos en la salud general de *Tursiops truncatus*.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, establecer cómo se pueden mejorar los programas de nado de *Tursiops truncatus* y que otras variables podrían estar modificándose para mejorar su bienestar.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en 5 delfinarios de la empresa Dolphin Discovery en el estado de Quintana Roo, México: (1) Isla Mujeres (IM) $21^{\circ}14'4.31''\text{N}$, $86^{\circ}44'30.03''\text{O}$, (2) Puerto Aventuras (PA) $20^{\circ}30'1.12''\text{N}$, $87^{\circ}13'35.68''\text{O}$, (3) Cozumel (CZ) $20^{\circ}26'38.96''\text{N}$, $86^{\circ}59'39.06''\text{O}$, (4) Maroma (MR) $20^{\circ}43'27.99''\text{N}$, $86^{\circ}58'35.45''\text{O}$, (5) Akumal (AK) $20^{\circ}25'55.89''\text{N}$, $87^{\circ}17'53.52''\text{O}$ (Figura 1).

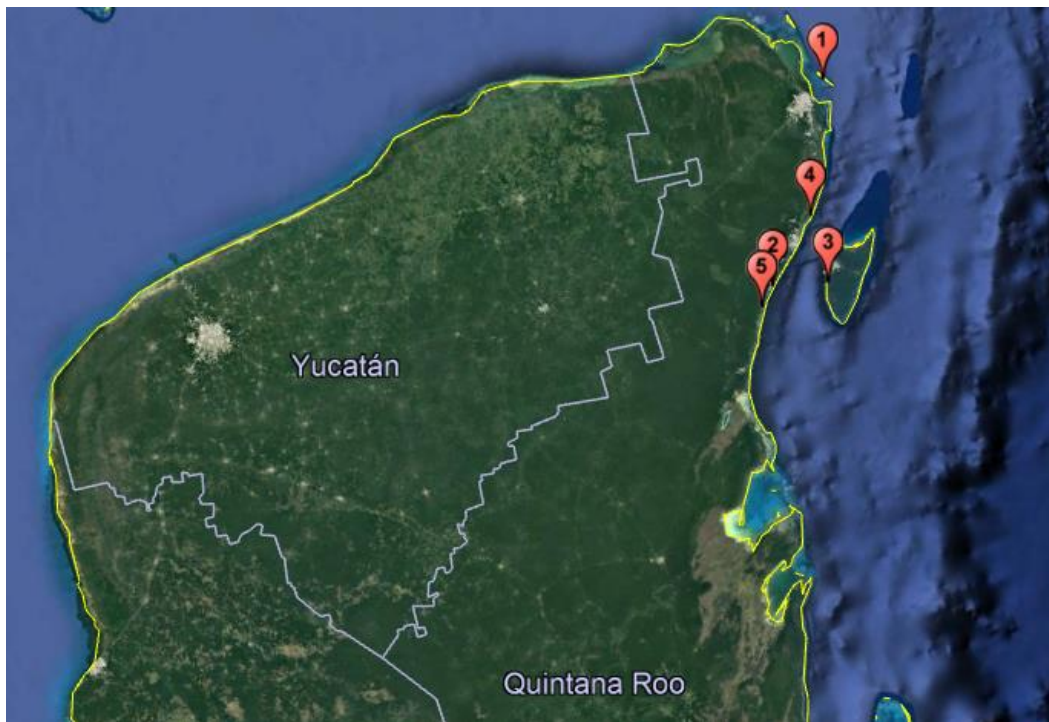


Figura 1: Mapa donde se muestra la ubicación de las cinco instalaciones de Dolphin Discovery Quintana Roo, en donde se realizó el presente estudio. Imagen satelital de Google Earth.

2.2 Delfines

Se seleccionaron 15 delfines problema, cuatro delfines de las instalaciones de Isla Mujeres, Puerto Aventuras, Cozumel, uno de Maroma y dos de Akumal de acuerdo a la facilidad de la toma de muestra de sangre con cada uno. Como controles negativos se tomó a tres delfines, uno por instalación, de Isla Mujeres, Puerto Aventuras y Cozumel, siendo aquellos individuos que pudieron aislarse de 12 a 24 horas sin participar en programas de nado. La información general de cada delfín

correspondiente a localidad, sexo, edad, nacimiento en cautiverio o vida libre y tiempo en cautiverio se obtuvo mediante el historial clínico de Dolphin Discovery.

2.3 Toma de muestras de sangre

La sangre se obtuvo de la aleta caudal de cada individuo muestreado. Se extrajeron cuatro muestras de sangre de cada delfín con la ayuda de un catéter de mariposa. Dos de estas muestras se colocaron en tubos vacutainers que contenían EDTA (1mg/ml) para evitar la formación de coágulos, estos se usaron para las biometrías sanguíneas. Las otras dos muestras se tomaron en tubos vacutainers sin coagulante para la separación de suero, utilizado para la química sanguínea y niveles de cortisol, y el plasma para las concentraciones de ácido láctico. Las muestras se tomaron antes (T1) y después (T2) del primer programa de nado, y antes (T3) y después (T4) del último programa de nado del día. A los controles negativos se les tomaron muestras en el horario correspondiente al primer y último programa de nado del día.

Las biometrías y químicas sanguíneas se realizaron en los laboratorios pertenecientes a Dolphin Discovery, mientras que la evaluación de cortisol se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología Marina en CICESE. Los estudios para obtener la concentración de ácido láctico en plasma se realizaron en los Centros Químicos de la ciudad de Playa del Carmen y Cancún, Quintana Roo.

2.4 Biometría sanguínea

Se realizaron dos hemogramas completos por delfín con las muestras de sangre en tubos con EDTA (Trhall *et al.*, 2012) antes del primer y último programa de nado del día. Se determinó la concentración de proteínas plasmáticas y el hematocrito según Rangel-Martínez (2014) y Trhall *et al.* (2012). A partir del valor del hematocrito, concentraciones de hemoglobina y el porcentaje de eritrocitos se calcularon volumen celular medio (VCM), hemoglobina celular media (HCM) y la concentración celular media de hemoglobina (CHCM).

Para el conteo de glóbulos rojos se utilizó el diluyente isotónico Hayen en concentración 1:200 sangre:solución. Para los glóbulos blancos se le añadió el diluyente Turk para evidenciar los leucocitos en concentración 1:20 de sangre: solución. Ambos conteos se llevaron a cabo mediante

un microscopio compuesto (Olympus, CX21, Japón) a 10x y 40x respectivamente, con la ayuda de una cámara Neubauer. Se realizó un frotis sanguíneo contando 100 células para obtener el recuento diferencial entre neutrófilos, basófilos, monocitos, eosinófilos y linfocitos utilizando el objetivo 100x. Cada parámetro analizado se encuentra descrito de acuerdo a Dierauf y Gulland (2001) en el Anexo I.

2.5 Obtención del Suero y Plasma

Los tubos vacutainer con coagulante para la química sanguínea, niveles de cortisol y concentraciones de ácido láctico, se dejaron reposar de 20 a 40 minutos hasta notar la formación del coágulo. Posteriormente se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 30 minutos para notar la separación suero-plasma. Se observaba la muestra y de presentar fibrina, esta última se despegaba y se centrifugaba de nuevo de 10 a 15 minutos (Proie, 2013). Por último se extraía el suero y el plasma con una micropipeta y se transferían a tubos cónicos (1.5 ml) por separado.

2.6 Química sanguínea y enzimas musculares

Al igual que la biometría hemática, la química sanguínea se realizó antes del primer y último programa de nado del día, en individuos problema y controles negativos. Los metabolitos químicos aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) gamma glutamil transpeptidasa (GGT), creatina quinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) se analizaron antes y después del primer y último programa de nado del día, para evaluar si existe una alteración significativa que indique cierto daño muscular durante los programas de nado.

Se utilizó el autoanalizador IDEXX (Vet-Test, EEUU), y las laminillas correspondientes al equipo (Equine Health Profile) para la determinación de los parámetros bioquímicos, enzimas musculares, metabolitos, proteínas totales y glucosa. Para realizar el análisis se utilizó 1 ml de muestra de suero de cada delfín correspondiente a cada programa de nado y se corrió en el programa de ganado de carne por ser *Bos taurus* la especie evolutivamente más cercana a los delfines del autoanalizador IDEXX. Cada parámetro analizado se encuentra descrito en el Anexo VI de acuerdo a Dierauf y Gulland (2001).

También se realizó la relación albumina-globulina (A/G) dentro de la química sanguínea para obtener un perfil más completo sobre la salud general de cada individuo. Para obtener este parámetro se dividieron los valores de albumina entre los de globulina, siendo >1 por encima del rango normal y <1 por debajo del rango establecido (Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003).

2.7 Concentración de ácido láctico

El análisis para obtener las concentraciones de ácido láctico se realizó con las muestras antes y después del primer y último programa, tanto en los individuos problema, como en los controles negativos. El estudio se llevó a cabo en el Centro Químico Playa del Carmen, Quintana Roo (Av. 30 Nte. Entre Calle 4 y 6, Lote 6-A, Colonia Centro y otra parte en el Centro Químico de Cancún, Quintana Roo (Av. Nichupté esquina Av. Chac Mool, Local 43, Plaza Soriana, ya que no se contaba con el equipo en las instalaciones de Dolphin Discovery. Las muestras de plasma de los individuos se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

2.8 Evaluación del cortisol

Las muestras de suero para la evaluación de los niveles de cortisol se tomaron antes y después del primer programa y último programa de nado con humanos en los individuos problema, mientras que antes del primer y último programa en los controles negativos. Las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

La concentración de cortisol en suero se cuantificó mediante una prueba de ELISA, mediante el kit comercial Cortisol ELISA (DRG, EEUU) para suero humano. Para poder utilizar el kit fue necesario seguir con el protocolo de concentración de esteroides descrito por Hany y colaboradores (1999), debido a las bajas concentraciones de cortisol en suero de delfín.

Una vez concentradas todas las muestras, se siguió el procedimiento de ensayo de acuerdo al kit Cortisol ELISA (DRG, EEUU). El ensayo incluye una curva de calibración utilizando valores estándares con concentraciones de 1, 20, 50, 100, 200, 400, 800 ng/ml. Se dispensaron 20 μl de cada estándar, control y muestras, además de 200 μl del conjugado de enzima en cada pocillo de la placa de ELISA correspondiente. Se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente, se sacudió el contenido

de los pocillos y se lavó cada pocillo tres veces con 400 μ l de la solución de lavado. Posteriormente se agregaron 100 μ l de la solución de sustrato a cada pocillo y se deja reposar durante 15 minutos. La reacción enzimática se detuvo agregando 100 μ l de la solución “STOP” y en los siguientes 10 minutos se leyó la densidad óptica a 450 ± 10 nm con un lector de microplacas.

Se realizó una curva de calibración utilizando valores estándares del kit Cortisol ELISA (DRG, EEUU), y se generó la línea de tendencia para obtener la ecuación mediante la cual se transforman los valores de absorbancia a concentraciones de cortisol (ng/ml) El resultado se dividió entre el factor de corrección (1/9.02).

2.9 Análisis estadístico

En los resultados de biometría y química sanguínea, para determinar si habían diferencias significativas antes del primer y último programa a lo largo del día se realizó una prueba t pareada para los datos que fueron normales y para los datos que no tenían normalidad una prueba de rangos Wilcoxon, con un nivel de significancia de 0.05, utilizando el programa estadístico R Studio (R Core Team, 2017). Además se realizó un análisis de componentes principales (PCA) en biometría sanguínea para descartar alguna relación de los resultados por encima o debajo del rango en cuanto a la localidad, sexo y edad de los individuos.

En cuanto a enzimas musculares, ácido láctico y cortisol, para determinar si habían diferencias significativas entre el antes y después del primer y último programa de nado se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para los datos que fueron normales y para los datos que no tenían normalidad una prueba Kruskal-Wallis, y Tukey como prueba a posteriori, con un nivel de significancia de 0.05, utilizando el programa estadístico R Studio (R Core Team, 2017). Los controles negativos se realizaron análisis de pruebas t pareadas para datos normales y pruebas de rango Wilcoxon para datos no normales ya que sólo se cuenta con dos valores de un mismo origen, antes del primer y último programa. Para llevar a cabo una evaluación más completa estas pruebas se hicieron para el total de delfines, controles negativos, por instalación, sexo, tres diferentes rangos de edad, si nació en cautiverio o en vida libre y el tiempo en cautiverio. Simbología y significado presentes en el Anexo II.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Delfines

Un total de 18 organismos fueron utilizados para este estudio. 15 individuos fueron seleccionados como organismos problema y 3 como organismos control (Tabla 1).

Tabla 1: Información general de los delfines muestreados. Los delfines (-) se utilizaron como control negativo. Origen C=Cautiverio, VL=Vida Libre, * Instalaciones cerradas, ** Individuos muestreados en el estudio de Rangel-Martínez (2014).

No.	Ejemplar	Localidad	Sexo	Edad (años)	Origen	T. cautiverio (años)
1	Athos	Isla Mujeres	M	7	C	6
2	John	Isla Mujeres	M	6	C	6
3	Madonna**	Isla Mujeres	H	20	V	13
4	Picasso**	Isla Mujeres	M	23	VL	11
5	Athila**	Puerto Aventuras	M	9	C	9
6	Chaac	Puerto Aventuras	M	31	VL	12
7	Jogo	Puerto Aventuras	M	13	C	13
8	Tatich**	Puerto Aventuras	M	13	C	13
9	Apolo**	Cozumel	M	19	VL	16
10	Davinci**	Cozumel	M	11	C	11
11	Jupiter**	Cozumel	M	23	VL	13
12	Ramses**	Cozumel	M	9	C	9
13	Pakal	Maroma*	M	9	C	9
14	Elena	Akumal*	H	4	C	4
15	Cielo**	Akumal*	H	20	VL	14
16	Porthos (-)	Isla Mujeres	M	6	C	6
17	Shadia (-)	Puerto Aventuras	H	35	VL	22
18	Diego (-)	Cozumel	M	4	C	4

Fuente: Historial clínico Dolphin Discovery.

3.2 Biometría y química sanguínea

Los resultados se encuentran en el Anexo I y se compararon con los valores normales para delfines *T. truncatus* en cautiverio de acuerdo a Dierauf y Gulland (2001). En las células rojas en la sangre (CRS), el promedio del T1 de los individuos problema se encuentra dentro del rango y el T2 fuera del rango. Ambos tiempos se encuentran dentro del rango en los controles negativos, y no hay

diferencias significativas. Hemoglobina (Hb), hematocrito (Ht), volumen celular medio (VCM), hemoglobina celular media (HCM), concentración de hemoglobina celular media (CHCM) se encontraron dentro del rango en ambos tiempos tanto en individuos problema como controles negativos y sin presentar diferencias significativas. HCM se salió por encima del rango en el T3 por décimas, pero igual sin diferencias significativas. Leucocitos y neutrófilos se mantuvieron en el rango en ambos tiempos en individuos problema y controles negativos, sin embargo, neutrófilos mostraron diferencias significativas entre los tiempos en los individuos problema ($p=0.015$ $n=15$). Los linfocitos se mantuvieron en el rango en los individuos problema, y mostraron valores por encima del rango en los controles negativos, sin presentar diferencias significativas. Los monocitos estuvieron por debajo del rango en ambos tiempos en individuos problema y el T3 de los controles negativos, sin diferencias significativas. Eosinófilos mostraron valores dentro del rango en individuos problema y por debajo de este en controles negativos, sin diferencias significativas. El rango de sedimentación de eritrocitos (RSE) se mantuvo dentro de lo establecido en ambos tiempos, tanto en individuos problema como controles negativos. Se encontraron diferencias significativas entre el T1 y T2 en individuos problema ($p=0.025$ $n=12$).

El análisis de componentes principales (ACP) demostró que no hay una relación de los parámetros de biometría sanguínea en cuanto a la locación del delfinario, sexo y edad de los individuos muestreados (Anexo I).

Las proteínas totales (PT), en promedio se encontraron dentro del rango en ambos tiempos en individuos problema y controles negativos sin diferencias significativas. La albumina se encontró por debajo del rango en los dos tiempos en individuos problema y controles negativos, presentando diferencias significativas entre T1 y T3 en individuos problema ($p=0.025$ $n=15$). Por el contrario, las globulinas se encontraron por encima del rango en ambos tiempos en individuos problema y controles negativos, sin diferencias significativas. La glucosa se encontró en el rango en ambos tiempos para individuos problema y controles negativos, sin diferencias significativas. Nitrógeno ureico en sangre (NUS), se encontró por encima del rango en el T3 en individuos problema, mostrando diferencias significativas entre tiempos ($p=1.02E-7$ $n=15$). El T1 de individuos problema y ambos tiempo de los controles negativos se encontraron dentro de lo establecido. La creatinina estuvo por debajo del rango en el T3 en individuos problema, presentando diferencias significativas ($p=0.0003$ $n=15$), mientras que el T1 de individuos problema y ambos tiempos de los controles

negativos se encontraron dentro del rango. El calcio se mantuvo dentro del rango establecido en ambos tiempos pero mostro diferencias significativas entre los tiempos de los individuos problema ($p=0.005$ $n=15$) y en los controles negativos ($p=0.03$ $n=3$).

3.2.1 Relación albumina-globulina (A/B)

Los resultados de la relación albumina-globulina (Anexo I) en individuos problema y controles da valores por encima y debajo del rango normal establecido, 1. Sin embargo, el promedio de A/G da únicamente da valores por debajo del rango.

3.3 Enzimas asociadas a daño muscular

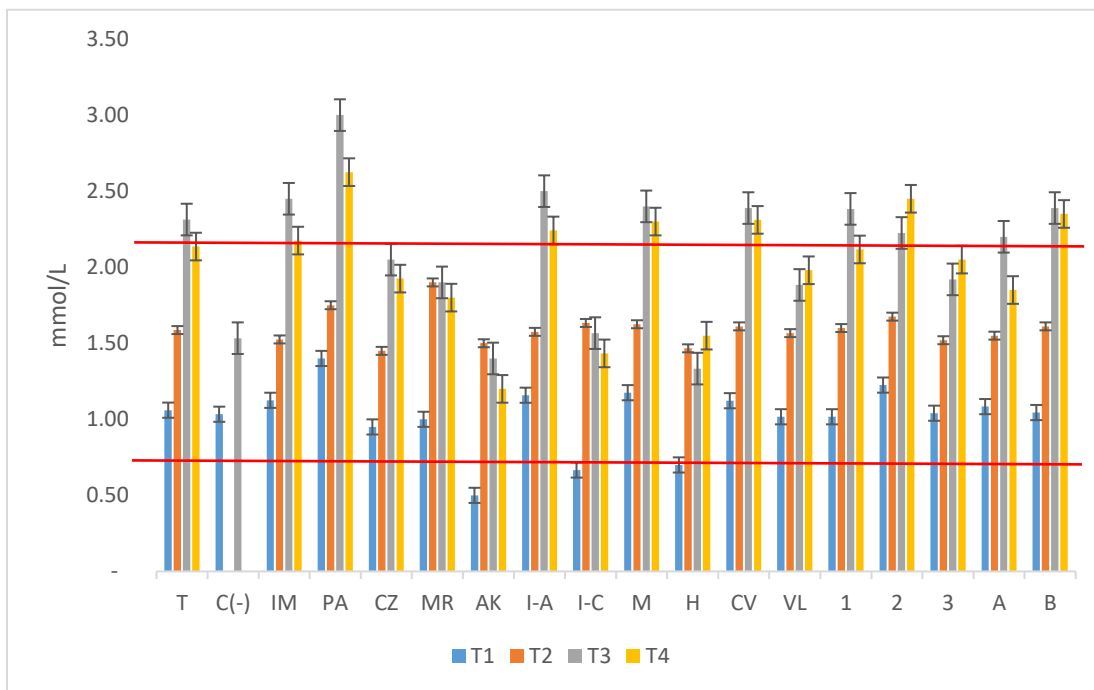
En los resultados presentes en el Anexo III se pueden observar tanto aumentos como disminuciones en los valores promedio entre los cuatro tiempos del muestreo. Sin embargo, al analizar los resultados mediante análisis de varianza (ANOVA), no se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) en ninguna de las seis enzimas musculares analizadas entre el antes y después del primer y último programa de nado del día.

Los promedios de enzimas musculares (Anexo III) indican que Alanina aminotransferasa (AST) presentó valores por encima del rango en la mayoría de los análisis. AK y H en los cuatro tiempos (T1-T4), y en la categoría 3 de las edades en el T1, T3 y T4, presentaron valores dentro del rango en AST. En alanina aminotransferasa (ALT) se encontraron igual valores por encima del rango, menos en el T3 de controles negativos (C-) y en los cuatro tiempos de AK, con valores dentro del rango. En el caso de fosfatasa alcalina (ALKP) todos los valores estuvieron dentro del rango. Para gamma glutamil transpeptidasa (GGT), T, M y PA en T1, AK, I-A y H en T1 y T2. CZ, VL, categorías de edad 2 y 3, y B obtuvieron valores dentro del rango normal, mientras que los demás tuvieron valores por encima del rango. Creatina quinasa (CK) tuvo valores por debajo del rango, menos en T1 y T2 del total, en ambos tiempos del control negativo, en los cuatro tiempos de IM, y en el T1, T2 y T3 de I-A, M, CV, categoría 1 de edad y A. Lactato deshidrogenasa, tuvo todos los valores por encima del promedio en los cuatro tiempos. Los valores obtenidos se compararon con los valores normales para delfines *T. truncatus* en cautiverio de acuerdo a Dierauf y Gulland (2001).

3.4 Concentraciones de ácido láctico

En la Figura 2 se puede observar un aumento del T1 a los demás tiempos, así como una disminución del T3 al T4. Los valores que se salen del rango normal (0.7 - 2.1 mmol/L) son en mayoría de T3 y T4. De acuerdo al ANOVA se presentaron diferencias significativas con base al T1 y T2 en el T, IM, CZ, I-A, M, CV, VL, categorías de edad 1 y 2, y B. VL y A tuvieron diferencias significativas del T3 al T4.

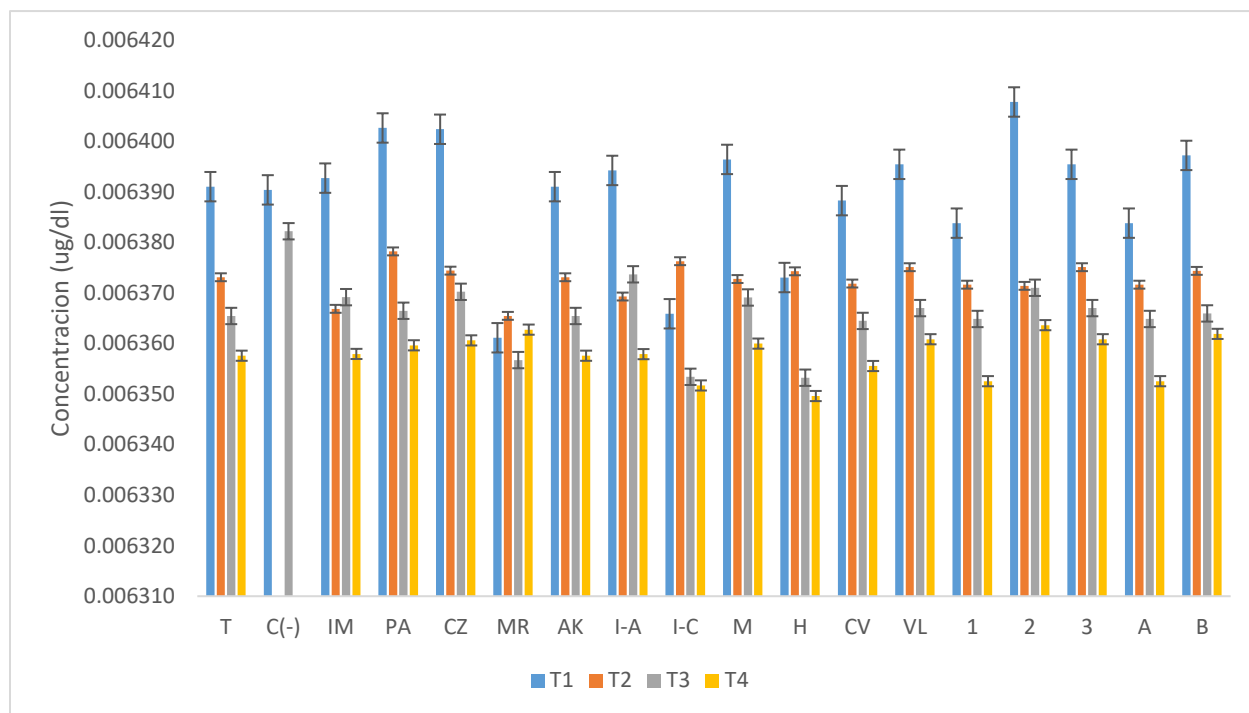
Figura 2: Medias y error estándar de las concentraciones de ácido láctico antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4). Las líneas rojas indican el rango promedio (0.7-2.1 mmol/L)



3.5 Niveles de cortisol en suero

En la Figura 3 se observa una disminución del T1 al T4. El análisis estadístico muestra diferencias significativas involucrando al T1 en cuanto a la disminución de los niveles de cortisol con los demás tiempos en el T, IM, I-A, M, CV, edades 1, edades 2 y A (Anexo V). Ninguna de los resultados hace referencia a un aumento significativo de cortisol.

Figura 3: Medias y error estándar de los niveles de cortisol antes (T1) y después del primer programa (T2), antes (T3) y después del último programa de nado del día (T4).



Capítulo 4 Discusión

4.1 Biometría y química sanguínea

La biometría y química sanguínea se realizó para obtener una evaluación sobre el estado de salud general de los individuos muestreados, mientras que el análisis estadístico para calcular si existe o no un cambio estadísticamente significativo en los parámetros a lo largo del día y determinar si estos influyen en las demás variables analizadas. De acuerdo a la información obtenida se encontró un aumento significativo en neutrófilos que puede ser ocasionado por alguna condición autoinmune, un proceso inflamatorio, actividad física extenuante, representada por el mismo programa de nado en sí, e incluso por estrés (Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003). El rango de sedimentación de eritrocitos (RSE) presentó un aumento significativo de T1 a T3, el cual puede verse afectado por un proceso inflamatorio (Dierauf y Gulland, 2001), que igualmente podría ser ocasionado por la actividad mediante los programas de nado. Sin embargo, en los valores individuales de neutrófilos y el RSE, son mínimos los individuos que presentan valores por encima del rango normal, además de que las medias se encontraron en mayor parte dentro del rango, siendo poco probable que influyan sobre las demás variables del estudio.

El aumento significativo encontrado en la albumina podría deberse a una leve deshidratación por el ejercicio que requiere el programa de nado, aunque en general los valores individuales no se encontraban fuera de los rangos estándar, y la media se encontraba bajo el rango normal, lo cual puede ser provocado por una mala alimentación o algún problema gastrointestinal. El aumento significativo en el nitrógeno ureico en sangre (NUS) también pudo ser causado por una deshidratación (Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003), pero en el caso de las medias, se encontraron en mayor parte dentro del rango normal establecido. La creatinina presentó una disminución significativa de T1 a T3, sin embargo, ya que la creatinina es usada como indicador de salud renal, y ninguno de los individuos muestra valores arriba de lo normal, queda descartado un daño renal severo (Dierauf y Gulland, 2001), y sus medias se encuentran dentro de lo normal. Por último, el calcio mostró una disminución significativa de T1 a T3 en el total de los individuos y en el control negativo, lo cual podría deberse a un desequilibrio nutricional o malabsorción intestinal, sin embargo las medias se encuentran todos dentro del rango normal, y sólo uno de los individuos

presentó una baja en calcio fuera del rango, por lo que no debe estar involucrado con los resultados de las demás variables.

La relación albumina-globulina es importante, ya que ambas son los mayores constituyentes de las proteínas en suero, y juegan un papel esencial en el proceso inflamatorio (Azab *et al.*, 2013). En promedio los valores de los individuos problema y controles negativos se encontraban por debajo del ideal, pudiendo reflejar una sobreproducción de globulinas como ocurre en enfermedades autoinmunes, o una infraproducción de albúmina como sucede en la cirrosis. Las enzimas musculares se relacionan con la salud hepática, por lo que estos valores podrían estar influyendo en los resultados, o viceversa.

Lo anterior demuestra posibles casos subclínicos, para lo que serían necesarios estudios más específicos e individuales para un diagnóstico concreto, y definir si estos afectan los resultados de las demás variables. Sin embargo, la salud general de los individuos de acuerdo a los demás parámetros de biometría y química sanguínea no se ve afectada a lo largo de los programas de nado del día.

Los promedios de los parámetros por encima y por debajo de los rangos normales establecidos por Dierauf y Gulland, (2001) indican en general cierto daño hepático, algún tipo de anemia, procesos inflamatorios, deshidratación e infecciones, siendo todos casos tratables para mejorar la salud general de los individuos.

4.2 Enzimas asociadas a daño muscular

Se evaluaron estadísticamente los niveles de las enzimas asociadas a daño muscular para calcular si existen o no diferencias significativas a lo largo del día y determinar si hay repercusiones a la salud de *T. truncatus* al llevar a cabo las actividades que constituyen los programas de nado. De acuerdo al análisis estadístico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las enzimas musculares a lo largo del día, demostrando que no hay una alteración acumulativa significativa en las enzimas musculares a lo largo del día durante los programas de nado de los delfines de Dolphin Discovery.

Aunque no hubiera diferencias significativas en ninguna de las enzimas asociadas a daño muscular, las enzimas en promedio presentaron valores por encima y debajo del rango normal, que de acuerdo a Dierauf y Gulland, (2001), esto da lugar a los siguientes diagnósticos:

Los valores por encima del rango en aspartato aminotransferasa (AST) indican enfermedades en el hígado, daño en el músculo esquelético y enfermedades al corazón. En el caso de la alanina aminotransferasa (ALT), enfermedades en el hígado, parasitismo, e infecciones. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT), presento elevaciones fuera del rango indicando posibles enfermedades en el hígado, como la enfermedad hepática obstructiva, colestasis, cirrosis, además de heridas en el músculo esquelético. La creatina quinasa (CK) mostro valores por debajo del rango, lo cual no representa una alteración importante. Por último, los valores obtenidos de lactato deshidrogenasa (LDH) estuvieron todos por encima del rango normal, indicando una posible necrosis del músculo esquelético, enfermedades pulmonares, enfermedades hepáticas del miocardio y del sistema nervioso central o intestinal.

Según Fauquier y colaboradores (2008) AST, ALT GGT y LDH llegan a sus máximos tras 6-24 horas de actividad, tardando días en volver a su nivel normal, en especial LDH, quien tarda de 5 a 6 días en estabilizarse. En esta situación también podría tratarse de una acumulación en la concentración a causa de la constante actividad (6 días a la semana, aproximadamente 7 horas al día), además de la falta de reposo entre programas para volver a los valores estándar. Los casos subclínicos detectadas dentro de los parámetros de biometría y química sanguínea también podrían estar influyendo, pero se requiere de estudios más específicos para un diagnostico concreto.

4.3 Concentraciones de ácido láctico

Las evaluaciones de las concentraciones de cortisol en sangre se llevaron a cabo para determinar si hay o no un aumento en la producción de energía de los músculos a lo largo del día, y si estos podrían estar afectando la salud general de *T. truncatus*. Encontrando que en vida libre la concentración de ácido en plasma registrada de *T. truncatus* en reposo es de 1.10 ± 0.1 mmol l⁻¹ (Williams *et al.*, 1999), mientras que nadando a 2.1 m/s los machos llegan a los 11.3 mmol/L y a 13.6 las hembras (Williams *et al.*, 1993), mientras que en cautiverio, los valores normales registrados por la empresa Dolphin

Discovery van de los 0.7 a 2.1 mmol/L. Los individuales valores obtenidos en las concentraciones de ácido láctico del presente estudio van desde los 0.5 a los 4.6 mmol/L, los valores por encima del rango en cautiverio no sobrepasan por mucho a 2.1 mmol/L como rango normal, y mucho menos los 11.3-13.6 mmol/L en vida libre.

De acuerdo al análisis estadístico se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a un aumento de las concentraciones a lo largo del día. Es esperado ver este aumento debido al gasto de energía. En condiciones, el músculo tiene acceso a oxígeno suficiente, transformando el piruvato en lactato para continuar con la producción de energía. El que aumenten los niveles de lactato puede provocar un aumento en la acidez de las células musculares, además de interrupciones de producción de otros metabolitos. Las mismas vías metabólicas que permiten el desglose de la glucosa a energía funcionan pobremente en un ambiente ácido. A simple vista, parece contraproducente el hecho de que un músculo en trabajo produciría algo que disminuiría su capacidad para realizar más trabajo. En realidad este es un mecanismo de defensa, ya que evita daños permanentes durante el esfuerzo extremo al retardar los sistemas clave que se necesitan para mantener la contracción muscular. Una vez que el cuerpo va más despacio, el oxígeno vuelve a estar disponible y el lactato vuelve a piruvato, lo que permite el metabolismo aeróbico continuo y la energía para la recuperación del cuerpo (Roth, 2006).

4.4 Cortisol en suero

Se midieron los niveles de cortisol en suero debido a que a qué es uno de los mecanismos más sencillos y acertados al momento medir la inmunosupresión del estrés (Moberg, 1985). El análisis estadístico se hizo para determinar si hay algún aumento significativo a lo largo del día, que podría estar indicando un efecto acumulativo de estrés a lo largo del día.

Los resultados de cortisol registrados en el Anexo V estuvieron por debajo del promedio reportado para *T. truncatus*, siendo de 0.6-3.6 $\mu\text{g/dl}$, en varias edades, como en ambos sexos (Dierauf y Gulland, 2011; Proie, 2013), esto pudo ser debido a que el cortisol en suero de delfines es complicado de detectar en una prueba poco sensible como lo es el ensayo ELISA (Proie, 2013). Por lo mismo fue necesario concentrar la muestra dos veces, siendo necesaria la división entre el factor de corrección. Artículos como el de Monreal-Pawlowsky y colaboradores (2017) indican el uso de la

técnica ELISA para medir cortisol en saliva, obteniendo niveles bajos, por debajo del promedio, por lo que es importante tomar en cuenta la precisión del kit para cada tipo de muestra (suero, plasma, orina, saliva, etc.), así como el método de muestreo (Proie, 2013).

Antes de las pruebas de ELISA se utilizaba la técnica RIA, la cual es más sensible y confiable, teniendo como diferencia significativa que la etiqueta no es una enzima, sino un isótopo radioactivo y el anticuerpo unido se mide mediante un contador gamma. Es un ensayo altamente sensible y confiable que se presta a la automatización. Sin embargo, no pudimos utilizar esta técnica debido al costo del equipo y el riesgo para la salud al trabajar con radioisótopos.

Aun obteniendo concentraciones por debajo del promedio registrado fue posible determinar si existen o no diferencias significativas a lo largo del día. De acuerdo a las medias de los resultados en la Figura 3, el nivel en T1 es casi siempre más alto que los demás tiempos, esto debido a que la secreción de hormonas como el cortisol presentan un ciclo circadiano en mamíferos (Dierauf y Gulland, 2001). En el caso de *T. truncatus*, siendo una especie diurna muestra concentraciones más altas durante la mañana que van disminuyendo a lo largo del día (Dierauf y Gulland, 2001; Suzuki et al., 2003). El ANOVA muestra diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la disminución después del T1. Ninguno de los resultados fue significativo en cuanto a algún aumento en la concentración (Tabla 3).

En base a las medias, se presentaron unos casos en donde aumentó la concentración, tal fue el caso de MR del T1 a T4, siendo un único individuo muestreado en esta instalación no fue posible hacer una prueba para demostrar si el incremento fue significativo. Las categorías MR, I-C, H muestran un aumento en sus medias del T1 al T2, que puede deberse a actividad repentina después del descanso, además de la baja cantidad de individuos para cada categoría. También IM e I-A muestran un aumento en las medias del T2 al T3. Es importante recordar que hay un programa de nado entre los dos programas muestreados, además de que el número de personas que participan con los delfines en cada programa de nado no es el mismo, aumentando o disminuyendo el número de actividades a realizar por individuo.

Los resultados indican que no hay un efecto medible sobre el bienestar de los delfines independientemente de edad, sexo, tiempo de captura o tipo de acuario y que el nivel de ejercicio

es inferior al medido en circunstancias naturales. Los tiempos experimentales son demasiado cortos. El protocolo se deberá convertir en una medición periódica para determinar si los diagnósticos subclínicos detectados tienen efectos a largo plazo en la salud de los delfines.

Capítulo 5. Conclusiones

La biometría y química sanguínea mostraron cambios estadísticamente significativos antes del primer y último programa de nado del día, indicando posibles subclínicos que podrían estar influyendo directamente en los resultados de los demás parámetros, así como en la salud a largo plazo de los individuos.

No hay una alteración acumulativa significativa en las enzimas asociadas a daño muscular antes y después del primer y último programa de nado del día.

Hay un aumento significativo en las concentraciones de ácido láctico antes y después del primer y último programa de nado del día, el cual es esperado debido al gasto de energía.

Las concentraciones de cortisol en suero presentaron una disminución estadísticamente significativa del antes del primer programa a los demás programas de nado, por lo que no hay un efecto acumulativo en cortisol a lo largo del día.

De acuerdo a los análisis realizados de enzimas musculares, ácido láctico y concentraciones de cortisol, los programas de nado de los delfines de Dolphin Discovery, Quintana Roo no ocasionan daño muscular ni estrés.

Capítulo 6. Recomendaciones

Tomar en cuenta otras variables para obtener una evaluación más completa sobre el bienestar de *T. truncatus* en cautiverio, cómo la calidad del agua, alimentación, contaminación por ruido, metales pesados, espacio y grupos sociales.

Estudios etológicos para complementar y correr paralelamente con estudios de valores fisiológicos.

Estudios más específicos para los casos subclínicos detectados por biometría y química sanguínea. En caso necesario, tratar a los individuos afectados.

Llevar a cabo terapia hepática para observar si hay cambios a largo plazo en los parámetros de biometría y química sanguínea, con el fin de evitar procedimientos invasivos como ultrasonidos, endoscopias y biopsias.

Estudios comparativos con más tiempo de por medio, como al inicio y final de temporadas altas y bajas.

Modificar los tiempos o frecuencias de los programas de nado para descartar un impacto directo en la disminución de los parámetros analizados, evitando la generación de animales subclínicos.

En caso de usarse el mismo kit Cortisol ELISA (DRG, EEUU) para futuros estudios se recomienda concentrar la muestra de suero más de dos veces en base al protocolo de Hany et al. (1999).

Literatura citada

- Alaniz, Y. 2010. Reporte sobre delfines cautivos. Sociedad Mundial para la Protección Animal (WSPA). p. 33.
- Azab, B., Kedia, S., Shah, N., Vonfrolio, S., Lu, W., Naboush, A., Mohammed, F. y Bloom, S. W. 2013. The value of the pretreatment albumin/globulin ratio in predicting the long-term survival in colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease*. 28, 1629-1636. doi: 10.1007/s00384-013-1748-z
- Bahe, H. 2014. Choice and control of enrichment for a rescued and rehabilitated Atlantic Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). Tesis de bachillerato. University of Southern Mississippi. 30 pp.
- CCAC. 2014. CCAC (Canadian council on animal care) guidelines on: the care and use of marine mammals. Consultado el 7 de septiembre del 2016, en: https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/CCAC_Marine_Mammals_Guidelines.pdf
- Claxton, A. M. 2011. The potential of the human-animal relationship as an environmental enrichment for the welfare of zoo-housed animals. *Applied Animal Behaviour Science*. 133, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.03.002>
- Curtin, S., y Wilkes, K. 2007. Swimming with captive dolphins: current debates and post-experience dissonance. *International Journal of Tourism*. 9 (2), 131-146. doi: 10.1002/jtr.599
- Delfour, F. y Beyer, H. 2011. Assessing the effectiveness of environmental enrichment in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Zoo Biology*. 29, 1-14. doi: 10.1002/zoo.20383
- Dierauf, L. A. y Gulland, F. M. D. 2001. *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* (2nd ed.). CRC Press LLC. New York.
- Dolphin Discovery. S/f. Consultado el 3 de marzo del 2017, en: <https://www.dolphindiscovery.com.mx/cancun-islamujeres/nado-con-delfines-royal.asp>
- DRG Instruments GmbH. 2017. Cortisol ELISA. Consultado el 22 de junio del 2017, en: <http://www.drg-diagnostics.de/>
- Ewbank, R. 1985. Behavioral Responses to Stress in Farm Animals. En: Moberg, G. P. (Ed.), *Animal Stress* Springer. New York. pp. 71-80.
- Fauquier, D. A., Mazet, J. A., Gulland, F. M., Spraker, T. R. y Christopher, M. M. 2008. Distribution of tissue enzymes in three species of pinnipeds. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 39, 1-5. doi: 10.1638/2006-0012.1
- Fowler, M. y Miller, E. R. 2003. *Zoo and wild animal medicine* (5th ed.). Elsevier, St. Louis.
- Gómez, G. B. y Escobar, A. 2006. Estrés y sistema inmune. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 7, 30-38.

- Hany, J., Lilienthal, H., Sarasin, A., Roth-Harer, A., Fastabend, A., Dunemann, L., Lichtensteiger, W. y Winneke, G. 1999. Development exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or aroclor 1254: Effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 158, 231-243. doi: 10.1006/taap.1999.8710
- IDEXX Laboratories. 2017. VetTest® Analizador Bioquímico. Consultado el 22 de noviembre de 2017, en: <http://www.idexx.es/smallanimal/inhouse/vetlab/vettest-chemistry.html>
- Kerr, M. G. 2002. *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Biochemistry and Haematology* (2nd ed.) ISBN, London.
- Lackie, J. M. 2013. *The Dictionary of Cell & Molecular Biology* (5th ed.). Academic Press, London.
- Luna-Blasio, A., Valdez-Pérez, R., Romano-Pardo, M. y Galindo-Maldonado, F. 2011. Comportamiento de mantenimiento y niveles de cortisol de toninas (*Tursiops truncatus*) en instalaciones cerradas y abiertas. *Veterinaria México*. 43, 103–112.
- Miguel Mejía, C. 2004. Medición del comportamiento y cortisol salival de delfines de acuerdo a las actividades que realizan en cautiverio. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Moberg, G. P. (1985). *Biological Response to Stress*. En: Moberg, G. P. (Ed.), *Animal Stress*. Springer. New York. pp. 27-50.
- Moberg, G. P., y Mench, J. A. 2000. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing, New York.
- Monreal-Pawłowsky, T., Carbajal, A., Tallo-Parra, O., Sabés-Alsina, M., Monclús, L., Almunia, J., Fernández-Bellón, H. y López-Bejar, M. 2017. Daily salivary cortisol levels in response to stress factors in captive common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): a potential welfare indicator. *Veterinary Record*. 180(24), 593. doi: 10.1136/vr.103854
- Moticka, E. 2015. *A historical perspective on evidence-based immunology* (1st ed). Elsevier, Amsterdam.
- NOM-135-SEMARNAT. 2004. Para la regulación de la captura para investigación, transporte, exhibición, manejo y manutención de mamíferos marinos en cautiverio. México: Diario Oficial de la Federación 21 de enero de 2003.
- Petty, R., Laxer, R., Lindsley, C. y Wedderburn, L. 2015. *Textbook of Pediatric Rheumatology* (7th ed.). Saunders, Philadelphia.
- Perrin, W. F., Wursing, B., y Thewissen, J. G. M. 2008. *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, California.
- Proie, S. 2013. A systematic review of cortisol levels in wild and captive atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), Killer whale (*Orcinus orca*), and Beluga whale (*Delphinapterus leucas*). Tesis de Maestría. The Evergreen State Collage. 185 pp.

- R Core Team 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria. MA URL <https://www.R-project.org/>
- Rangel-Martínez, C. 2014. Evaluación del bienestar de *Tursiops truncatus* (Delfín nariz de botella) en condiciones en cautiverio. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 46 pp.
- Roth, S. M. 2006. Why does lactic acid build up in muscles? And why does it cause soreness?. University of Maryland. Scientific American. Consultado el 12 de junio de 2017, en: <https://www.scientificamerican.com/article/why-does-lactic-acid-build/>
- RSPCA. 2016. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animal. Dolphins in captivity. Consultado el 5 de junio de 2016, de: http://kb.rspca.org.au/What-is-the-RSPCAs-view-on-dolphins-in-captivity_635.html
- Sino Biological. 2017. Competitive ELISA principle. Consultado el 17 de octubre de 2017, de: <http://www.sinobiological.com/competitive-elisa-principle.html>
- Suzuki, M., Uchida, S., Ueda, K., Toboyama, T., Katsumata, E., Yoshioka, M. y Aida, K. 2003. Diurnal and annual changes in serum cortisol concentrations in Indo-Pacific bottlenose dolphins *Tursiops aduncus* and killer whales *Orcinus orca*. General and Comparative Endocrinology. 132, 427-433. doi: 10.1016/S0016-6480(03)00100-X
- Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., y Campbell, T. W. 2012. Veterinary hematology and clinical chemistry (2nd ed.). Wiley-Blackwell, Oxford.
- Ugaz, C., Valdez, R.A., Romano, M.C. y Galindo, F. 2013. Behavior and salivary cortisol of captive dolphins (*Tursiops truncatus*) kept in open and closes facilities. Journal of Veterinary Behavior. 8, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2012.10.006>
- WDCS. 2016. Whale and Dolphin Conservation Society. Bottlenose dolphins in captivity. Consultado el 8 de septiembre de 2016, de: http://www.wdcs.org/submissions_bin/bottlenosedolphinsincaptivity.pdf
- Williams, T. M., Friedl, W. A. y Haun, J. E. 1993. The physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): heart rate, metabolic rate and plasma lactate concentration during exercise. Journal of experimental Biology. 179, 31-46.
- Williams, T. M., Haun, J. E. y Friedl, W. A. 1999. The diving physiology of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) I. Balancing the demands of exercise for energy conservation at depth. Journal of experimental Biology. 202, 2739-2748.

Anexo I

Biometría y química sanguínea

Tabla 2: Parámetros de biometría y química sanguínea

Parámetro	Definición	Repercusiones a la salud
Células sanguíneas rojas (CSR)	Número de células rojas en la sangre.	↓ Anemia ↑ Deshidratación ↑ Policitemia
Hemoglobina (Hb)	Le da su color a las células rojas y lleva el oxígeno de los pulmones a las células.	↓ Anemia ↑ Policitemia
Hematocrito (Ht)	Mide el porcentaje de células rojas en un volumen estándar de sangre	↓ Anemia
Índices de células rojas (VCM, HCM, CHCM)	Proveen información detallada del volumen y el contenido de hemoglobina de las células sanguíneas rojas y también son usados para determinar tipos de anemia: <ul style="list-style-type: none"> • VCM: El volumen celular medio mide el volumen promedio de células rojas. • HCM: La hemoglobina celular media mide el peso del promedio de células rojas. • CHCM: La Concentración de hemoglobina celular media mide el peso de la hemoglobina en un volumen estándar de sangre. 	VCM bajo: anemia microcitica VCM normal: anemia normocitica VCM alto: anemia macrocitica CHCM bajo: anemia hipocrómica CHCM normal: anemia normocrómica CHCM alto: anemia hiperocrómica • <u>Normocitica, Normocrómica</u> Inflamación crónica Deficiencias endocrinas Enfermedades crónicas renales Médula ósea aplásica e hipoplásica Intoxicación por plomo Deficiencia de vitamina B12 • <u>Macrocitica, Hipocrómica</u> Anemia regenerativa • <u>Macrocitica, Normocrómica</u> Anemia regenerativa Deficiencia de folato • <u>Microcitica, Normocrómica, o Hipocrómica</u> Deficiencia crónica de hierro Anemia por enfermedad crónica
Conteo de células sanguíneas blancas (CSB)	Mide el número de células blancas en la sangre. Protegen contra infecciones y alergias.	↓ Supresión sistema inmune ↑ Estrés ↑ Infecciones después de ejercicios
Neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos	Son los diferentes tipos de células blancas en la sangre.	↓ Alteraciones en el sistema inmune
Rango de sedimentación de Eritrocitos (RSE)	Es el rango en que las células rojas se sedimentan en el periodo de una hora.	↓ Enfermedades inflamatorias ↓ Incremento de fibrinógeno en plasma ↑ Deshidratación

Fuente: Dierauf y Gulland (2001)

Continuación Tabla 2: Parámetros de biometría y química sanguínea.

Parámetro	Definición	Repercusiones a la salud
Proteínas totales	Mide diferentes proteínas, con albumina siendo el tipo más abundante en sangre.	<p>↓</p> <p>Hipoalbuminemia Desnutrición Enteropatía con pérdida de proteínas (EPP)</p> <p>↑</p> <p>Deshidratación Shock</p>
Albumina	La albumina es una de las proteínas que más se encuentra en la sangre, cuya producción depende únicamente de la función hepática y de una nutrición adecuada.	<p>↓</p> <p>Mala alimentación Enfermedades renales Enfermedades gastrointestinales (parásitos, mala digestión, EPP)</p> <p>↑</p> <p>Deshidratación Shock</p>
Globulinas	La globulina es una proteína cuyas concentraciones se determinan restando la albúmina sérica total de la proteína del suero. Las globulinas se dividen en globulinas alfa (1 y 2), beta (1y 2) y gamma.	<p>↓</p> <p>Neonatos precolostrales Inmunodeficiencia adquirida de estados de enfermedad crónica</p> <p>↑</p> <p>Enfermedades inflamatorias agudas Hepatitis activa Neoplasia Dermatopatías supurativas Síndrome nefrótico</p>
Glucosa	Carbohidrato, y azúcar simple más importante en el metabolismo.	<p>↓</p> <p>Enfermedades sistemáticas Neoplasia Mala alimentación Inanición Hiperinsulinismo Cirrosis hepática Almacenamiento de glucógeno</p> <p>↑</p> <p>Estrés, emoción, anoxia Obesidad Hipertiroidismo/hiperpituitarismo Glucocorticoides endógenos</p>
Nitrógeno ureico en sangre (NUS)	Producto de desecho obtenido de la descomposición de proteínas en el hígado y excretado por los riñones.	<p>↓</p> <p>Falla del hígado Inanición</p> <p>↑</p> <p>Azotemia pre-renal, incluyendo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Deshidratación • Insuficiencia cardíaca • Shock • Hemorragia gastrointestinal • Dieta alta en proteínas <p>Azotemia renal Azotemia pos-renal, incluyendo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obstrucción del tracto urinario inferior y/o ruptura del tracto urinario inferior

Continuación tabla 2: Parámetros de biometría y química sanguínea

Parámetro	Definición	Repercusiones a la salud
Creatinina	Usado para evaluar las funciones de los riñones. Indicador de salud renal.	<p>↑ Azotemia pre-renal, incluyendo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Deshidratación • Insuficiencia cardíaca • Shock <p>Azotemia renal</p> <p>Azotemia pos-renal, incluyendo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obstrucción del tracto urinario inferior y/o ruptura del tracto urinario inferior
Total bilirrubina	Determinar la función del hígado	<p>↑ Enfermedades en el hígado</p> <p>Dstrucción acelerada de eritrocitos</p> <p>Alteración del flujo biliar en el conducto biliar común</p>
Calcio	Los niveles pueden aumentar o disminuir por enfermedades de los huesos o enfermedades glandulares. También son útiles para evaluar la función de los riñones.	<p>↓ Hipoalbuminemia</p> <p>Alcalosis</p> <p>Hipoparatiroidismo</p> <p>Desequilibrios nutricionales</p> <p>Eclampsia</p> <p>Malabsorión intestinal</p> <p>↑ Deshidratación</p> <p>Hipoadrenocorticismo</p> <p>Lesiones óseas osteolíticas</p> <p>Hipercalemia de neoplasia</p>
Aspartato aminotransferasa (AST)	Enzima citoplasmática y mitocondrial que cataliza la deaminación de aspartato para formar oxalacetato que puede entrar al ciclo de Krebs.	<p>↓ Cirrosis hepática</p> <p>↑ Enfermedades del hígado, incluyendo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Necrosis hepatocelular • Neoplasia • Parásitos <p>Daño en el musculo esquelético</p> <p>Enfermedades del corazón</p>
Alanina aminotransferasa (ALT)	Enzima catalizadora que transforma piruvato y glutamato. Especifica del hígado en <i>T. truncatus</i> .	<p>↓ Cirrosis hepática</p> <p>↑ Enfermedades en el hígado, incluyendo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infecciones • Parasitismo • Neoplasia • Trauma
Fosfatasa alcalina (ALKP)	Grupo de enzimas situadas en la membrana celular que intervienen en diferentes procesos fisiológicos. Niveles altos en delfines jóvenes en crecimiento.	<p>↓ Hipotiroidismo</p> <p>Disminución de actividad osteoblástica</p> <p>Posible endotoxemia</p> <p>Inanición</p> <p>↑ Enfermedades en el hígado, incluyendo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cirrosis hepática • Hepatitis <p>Enfermedades en los huesos</p>

Continuación tabla 2: Parámetros de biometría y química sanguínea

Parámetro	Definición	Repercusiones a la salud
Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)	Clave en la síntesis y degradación de glutatión para formar cisteína y así preservar la homeostasis intracelular del estrés oxidativo.	↑ Enfermedades en el hígado, incluyendo: <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad hepática constructiva primaria • Colestasis • Cirrosis Heridas en el músculo esquelético.
Creatina quinasa (CK)	Enzima específica del músculo, ya que permite la contracción del músculo mediante la fosforilación de adenosín dinofosfato (ADP) desde fosfocreatina. Pequeños golpes e incluso inyecciones provocan aumentos detectables.	↑ Daño en el músculo esquelético Enfermedad del sistema nervioso central Manejo del estrés
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Enzima citoplasmática que cataliza la conversión del piruvato a lactato al final de la glucólisis.	↑ Necrosis o degeneración del músculo esquelético Inyecciones intramusculares Enfermedades pulmonares Enfermedades hepáticas del miocardio, sistema nervioso central o intestinal.

Fuente: Dierauf y Gulland (2001); Rangel-Martínez (2014)

Anexo II

Biometría y química sanguínea

Tabla 3: Resultados de biometrías sanguíneas. Valores antes del primer programa de nado (T1) y antes del último programa de nado del día (T3). El color rojo indica los valores por encima del rango normal y el color amarillo aquellos por debajo del rango normal.

Locación	Ejemplar	Programa	GRS 3.0-3.7 10 ⁶ /mm ³	Hb 13.5- 15.5 g/dl	Ht 38- 44%	VCM 115-135 fl	HCM 38-48 pg	CHCM 34-36 g/dl	Leucocitos 5000-9000 µL	Neutrófilos 3234-4854	Linfocitos 839-1664	Monocitos 144-348	Eosinófilos 527-1020	RSE (4-17 at 60 min)
IM	ATHOS	T1	3.02	12.2	37	122.5	40.4	33	7125	4631.25	1781.25	0	712.5	11
		T3	3.02	12.9	36	119.2	42.7	35.8	7175	5022.5	1220	71.75	861	20
IM	JOHN	T1	3.38	13.5	40	118.34	39.94	33.75	4825	2460.7	2123	0	241.2	2
		T3	3.35	13.4	40	119.4	40	33.5	5775	4100.25	1328	115.5	231	5
IM	MADONNA	T1	3.24	13.8	39	120.4	42.6	35.4	5000	2450	1800	50	700	4
		T3	3.08	13.6	38	123.4	44.2	35.8	5750	3220	1610	57.5	862.5	15
IM	PICASSO	T1	3.42	13.8	41	119.88	40.35	33.65	4300	2623	860	86	731	1
		T3	3.51	14.5	43	122.5	41.31	33.72	4675	2571	888	93.5	1122	5
PA	ATHILA	T1	3.2	13.7	37	115.6	42.8	37	4650	2743.5	1348.5	46.5	511.5	8
		T3	3.3	14.2	43	130.5	43	33	4600	3036	1104	46	414	7
PA	CHAAC	T1	3.5	15	42	120	42.8	35.7	3450	2242.5	276	34.5	897	5
		T3	4	14.5	41	102.5	36.2	35.3	3450	4251	545	54.5	599.5	5
PA	JOGO	T1	3.7	12.4	35	95	33.5	35.4	5050	3434	1313	50.5	252.5	6
		T3	2.9	13.3	35	121	45.8	38	6450	5095.5	645	258	451.5	7
PA	TATICH	T1	3.4	14.4	40	117.6	42.3	36	6900	4002	1587	138	1173	4
		T3	3.4	14.6	41	120.5	42.9	35.6	8800	5016	2728	0	1056	4
CZ	APOLO	T1	3.4	14.1	43	126.471	41.47	32.79	6700	4556	1005	201	938	3
		T3	3.3	13.8	42	127.273	41.82	32.86	6125	4593.75	919	122.5	490	5
CZ	DAVINCI	T1	3.5	14	42	120	40	33.33	6725	4707.5	1278	134.5	605.25	5
		T3	3.48	12.5	39	112.07	35.919	32.05	5000	4050	500	100	350	5
CZ	JUPITER	T1	3.2	13.3	41	128.13	41.56	32.44	4600	3588	598	138	276	3
		T3	3.11	13.3	42	135.05	42.77	31.67	4250	2762.5	637.5	42.5	382.5	4
CZ	RAMSESE	T1	3.8	15	46	121.1	39.5	32.6	7500	4650	1575	150	1125	4
		T3	3.3	13.9	43	130.3	42.1	32.3	7300	4891	1095	219	1095	4

Continuación Tabla 3: Resultados de biometrías sanguíneas. El color rojo indica los valores por encima del rango normal y el color amarillo aquellos por debajo del rango normal.

Locación	Ejemplar	Programa	CRS 3.0-3.7 10 ⁶ /mm ³	Hb 13.5- 15.5 g/dl	HT 38-44%	VCM 115-135 fl	HCM 38-48 pg	CHCM 34-36 g/dl	Leucocitos 5000-9000 µL	Neutrófilos 3234-4854	Linfocitos 839-1664	Monocitos 144-348	Eosinófilos 527-1020	ESR (4-17 at 60 min)
MIR	PAKAL	T1	3.2	13.3	37	115.6	41.6	35.9	5450	3400	1000	50	550	6
		T3	3.1	13.4	37	111.9	43.22	36.2	6550	3300	1200	150	350	6
AK	ELENA	T1	3.2	13.8	41	128.1	43.1	33.6	3250	1787.5	1170	97.5	195	9
		T3	2.9	14.1	44	151.7	48.6	32	5300	3710	1113	53	424	9
AK	CIELO	T1	2.3	14.4	39	169.6	62.6	36.9	3450	2105	1070	0	276	17
		T3	3	12.9	38	126.7	43	33.9	3100	2170	620	31	279	17
IM C(-)	PORTHOS	T1	3.29	13.6	39	115.5	39.8	34.5	6800	4420	1904	204	272	5
		T3	3.07	12.7	38	120.5	41.4	34.3	6575	4734	1380.75	131.5	328.75	11
PA C(-)	SHADIA	T1	2.5	12.1	36	144	48.4	33.6	3050	1525	1372	30.5	122	21
		T3	3.2	11.7	31	96.8	36.5	37.7	4650	2325	2139	93	93	21
CZ C(-)	DANIEL	T1	3.4	14	42	123.529	41.1765	33.3333	7000	4130	2100	210	560	3
		T3	3.4	14	40	117.647	41.1765	35	6000	3660	1560	120	660	3

Tabla 4: Resultados de químicas sanguíneas. El color rojo indica los valores por encima del rango normal y el color amarillo aquellos por debajo del rango normal.

Locación	Ejemplar	Programa	Proteínas totales (6-7.8 g/dl)	Albumina (4.3-5.3 g/dl)	Globulina (1.3-2.5 g/dl)	Glucosa (90-170 mg/dl)	BUN (42-58 mg/dl)	Creatinina (1-2 mg/dl)	Bilirrubina total (0.1-0.2 mg/dl)	Calcio (8.5-10 mg/dl)
IM	ATHOS	T1	6.7	3.1	3.6	116	54	0.8	0.1	10.1
		T3	7.2	3.5	3.7	85	62	0.7	0.1	10.3
IM	JOHN	T1	6.4	3.1	3.3	100	60	1	0.1	10.5
		T3	6.6	3.3	3.3	96	68	0.6	0.1	10.5
IM	MADONNA	T1	6.6	3.2	3.5	81	53	1.2	0.1	10.8
		T3	6.6	3.3	3.3	71	64	0.9	0.1	11
IM	PICASSO	T1	6.3	3.1	3.1	92	58	1.2	0.1	10.6
		T3	6.4	3.5	2.9	103	64	0.8	0.1	10.4
PA	ATILA	T1	5.4	2.9	2.5	106	46	1.3	0.1	9.1
		T3	5.8	2.9	2.9	89	51	0.9	0.1	6.6
PA	CHAAC	T1	6.4	2.9	3.5	91	45	1.3	0.1	9.1
		T3	6.1	2.8	3.3	103	53	0.9	0.1	8.7
PA	JOGO	T1	5.9	3.2	2.8	104	51	1.3	0.1	11.7
		T3	6.2	2.9	3.3	78	64	0.9	0.1	8.7
PA	TATICH	T1	6.2	2.8	3.4	95	45	1.2	0.1	8.9
		T3	5.8	2.8	3	100	54	0.7	0.1	9
CZ	APOLO	T1	6.9	3	3.9	98	49	1.6	<0.1	9.6
		T3	7.1	3.2	3.9	110	63	1.1	<0.1	9.3
CZ	DAVINCI	T1	6.3	2.8	3.4	99	61	1.3	<0.1	9.8
		T3	6.1	2.9	3.2	113	68	0.9	<0.1	9.3
CZ	JUPITER	T1	6.7	2.8	3.8	108	55	1.5	<0.1	9
		T3	7.2	3.3	3.9	102	60	1.1	<0.1	9.1
CZ	RAMSES	T1	7	3	4	84	49	1.5	<0.1	10.6
		T3	6.6	2.9	3.7	95	57	1.2	<0.1	9.1
MR	PAKAL	T1	5.7	2.6	3.1	83	45	1.4	0.1	9.2
		T3	5.9	2.6	3.3	98	59	1	0.1	8.8
AK	ELENA	T1	5.3	2.6	2.7	103	46	1.4	0.1	9.3
		T3	5.2	2.7	2.5	98	51	0.9	0.1	8.7
AK	CIELO	T1	6.4	3	3.4	95	57	1.5	0.1	9.2
		T3	6.4	3.3	3.1	86	60	0.9	0.1	8.6
IM C(-)	PORTHOS	T1	6.1	2.9	3.2	110	56	1	0.1	10.6
		T3	6.3	3.1	3.2	109	61	0.9	0.1	10.1
PA C(-)	SHADIA	T1	6.7	3.1	3.6	102	51	1.9	0.1	9.6
		T3	6.3	3	3.3	105	52	1.5	0.1	9.3
CZ C(-)	DANIEL	T1	6.1	2.9	3.2	132	43	1	<0.1	9.6
		T3	5.9	2.9	3	118	46	0.8	<0.1	9.4

Tabla 5: Medias y pruebas de T pareadas de biometría sanguínea. Nivel de significancia $p < 0.05$. Los casos donde no se muestra el t-value indican un análisis no paramétrico. Los resultados significativos se muestran en **negritas**.

Biometría sanguínea				
Parámetro	Media T1	Media T3	<i>p</i>	Valor de <i>t</i>
CSR	3.29	2.25	0.306	0.517
(C-)	3.06	3.22	0.311	-0.576
Hb	13.78	13.66	0.275	0.612
(C-)	13.23	12.8	0.119	1.664
Ht	40	40.13	0.412	-0.225
(C-)	39	36.33	0.078	2.218
VCM	122.55	123.59	0.405	-0.244
(C-)	127.67	111.64	0.209	1.008
HCM	42.3	42.23	0.126	
(C-)	43.12	37.63	0.147	1.403
CHCM	34.49	34.11	0.205	0.84
(C-)	33.81	35.66	0.137	-1.491
Leucocitos	5265	5620	0.097	-1.36
(C-)	5616.66	5741.66	0.443	-0.162
Neutrófilos	3291.86	3852.46	0.015	-2.39
(C-)	3358.33	3573	0.3102	-0.58
Linfocitos	1252.2	1076.66	0.097	1.361
(C-)	1792	1693.25	0.885	
Monocitos	78.26	94.06	0.252	-0.685
(C-)	148.16	114.83	0.28	0.691
Eosinófilos	612.13	597.73	0.404	0.245
(C-)	318	360.58	0.189	-1.123
ESR	6.33	8.66	0.025	
(C-)	9.66	11.66	0.5	

Tabla 6: Medias y pruebas de T pareadas de química sanguínea. Nivel de significancia $p < 0.05$. Los casos donde no se muestra el t-value indican un análisis no paramétrico. Los resultados significativos se muestran en **negritas**.

Química sanguínea				
Parámetro	Media T1	Media T3	<i>p</i>	valor de <i>t</i>
Proteínas totales	6.28	6.34	0.2	-0.856
(C-)	6.3	6.16	0.264	0.755
Albumina	2.94	3.06	0.025	-2.134
(C-)	2.96	3	0.37	-0.377
Globulina	3.33	3.28	0.252	0.684
(C-)	3.33	3.16	0.099	1.889
Glucosa	97	95.13	0.317	0.485
(C-)	114.66	110.66	0.258	0.779
BUN	51.6	59.86	1.02E-07	-9.385
(C-)	50	53	0.06	-2.598
Creatinina	1.3	0.9	0.0003	
(C-)	1.3	1.06	0.059	2.645
Calcio	9.83	9.2	0.005	
(C-)	9.93	9.6	0.03	3.779

Tabla 7: Análisis de componentes principales (ACP).

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11
SS loadings	3.305	2.598	2.173	1.386	0.740	0.396	0.335	0.063	0.003	0.002	0.001
Proportion Var	0.300	0.236	0.198	0.126	0.067	0.036	0.030	0.006	0.000	0.000	0.000
Cumulative Var	0.300	0.537	0.734	0.860	0.927	0.963	0.994	0.999	1.000	1.000	1.000

Tabla 8: Relación de los parámetros de biometría sanguínea (positiva o negativa) mediante ACP.

Parámetro	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11
CSR	0.017	-0.363	0.916	0.120	0.013	0.087	0.071	0.022	0.014	-0.017	0.017
Hb	0.777	0.057	0.446	-0.096	0.338	0.230	0.131	-0.036	0.009	-0.001	-0.018
Ht	0.922	-0.270	0.206	0.068	-0.092	0.027	0.138	-0.013	-0.025	0.023	0.010
VCM	0.831	-0.002	-0.536	-0.040	-0.083	-0.008	-0.003	0.107	0.034	0.007	0.005
HCM	0.573	0.399	-0.629	-0.169	0.264	0.132	-0.010	-0.027	-0.016	-0.023	0.011
CHCM	-0.667	0.505	0.090	-0.191	0.465	0.188	-0.048	0.028	0.005	0.021	0.010
CSB	0.157	0.923	0.134	0.006	-0.269	-0.058	0.052	-0.161	0.016	0.004	0.005
Neutrófilos	0.181	0.678	0.259	0.474	-0.279	0.275	-0.234	0.085	-0.009	-0.001	-0.003
Linfocitos	-0.161	0.557	0.226	-0.684	-0.249	-0.024	0.267	0.105	-0.008	-0.004	-0.002
Monocitos	-0.172	0.427	-0.146	0.767	0.205	-0.158	0.331	0.048	-0.001	-0.002	-0.001
Eosinófilos	0.523	0.414	0.493	-0.101	0.264	-0.421	-0.230	0.039	-0.004	-0.001	-0.001

Tabla 9: Relación entre los individuos muestreados (positiva o negativa) mediante ACP.

Individuo	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11
1	0.770	-0.061	1.414	0.013	-0.122	-0.206	0.854	1.346	-1.459	-1.012	-0.064
2	-0.326	1.270	-0.141	-0.683	-1.463	0.405	1.467	0.752	-0.063	-1.995	0.079
3	-0.265	-0.067	-0.067	0.316	1.987	-1.356	0.679	-1.641	-1.358	-0.688	-0.175
4	0.456	0.481	0.830	0.881	1.270	1.439	-1.343	0.322	1.235	-1.450	-0.934
5	0.398	1.530	1.281	0.770	-0.700	0.352	0.135	-1.162	-0.039	0.785	-1.307
6	0.723	-0.988	0.741	-0.328	-1.588	0.362	-1.112	-0.940	0.332	0.913	-0.028
7	-0.308	-0.204	-0.663	-1.201	-0.124	0.404	-2.192	0.415	-2.462	-0.113	0.039
8	0.011	-1.489	-1.104	2.098	-1.081	-0.257	0.765	0.299	0.093	0.036	-0.870
9	0.265	-0.625	0.427	-1.090	-0.664	0.791	0.322	-0.096	0.753	0.081	1.871
10	-0.581	0.275	-1.602	0.878	0.175	-0.297	-1.396	0.460	0.959	-1.044	1.067
11	0.384	-1.659	0.164	0.685	0.768	0.050	0.948	0.509	0.037	0.273	1.316
12	0.033	0.804	0.409	0.246	-0.046	-0.292	0.336	-0.197	-0.633	1.158	1.178
13	-0.257	1.296	-0.553	1.387	-0.842	-0.775	-0.572	-0.563	-0.293	0.571	0.769
14	-1.160	-0.076	-1.738	-1.275	-0.362	0.183	0.869	0.081	0.218	0.639	-1.747
15	0.047	-1.458	0.016	-0.431	0.528	1.357	0.188	-1.333	-0.041	-0.314	-0.756
16	-0.169	0.359	0.110	-1.502	0.377	-1.408	0.128	-1.321	1.571	-0.537	0.453
17	-0.635	1.040	-0.261	-0.103	1.603	1.471	0.636	1.196	0.298	1.929	0.276
18	0.613	-0.426	0.737	-0.664	0.286	-2.223	-0.713	1.872	0.854	0.769	-1.167

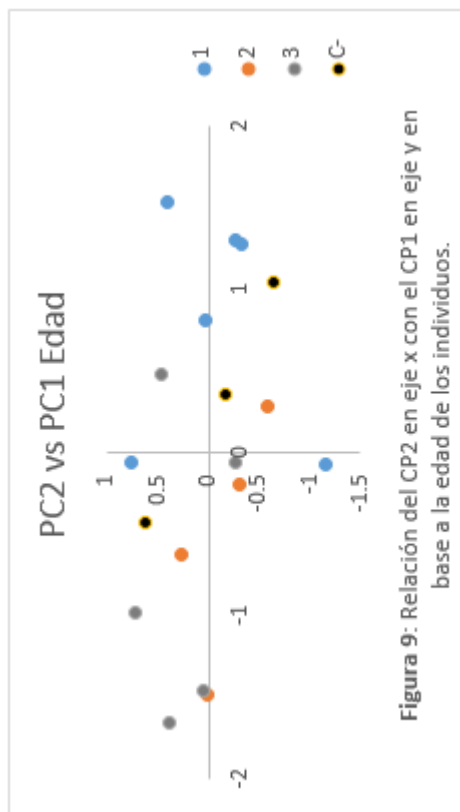
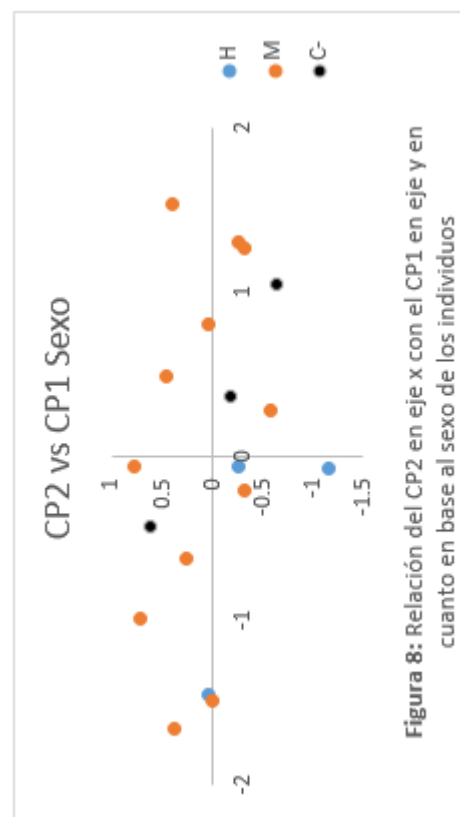


Tabla 10: Relación albumina-globulina. Los valores por debajo del valor ideal (1) se encuentran en amarillo, aquellos encima de este, en rojo.

Locación	Ejemplar	Programa	A-G	Locación	Ejemplar	Programa	A-G
IM	ATHOS	T1	0.861	CZ	DAVINCI	T1	0.824
		T3	0.946			T3	0.906
IM	JOHN	T1	0.939	CZ	JUPITER	T1	0.737
		T3	1.000			T3	0.846
IM	MADONNA	T1	0.914	CZ	RAMSES	T1	0.750
		T3	1.000			T3	0.784
IM	PICASSO	T1	1.000	MR	PAKAL	T1	0.839
		T3	1.207			T3	0.788
PA	ATILA	T1	1.160	AK	ELENA	T1	0.963
		T3	1.000			T3	1.080
PA	CHAAC	T1	0.829	AK	CIELO	T1	0.882
		T3	0.848			T3	1.065
PA	JOGO	T1	1.143	IM (C-)	PORTHOS	T1	0.906
		T3	0.879			T3	0.969
PA	TATICH	T1	0.824	PA (C-)	SHADIA	T1	0.861
		T3	0.933			T3	0.909
CZ	APOLO	T1	0.769	CZ (C-)	DANIEL	T1	0.906
		T3	0.821			T3	0.967

Tabla 11: Medias de la relación albumina-globulina (A/G).

Medias A/G	
Individuos problema	0.918
Control negativo	0.920

Anexo II

Delfines

Tabla 12: Simbología y significado para el análisis estadístico correspondiente a enzimas musculares, ácido láctico y cortisol.

Clave	Significado
T	Total delfines de todas las instalaciones
C(-)	Controles Negativos
IM	Isla Mujeres
PA	Puerto Aventuras
CZ	Cozumel
MR	Maroma
AK	Akumal
I-A	Instalaciones Abiertas (IM, PA, CZ)
A-C	Instalaciones Cerradas (MR, AK)
M	Machos
H	Hembras
CV	Nacido en cautiverio
VL	Nacido en vida libre
1	1-9 años de edad
2	10-19 años de edad
3	20 o más años de edad
A	1 a 10 años en cautiverio
B	11-20 años en cautiverio

Anexo III

Enzimas musculares

Tabla 13: Resultados de enzimas asociadas a daño muscular. El color rojo muestra los valores por encima del rango normal, mientras que el color amarillo aquellos por debajo del rango.

Locación	Ejemplar	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
		AST (190-300 U/L)				ALT (28-60 U/L)				ALKP (300-1300 U/L)			
IM	Athos	352	344	385	385	61	79	75	102	829	866	921	909
	John	539	521	530	550	112	129	113	117	925	931	992	1019
	Madonna	368	351	402	390	55	94	67	64	389	354	412	406
	Picasso	269	263	326	298	71	76	39	86	532	539	554	488
PA	Atila	417	475	448	501	68	103	104	99	523	522	512	526
	Chaac	349	360	359	356	74	58	33	68	359	324	344	325
	Jogo	322	360	343	316	68	83	92	96	572	576	563	553
	Tatich	334	306	344	333	48	66	67	79	384	366	460	433
CZ	Apolo	371	337	377	354	78	82	69	64	449	367	425	382
	Davinci	394	405	449	437	87	107	98	99	392	338	383	348
	Jupiter	287	223	302	235	73	62	66	53	329	240	343	286
	Ramses	508	441	498	457	95	98	89	91	432	377	451	375
MR	Pakal	605	644	657	594	124	145	119	122	367	341	350	340
AK	Elena	226	243	243	230	37	27	27	33	778	702	702	674
	Cielo	201	201	198	200	54	34	29	39	314	291	319	308
IM	Porthos C(-)	420		428		75		42		542		525	
PA	Shadia C(-)	191		189		49		51		343		343	
CZ	Diego C(-)	225		223		76		38		869		841	

Continuación Tabla 13: Resultados de enzimas asociadas a daño muscular. El color rojo muestra los valores por encima del rango normal, mientras que el color amarillo aquellos por debajo del rango.

Locación	Ejemplar	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
		GGT (30-50 U/L)				CK (100-250 U/L)				LDH (350-500 U/L)			
IM	Athos	56	60	67	62	197	183	145	154	1984	2383	2085	1910
	John	58	50	61	58	139	125	128	122	1656	1776	1698	1564
	Madonna	74	67	72	72	115	102	97	103	1251	1486	1460	1379
	Picasso	42	44	45	42	156	143	129	135	1061	1186	1257	1194
PA	Atila	72	74	73	79	102	106	101	114	1666	1903	2847	1845
	Chaac	27	25	23	25	101	93	79	83	1414	1432	1448	1548
	Jogo	29	36	32	24	80	83	80	85	1102	1178	1031	1363
	Tatich	43	65	73	79	112	130	117	83	1425	1569	1475	800
CZ	Apolo	20	20	19	20	71	68	74	69	2114	2178	1870	2013
	Davinci	47	43	47	45	114	105	100	99	1724	2057	1980	1854
	Jupiter	57	46	58	52	62	55	62	80	1205	1513	1317	1137
	Ramses	70	67	71	68	120	97	85	89	1901	2114	2643	2056
MR	Pakal	78	81	80	79	98	83	80	92	1605	1803	2111	1838
AK	Elena	47	47	81	53	83	81	47	81	1176	1287	1287	1291
	Cielo	26	32	35	31	51	51	52	51	979	1040	1055	1025
IM	Porthos C(-)	35		30		128		131		1707		1343	
PA	Shadia C(-)	70		68		82		74		944		912	
CZ	Diego C(-)	48		46		235		217		1795		2024	

Tabla 14: Medias de AST, ALT y ALKP.

	AST				ALT				ALKP			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
T	369.47	364.93	390.73	375.73	73.67	82.87	72.47	80.80	504.93	475.60	515.40	491.47
C(-)	278.67		280.0		66.67		43.67		584.67		569.67	
IM	382.00	369.75	410.75	405.75	74.75	94.50	73.50	92.25	668.75	672.50	719.75	705.50
PA	355.50	375.25	373.50	376.50	64.50	77.50	74.00	85.50	459.50	447.00	469.75	459.25
CZ	390.00	351.50	406.50	370.75	83.25	87.25	80.50	76.75	400.50	330.50	400.50	347.75
MR	605.00	644.00	657.00	594.00	124.00	145.00	119.00	122.00	367.00	341.00	350.00	340.00
AK	213.50	222.00	220.50	230.00	45.50	30.50	28.00	33.00	546.00	496.50	510.50	674.00
I-A	375.83	365.50	396.92	384.33	74.17	86.42	76.00	84.83	509.58	483.33	530.00	504.17
I-C	344.00	362.67	366.00	341.33	71.67	68.67	58.33	64.67	486.33	444.67	457.00	440.67
M	395.58	389.92	418.17	401.33	79.92	90.67	80.33	89.67	507.75	482.25	524.83	498.67
H	265.00	265.00	281.00	273.33	48.67	51.67	41.00	45.33	493.67	449.00	477.67	462.67
CV	410.78	415.44	433.00	422.56	77.78	93.00	87.11	93.11	578.00	557.67	592.67	575.22
VL	307.50	289.17	327.33	305.50	67.50	67.67	50.50	62.33	395.33	352.50	399.50	365.83
1	441.17	444.67	460.17	452.83	82.83	96.83	87.83	94.00	642.33	623.17	654.67	640.50
2	355.25	352.00	378.25	360.00	70.25	84.50	81.50	84.50	449.25	411.75	457.75	429.00
3	294.80	279.60	317.40	295.80	65.40	64.80	46.80	62.00	384.60	349.60	394.40	362.60
A	441.17	444.67	460.17	452.83	82.83	96.83	87.83	94.00	642.33	623.17	654.67	640.50
B	321.67	311.78	344.44	324.33	67.56	73.56	62.22	72.00	413.33	377.22	422.56	392.11

Continuación Tabla 14: Medias de GGT, CK y LDH.

	GGT				CK				LDH			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
T	49.73	50.47	55.80	52.60	106.73	100.33	91.73	96.00	1,484.20	1,660.33	1,704.27	1,521.13
C(-)	51.00		48.00		148.33		140.67		1,482.00		1,426.33	
IM	57.50	55.25	61.25	58.50	151.75	138.25	124.75	128.50	1,488.00	1,707.75	1,625.00	1,511.75
PA	42.75	50.00	50.25	51.75	98.75	103.00	94.25	91.25	1,401.75	1,520.50	1,700.25	1,389.00
CZ	48.50	44.00	48.75	46.25	91.75	81.25	80.25	84.25	1,736.00	1,965.50	1,952.50	1,765.00
MR	78.00	81.00	80.00	79.00	98.00	83.00	80.00	92.00	1,605.00	1,803.00	2,111.00	1,838.00
AK	36.50	39.50	58.00	53.00	67.00	66.00	49.50	81.00	1,077.50	1,163.50	1,171.00	1,291.00
I-A	49.58	49.75	53.42	52.17	114.08	107.50	99.75	101.33	1,541.92	1,731.25	1,759.25	1,555.25
I-C	50.33	53.33	65.33	54.33	77.33	71.67	59.67	74.67	1,253.33	1,376.67	1,484.33	1,384.67
M	49.92	50.92	54.08	52.75	112.67	105.92	98.33	100.42	1,571.42	1,757.67	1,813.50	1,593.50
H	49.00	48.67	62.67	52.00	83.00	78.00	65.33	78.44	1,135.33	1,271.00	1,267.33	1,231.55
CV	55.56	58.11	65.00	60.78	116.11	110.33	98.11	102.11	1,582.11	1,785.56	1,906.33	1,613.44
VL	41.00	39.00	42.00	40.33	92.67	85.33	82.17	86.88	1,337.33	1,472.50	1,401.17	1,382.61
1	63.50	63.17	72.17	66.50	123.17	112.50	97.67	108.67	1,664.67	1,877.67	2,111.83	1,750.67
2	34.75	41.00	42.75	42.00	94.25	96.50	92.75	84.00	1,591.25	1,745.50	1,589.00	1,507.50
3	45.20	42.80	46.60	44.40	97.00	88.80	83.80	90.46	1,182.00	1,331.40	1,307.40	1,256.53
A	63.50	63.17	72.17	66.50	123.17	112.50	97.67	108.67	1,664.67	1,877.67	2,111.83	1,750.67
B	40.56	42.00	44.89	43.33	95.78	92.22	87.78	87.59	1,363.89	1,515.44	1,432.56	1,368.07

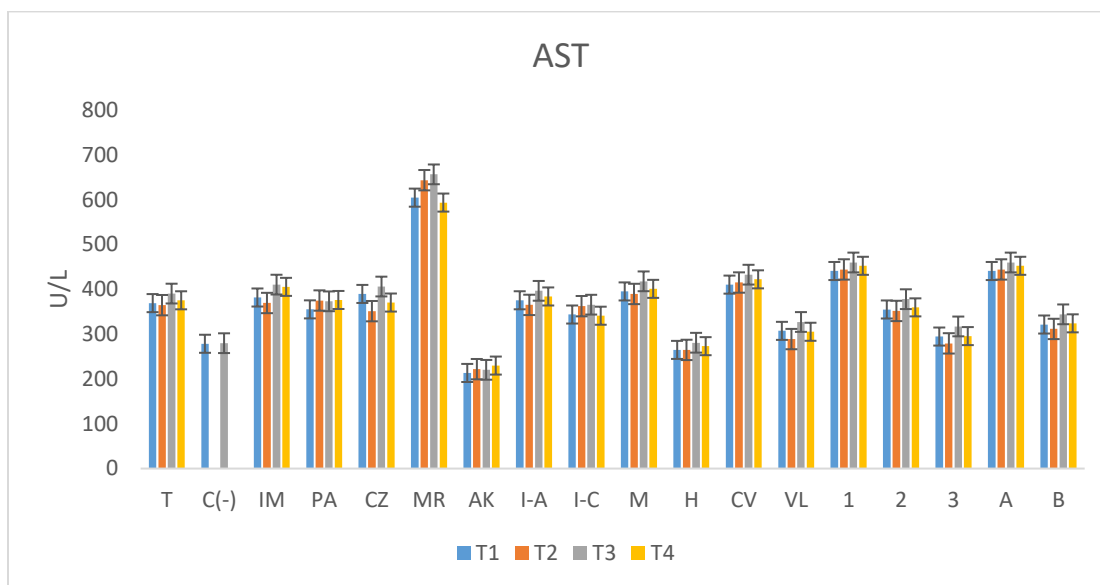


Figura 10: Medias y error estándar de los niveles de aspartato aminotransferasa (AST), antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).

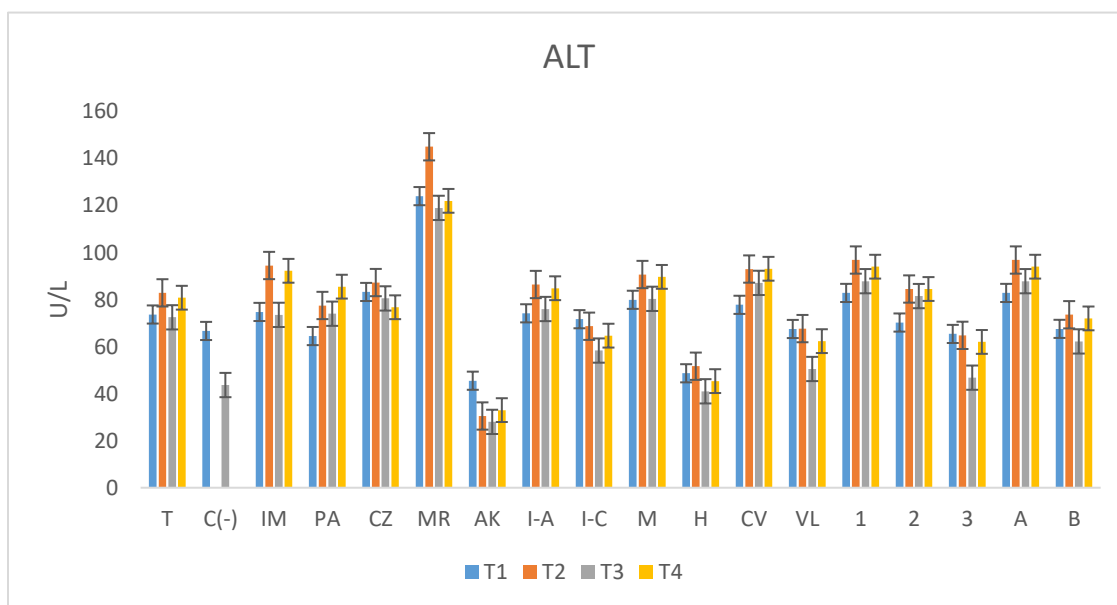


Figura 11: Medias y error estándar de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).

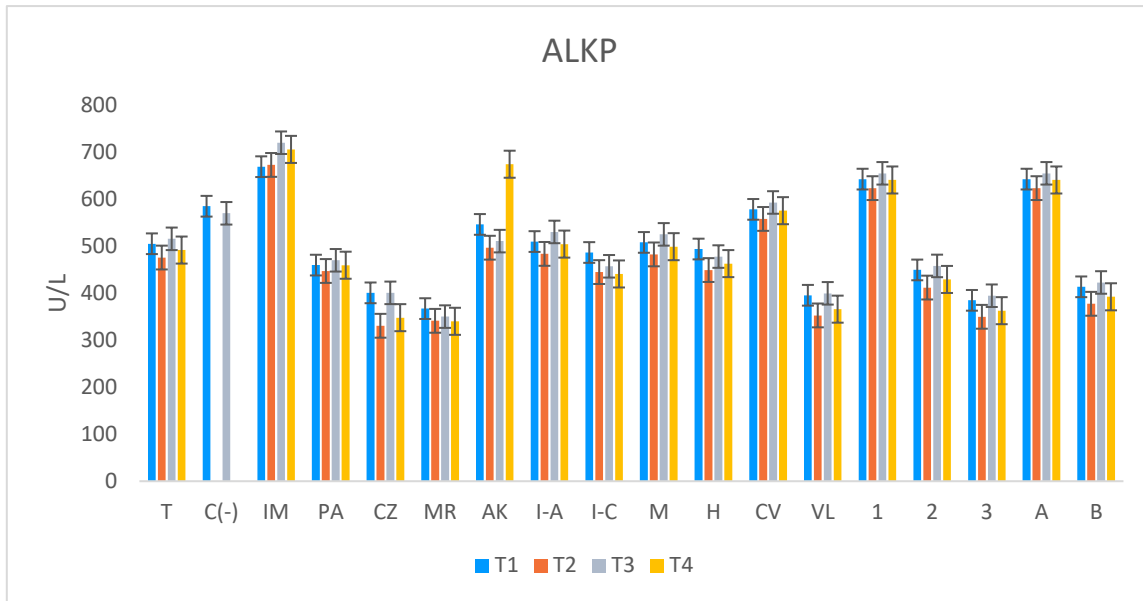


Figura 12: Medias y error estándar de los niveles de fosfatasa alcalina (ALKP), antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).

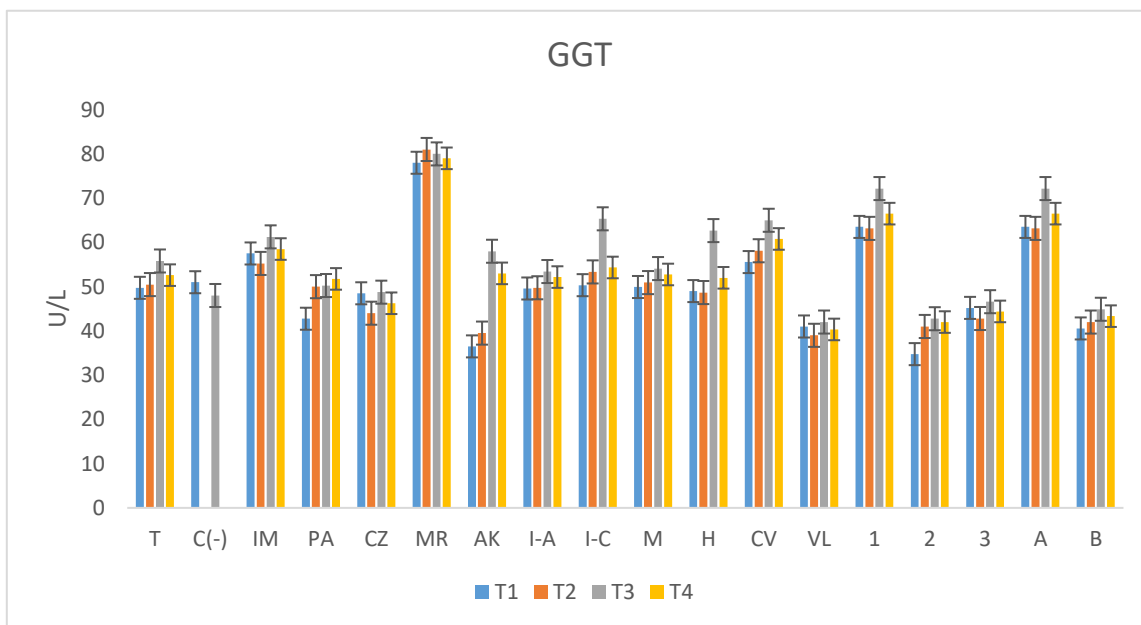


Figura 13: Medias y error estándar de los niveles de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).

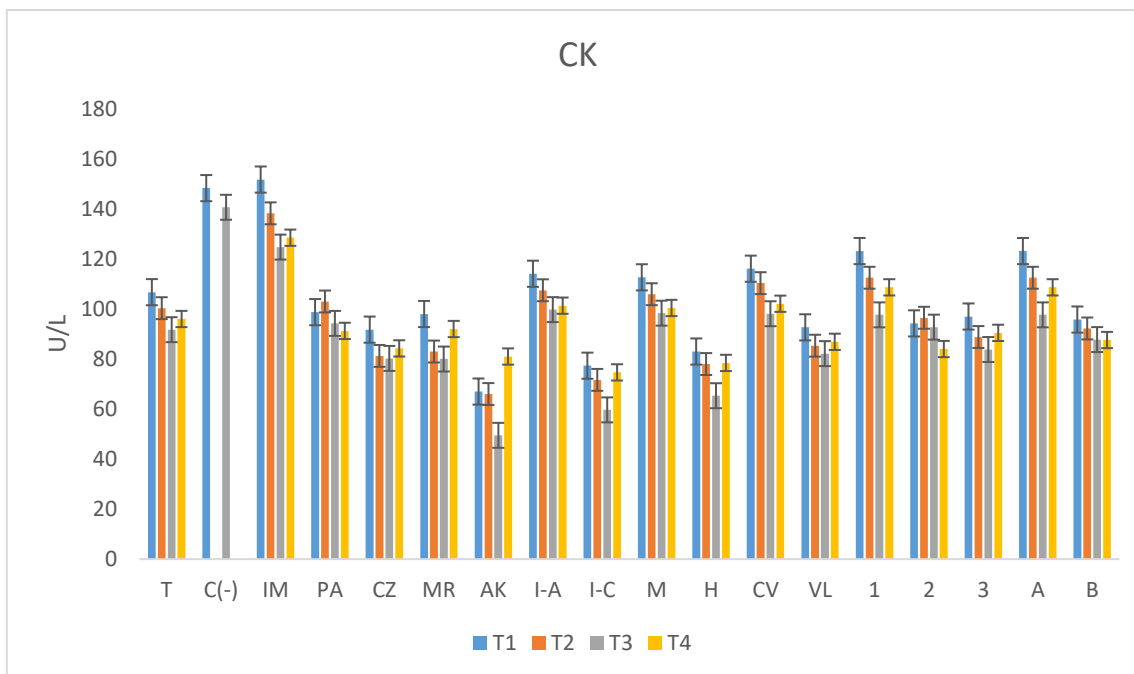


Figura 14: Medias y error estándar de los niveles de gamma creatina quinasa (CK), antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).

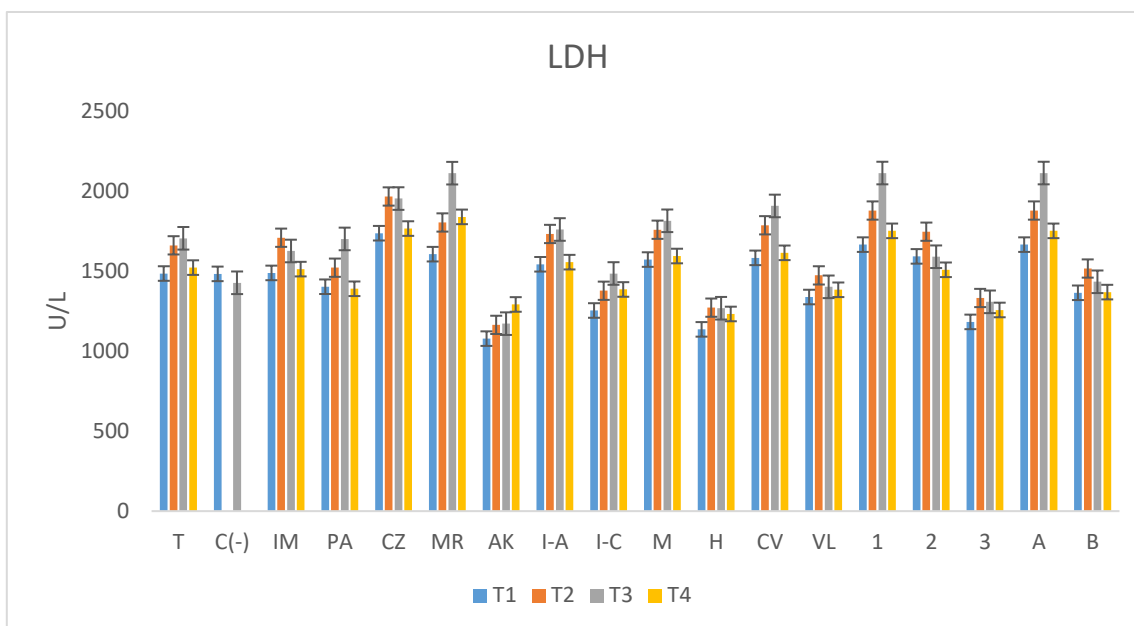


Figura 15: Medias y error estándar de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), antes del primer programa (T1), después del primer programa (T2), antes del último programa (T3) y después del último programa de nado del día (T4).

Tabla 15: ANOVA de AST. Los controles negativos se hicieron mediante una prueba t pareada. Nivel de significancia $p < 0.05$.

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST)								
Programa	T	CN	IM	PA	CZ	M	H	I-A
T2-T1	1.000	0.607	0.998	0.880	0.936	0.999	1.000	0.990
T3-T1	0.958		0.979	0.934	0.994	0.956	0.997	0.921
T4-T1	0.999		0.988	0.999	0.991	0.999	1.000	0.994
T3-T2	0.928		0.942	0.999	0.839	0.918	0.997	0.783
T4-T2	0.994		0.960	0.934	0.991	0.994	1.000	0.942
T4-T3	0.984		1.000	0.971	0.947	0.981	1.000	0.981
Programa	CV		VL	1	2	3	A	B
T2-T1	1.000	0.970	1.000	1.000	0.988	1.000	0.990	1.000
T3-T1	0.979	0.962	0.995	0.888	0.962	0.995	0.894	0.999
T4-T1	0.997	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	1.000
T3-T2	0.990	0.790	0.997	0.844	0.850	0.997	0.743	1.000
T4-T2	0.999	0.978	1.000	0.994	0.985	1.000	0.980	0.999
T4-T3	0.998	0.950	1.000	0.939	0.966	1.000	0.924	0.999

Tabla 16: ANOVA de ALT. Los controles negativos se hicieron mediante una prueba t pareada. Nivel de significancia $p < 0.05$.

ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT)								
Programa	T	CN	IM	PA	CZ	M	H	I-A
T2-T1	0.809	1.828	0.710	0.812	0.987	0.700	0.999	0.474
T3-T1	0.999		1.000	0.915	0.996	1.000	0.977	0.996
T4-T1	0.900		0.778	0.506	0.950	0.758	0.998	0.589
T3-T2	0.746		0.671	0.995	0.944	0.725	0.943	0.608
T4-T2	0.997		0.999	0.946	0.826	1.000	0.987	0.998
T4-T3	0.851		0.741	0.861	0.990	0.782	0.996	0.722
Programa	CV		VL	1	2	3	A	B
T2-T1	0.698	1.000	0.901	0.623	1.000	0.901	0.920	1.000
T3-T1	0.908	0.332	0.995	0.769	0.370	0.995	0.942	0.990
T4-T1	0.693	0.951	0.946	0.623	0.990	0.946	0.965	0.998
T3-T2	0.974	0.324	0.971	0.994	0.397	0.971	0.633	0.995
T4-T2	1.000	0.947	0.999	1.000	0.994	0.999	0.998	1.000
T4-T3	0.973	0.628	0.990	0.994	0.537	0.990	0.732	0.999

Tabla 17: ANOVA de ALKP. Los controles negativos se hicieron mediante una prueba t pareada. Nivel de significancia $p < 0.05$.

FOSFATASA ALCALINA (ALKP)								
Programa	T	CN	IM	PA	CZ	M	H	I-A
T2-T1	0.999		1.000	0.998	0.281	0.953	0.994	0.990
T3-T1	0.999	0.103	0.994	0.999	1.000	0.999	1.000	0.995
T4-T1	0.986		0.998	1.000	0.507	0.991	0.998	1.000
T3-T2	1.000		0.995	0.990	0.281	0.907	0.998	0.949
T4-T2	0.967		0.998	0.998	0.965	0.996	1.000	0.995
T4-T3	0.967		1.000	0.999	0.507	0.970	1.000	0.991
Programa	CV	VL	1	2	3	A	B	I-C
T2-T1	0.998	0.829	0.999	0.587	0.937	0.999	0.848	0.996
T3-T1	0.999	1.000	1.000	1.000	0.998	1.000	0.997	0.998
T4-T1	1.000	0.935	1.000	0.847	0.983	1.000	0.964	0.994
T3-T2	0.988	0.787	0.996	0.587	0.880	0.996	0.739	1.000
T4-T2	0.998	0.993	0.999	0.971	0.996	0.999	0.987	1.000
T4-T3	0.998	0.907	1.000	0.847	0.952	1.000	0.902	1.000

Tabla 18: ANOVA de GGT. Los controles negativos se hicieron mediante una prueba t pareada. Nivel de significancia $p < 0.05$.

GAMMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA (GGT)								
Programa	T	CN	IM	PA	CZ	M	H	I-A
T2-T1	1.000		0.993	0.987	0.989	0.999	1.000	1.000
T3-T1	0.834	0.087	0.969	0.999	1.000	0.957	0.867	0.961
T4-T1	0.978		0.999	0.977	0.999	0.986	0.998	0.987
T3-T2	0.880		0.891	0.998	0.988	0.980	0.859	0.966
T4-T2	0.991		0.980	1.000	0.999	0.996	0.997	0.990
T4-T3	0.970		0.987	0.994	0.998	0.998	0.930	0.999
Programa	CV	VL	1	2	3	A	B	I-C
T2-T1	0.987	0.998	1.000	0.974	0.997	1.000	0.998	0.925
T3-T1	0.618	1.000	0.541	0.948	0.999	0.541	0.960	0.598
T4-T1	0.906	1.000	0.965	0.960	1.000	0.965	0.989	0.979
T3-T2	0.810	0.993	0.511	0.999	0.988	0.511	0.988	0.925
T4-T2	0.986	0.999	0.953	1.000	0.999	0.953	0.999	0.996
T4-T3	0.947	0.999	0.813	1.000	0.998	0.813	0.998	0.831

Tabla 19: ANOVA de CK. Los controles negativos se hicieron mediante una prueba t pareada. Nivel de significancia $p < 0.05$.

CREATINA QUINASA (CK)								
Programa	T	CN	IM	PA	CZ	M	H	I-A
T2-T1	0.947	0.167	0.906	0.983	0.899	0.953	0.996	0.954
T3-T1	0.580		0.555	0.934	0.873	0.684	0.863	0.674
T4-T1	0.797		0.663	0.983	0.959	0.778	0.997	0.748
T3-T2	0.883		0.906	0.769	1.000	0.935	0.942	0.928
T4-T2	0.983		0.961	0.880	0.997	0.974	1.000	0.962
T4-T3	0.983		0.998	0.996	0.993	0.998	0.937	0.999
Programa	CV	VL	1	2	3	A	B	I-C
T2-T1	0.978	0.980	0.954	0.999	0.983	0.954	0.993	0.985
T3-T1	0.602	0.945	0.613	1.000	0.935	0.613	0.933	0.721
T4-T1	0.767	0.990	0.895	0.898	0.991	0.895	0.929	0.998
T3-T2	0.832	0.998	0.889	0.994	0.996	0.889	0.987	0.886
T4-T2	0.940	1.000	0.998	0.832	1.000	0.998	0.986	0.998
T4-T3	0.992	0.994	0.950	0.933	0.991	0.950	1.000	0.805

Tabla 20: ANOVA de LDH. Los controles negativos se hicieron mediante una prueba t pareada. Nivel de significancia $p < 0.05$.

LACTATO DESHIDROGENADA (LDH)								
Programa	T	CN	IM	PA	CZ	M	H	I-A
T2-T1	0.679	0.388	0.866	0.986	0.869	0.869	0.819	0.706
T3-T1	0.506		0.962	0.825	0.887	0.887	0.830	0.609
T4-T1	0.995		1.000	1.000	1.000	1.000	0.923	1.000
T3-T2	0.992		0.991	0.953	1.000	1.000	1.000	0.999
T4-T2	0.813		0.900	0.981	0.908	0.908	0.994	0.750
T4-T3	0.652		0.978	0.807	0.922	0.922	0.995	0.656
Programa	CV	VL	1	2	3	A	B	I-C
T2-T1	0.757	0.916	0.788	0.965	0.604	0.788	0.816	0.984
T3-T1	0.406	0.990	0.237	1.000	0.723	0.237	0.978	0.909
T4-T1	0.999	0.996	0.981	0.994	0.923	0.981	1.000	0.981
T3-T2	0.935	0.986	0.737	0.964	0.997	0.737	0.963	0.989
T4-T2	0.837	0.973	0.944	0.889	0.922	0.944	0.828	1.000
T4-T3	0.494	1.000	0.411	0.995	0.973	0.411	0.982	0.991

Anexo IV

Ácido láctico

Tabla 21: Concentraciones de ácido láctico. El color rojo muestra los valores por encima del rango normal, mientras que el color amarillo aquellos por debajo del rango.

Locación	Ejemplar	Ácido láctico (0.7 - 2.1 mmol/L)			
		T1	T2	T3	T4
IM	Athos	1.5	1.4	2.1	2.1
	John	0.8	1.9	4.6	2.3
	Madonna	1.1	1.4	1.2	1.9
	Picasso	1.1	1.4	1.9	2.4
PA	Atila	1.5	1.4	2.1	2.1
	Chaac	0.8	1.9	4.6	2.3
	Jogo	1.1	1.7	3.2	3.7
	Tatich	2.2	2	2.1	2.4
CZ	Apolo	0.9	1.8	1.7	1.7
	Davinci	0.7	1.2	1.9	2
	Jupiter	1	1.2	3.3	2.4
	Ramses	1.2	1.6	1.3	1.6
MR	Pakal	1	1.9	1.9	1.8
AK	Elena	0.5	1.1	1.2	1.2
	Cielo	0.5	1.9	1.6	1.3
IM	Shadia (-)	2	1.7	1.7	
PA	Diego (-)	0.5	1.5	0.7	1.5
CZ	Porthos (-)	0.6	0.8	2.2	2.3

Tabla 22: Medias de las concentraciones de ácido láctico.

	Ácido láctico (mmol/L)			
	T1	T2	T3	T4
T	1.06	1.59	2.31	2.14
C(-)	1.03		1.53	
IM	1.13	1.53	2.45	2.18
PA	1.40	1.75	3.00	2.63
CZ	0.95	1.45	2.05	1.93
MR	1.00	1.90	1.90	1.80
AK	0.50	1.50	1.40	1.20
I-A	1.16	1.58	2.50	2.24
I-C	0.67	1.63	1.57	1.43
M	1.18	1.63	2.40	2.30
H	0.70	1.47	1.33	1.55
CV	1.12	1.61	2.39	2.31
VL	1.02	1.57	1.88	1.98
1	1.02	1.60	2.38	2.12
2	1.23	1.68	2.23	2.45
3	1.04	1.52	1.92	2.05
A	1.08	1.55	2.20	1.85
B	1.04	1.61	2.39	2.35

Tabla 23: ANOVA de las concentraciones de ácido láctico. Nivel de significancia $p < 0.05$. Los resultados significativos se muestran en **negritas**.

Programa	T	CN	IM	PA	CZ	I-A	I-C	M
T2-T1	0.001	0.939	0.587	0.916	0.522	0.317	0.106	0.024
T3-T1	0.098	0.782	0.446	0.053	0.041	0.0001	0.155	0.0001
T4-T1	0.053	0.441	0.247	0.165	0.075	0.0001	0.295	0.0001
T3-T2	0.0001	0.980	0.031	0.154	0.374	0.117	0.998	0.035
T4-T2	0.0001	0.749	0.010	0.411	0.562	0.035	0.957	0.050
T4-T3	0.993	0.919	0.983	0.899	0.985	0.965	0.987	0.999
Programa	H	CV	VL	1	2	3	A	B
T2-T1	0.195	0.372	0.061	0.229	0.779	0.493	0.219	0.045
T3-T1	0.295	0.007	0.176	0.022	0.204	0.075	0.339	0.0001
T4-T1	0.137	0.004	0.002	0.024	0.095	0.081	0.017	0.0001
T3-T2	0.996	0.360	0.001	0.773	0.660	0.635	0.007	0.529
T4-T2	0.998	0.289	0.457	0.784	0.395	0.660	0.580	0.323
T4-T3	0.979	0.999	0.0001	1.000	0.963	1.000	0.0001	0.986

Anexo V

Cortisol

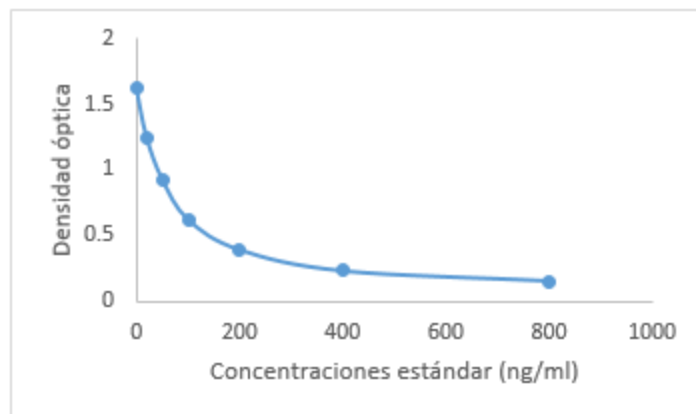


Figura 16: Curva de calibración obtenida con los valores estándar del kit. En el eje X se encuentra la concentración de cortisol en ng/ml, mientras que en el eje Y se observan los valores de la densidad óptica (absorbancia) obtenida en las muestras estándar.

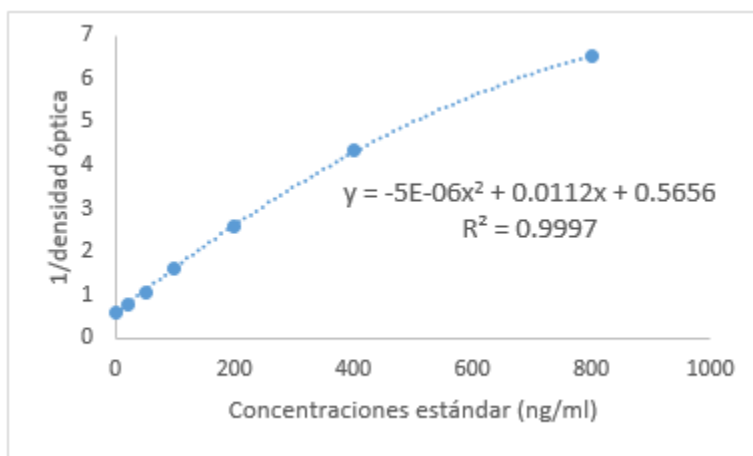


Figura 17: Línea de tendencia polinómica mostrando la ecuación para transformar los datos. En el eje X se encuentra la concentración de cortisol en ng/ml, mientras que en el eje Y se observa el valor de uno dividido entre los valores de densidad óptica de las muestras estándar.

Tabla 24: Concentraciones de cortisol en suero en los cuatro tiempos.

Locación	Ejemplar	Concentración cortisol ($\mu\text{g/dl}$)			
		T1	T2	T3	T4
IM	Athos	0.00640	0.00637	0.00638	0.00636
	John	0.00638	0.00636	0.00637	0.00636
	Madonna	0.00638	0.00636	0.00636	0.00636
	Picasso	0.00640	0.00637	0.00637	0.00636
PA	Atila	0.00639	0.00637	0.00637	0.00635
	Jogo	0.00641	0.00639	0.00636	0.00637
CZ	Apolo	0.00642	0.00637	0.00639	0.00636
	Davinci	0.00639	0.00636	0.00636	0.00636
	Jupiter	0.00642	0.00642	0.00638	0.00638
	Ramses	0.00637	0.00635	0.00636	0.00634
MR	Pakal	0.00636	0.00637	0.00636	0.00636
AK	Elena	0.00639	0.00641	0.00636	0.00634
	Cielo	0.00635	0.00636	0.00634	0.00635
PA	Diego (C-)	0.00639		0.00638	

Tabla 25: Medias de las concentraciones de cortisol en suero en los cuatro tiempos.

	Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)			
	T1	T2	T3	T4
T	0.006391	0.006373	0.006365	0.006358
C(-)	0.006390		0.006382	
IM	0.006393	0.006367	0.006369	0.006358
PA	0.006403	0.006378	0.006366	0.006360
CZ	0.006402	0.006374	0.006370	0.006361
MR	0.006361	0.006365	0.006357	0.006363
AK	0.006391	0.006373	0.006365	0.006358
I-A	0.006394	0.006369	0.006374	0.006358
I-C	0.006366	0.006376	0.006353	0.006352
M	0.006396	0.006373	0.006369	0.006360
H	0.006373	0.006374	0.006353	0.006350
CV	0.006388	0.006372	0.006364	0.006356
VL	0.006395	0.006375	0.006367	0.006361
1	0.006384	0.006372	0.006365	0.006353
2	0.006408	0.006371	0.006371	0.006364
3	0.006395	0.006375	0.006367	0.006361
A	0.006384	0.006372	0.006365	0.006353
B	0.006397	0.006374	0.006366	0.006362

Tabla 26: ANOVA de las concentraciones de cortisol en suero. Nivel de significancia $p < 0.05$. Los resultados significativos se muestran en **negritas**.

Programa	T	IM	CZ	I-A	I-C	M	H
T2-T1	0.186	0.186	0.335	0.027	0.887	0.103	0.999
T3-T1	0.044	0.215	0.231	0.027	0.824	0.078	0.571
T4-T1	0.0003	0.007	0.088	0.0001	0.765	0.0004	0.443
T3-T2	0.930	0.999	0.993	0.999	0.441	0.999	0.527
T4-T2	0.172	0.634	0.820	0.397	0.385	0.322	0.403
T4-T3	0.477	0.587	0.928	0.397	0.999	0.386	0.994
Programa	CV	VL	1	2	3	A	B
T2-T1	0.0962	0.642	0.436	0.031	0.871	0.436	0.364
T3-T1	0.007	0.505	0.111	0.29	0.404	0.111	0.182
T4-T1	0.0002	0.265	0.004	0.011	0.359	0.004	0.054
T3-T2	0.697	0.996	0.827	0.999	0.823	0.827	0.979
T4-T2	0.098	0.918	0.107	0.871	0.777	0.107	0.799
T4-T3	0.5605	0.973	0.426	0.886	0.999	0.426	0.954