

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN CIENCIAS DE LA VIDA**

**Evaluación del bienestar de *Tursiops truncatus* (delfín nariz
de botella) en condiciones de cautiverio**

Tesis

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

Presenta:

Cecilia Rangel Martínez

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por
Cecilia Rangel Martínez
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo
Codirector del Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirector del Comité

MPVM. Julio Alfonso Mercado Rodríguez
Miembro del Comité

Dr. Thomas Gunter Kretzschmar
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador
del Posgrado en Ciencias de la vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Agosto, 2014

Resumen de la tesis de **Cecilia Rangel Martínez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biología Ambiental.

Evaluación del bienestar de *Tursiops truncatus* (delfín nariz de botella) en condiciones de cautiverio

Resumen aprobado por:

Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo
Codirector de Tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirector de Tesis

Tursiops truncatus, como otros mamíferos marinos mantenidos en cautiverio, enfrenta factores de estrés debido a cambios relacionados con su ambiente y entorno. La interacción humano-animal puede ser una interacción positiva de enriquecimiento ya que fomenta la interacción social, la curiosidad y el juego. El enriquecimiento es un campo de etología en crecimiento, sin embargo, existen pocos estudios con mamíferos marinos comparado con especies terrestres. Se evaluaron como programas de enriquecimiento los programas de nado con delfines donde hay interacción humano-animal. Se determinó su eficiencia en la reducción de estrés en delfines en cautiverio utilizando técnicas clínicas de laboratorio comparando enzimas hepáticas y niveles de cortisol en sangre de *T. truncatus*, antes y después de los programas de nado. Se compararon parámetros fisicoquímicos (Temperatura, salinidad, pH, cloro y bacterias coliformes) de cada delfinario con lo establecido en la NOM-135 SEMARNAT, artículo 9.2. Sólo la temperatura en Maroma (31°C) se encuentra fuera del rango establecido. Se observó una disminución en las enzimas hepáticas después de los programas de nado, pero solo la ALKP del delfinario de Cozumel presentó diferencias significativas ($p=0.01$, $n=3$). Se observó una disminución en la concentración de cortisol en sangre después de los programas de nado, sólo los machos presentaron diferencias significativas ($p=0.039$, $n=10$). El estudio no encontró evidencia de daño muscular, ni estrés en los delfines involucrados en los programas de nado.

Palabras clave: **Enriquecimiento, daño muscular, estrés, cortisol**

Abstract of the thesis presented by **Cecilia Rangel Martínez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Environmental Biology

Evaluation of *Tursiops truncatus* (bottle-nose dolphin) welfare in captivity conditions.

Abstract approved by:

Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo
Codirector de Tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirector de Tesis

Tursiops truncatus, like other marine mammals in captivity faces stress related to changes in its environment. Enrichment through human-animal contact can be a positive interaction for these organisms as it promotes social interaction, curiosity and play. Although enrichment is a field that has grown in recent years, there are few studies with marine mammals compared to terrestrial species. Dolphin swimming programs were evaluated as human-animal enrichment, their efficiency was determined using captive dolphins clinical laboratory techniques, comparing hepatic enzymes and blood cortisol levels in dolphins *T. truncatus*, before and after the swimming with dolphins programs. Physicochemical parameters of each dolphinarium were compared with the NOM-135 SEMARNAT, Article 9.2; only the temperature in Maroma (31° C) is out of set range. A decrease in liver enzymes was observed after the swimming interaction with dolphins, but only ALKP of the Cozumel dolphinarium showed significant differences ($p= 0.01$, $n=3$). Cortisol blood levels decreased after the swimming interaction, but only males showed significant differences ($p= 0.039$, $n=10$). Dolphin swimming interaction programs did not show significant muscles damage or stress in dolphins.

Keywords: **Enrichment, muscle damage, stress, cortisol**

Dedicatorias

A mi familia,
que siempre me enseña que nada es imposible, los amo.

“Hay que celebrar nuestros fracasos para que nos guie al éxito en el futuro”...

*“En este lugar perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás.
Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas, se
curioso...porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos.”*

*Walt Disney
(La familia del futuro, 2007)*

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y en particular al posgrado de Ciencias de la Vida y al departamento de Biología Ambiental, por aceptarme y permitir desarrollar este proyecto.

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

A mis Co Directores el Dr. Horacio de la Cueva y la Dra. Clara E. Galindo por aceptarme como alumna y brindarme la oportunidad de trabajar juntos. Especialmente a la Dra. Clara por permitirme trabajar en su laboratorio, por todo su apoyo, sus enseñanzas y su confianza.

A los miembros de mi comité de tesis al Dr. Thomas Gunter Kretzschmar, por su apoyo y dedicación en el desarrollo de mi tesis y al MPVM. Julio Mercado, por su apoyo, enseñanzas y cooperación con el análisis de los datos .

A la empresa Dolphin Discovery, por la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones y el apoyo de material que brindaron.

Al Dr. Roberto Sánchez, a la Dra. Lilian Bustamante y al MVZ MC Saul Soto, por su apoyo, guía y enseñanzas en la elaboración de este proyecto.

A Adriana M., Maria, Adriana P., Lissett, Beto y al equipo de entrenadores, por su ayuda técnica y amistad.

Dra. Rosana Rodríguez Canul, a Monica Amendola, y al equipo del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del CINVESTAV, Mérida, por darme la oportunidad de realizar parte de este proyecto en su laboratorio, por sus consejos y guía en este trabajo.

M en MVZ Issa Carolina Garcia y su equipo del laboratorio de diagnostico clinico en la UABC, Mexicali por brindarme sus conocimientos, su apoyo, su paciencia y por su recibimiento durante mi estancia.

A José Chapur Zahoul, por brindarme el primer contacto dentro de la organizacion Dolphin Discovery, sin su apoyo no se hubiera realizado este proyecto de investigación.

Al personal administrativo del CICESE Ivonne Best, Citlali Romero, Dolores Sarracino, Norma Fuentes y en especial a Adriana Mejia por su apoyo en tramites académicos y su cariño.

A mi familia que siempre me apoyan, me guían y me impulsan a lograr mis sueños por más locos o extraños que sean.

A mis compañeros del laboratorio, Edna, Laura, Nacho, Paty, Marcos, Leo y Diego por su asesoría, consejos, apoyo y paciencia.

A mis compañeros y amigos de la maestría a Diego, Dany, Montse, Sergio, Karina, Lluva, Alejandro, Paola, Gera, Caro, Oscar, Rachel, Sara, Candelario, Marisol, Christian, Martín, Vivi, Constanza, Marla, Marión, Roberto y Ana Paola, que juntos exploramos, nos apoyamos y aprendimos a hacer ciencia.

A mis nenas Nuria, Vielka y Nayeli por su apoyo incondicional y aliento en momentos difíciles, por estar siempre a mi lado en cada aventura.

A Diego I. Leyva por tus palabras de aliento cuando más las necesité, por tu apoyo incondicional, tu paciencia en estos 3 años, por hacerme inmensamente feliz y por ser mi compañero de esta y muchas aventuras más..... “wings”.

Contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas	xi
Capítulo 1	1
Introducción.....	1
1.1 <i>Tursiops truncatus</i> (Toninas).....	1
1.1.1 Morfología.....	2
1.1.2 Distribución y alimentación.....	2
1.1.3 Grupos sociales.....	3
1.1.4 Factores de Riesgo y Conservación.....	3
1.2 Mamíferos marinos en cautiverio.....	4
1.3 Estrés.....	5
1.4 Estrés y respuesta inmune.....	7
1.5 Enzimas asociadas a daño muscular.....	8
1.6 Bienestar animal y enriquecimiento.....	9
Capítulo 2	11
2.1 Hipótesis.....	11
2.2 Objetivo General.....	11
2.2.1 Objetivos Particulares.....	11
Capítulo 3	12
Metodología.....	12
3.1 Zona de estudio.....	12
3.2 Toma muestras de sangre.....	13
3.3 Biometría.....	15
3.3.1 Conteo de glóbulos rojos.....	15
3.3.2 Conteo de glóbulos blancos.....	15
3.3.3 Diferencial de frotis sanguíneo.....	16
3.3.4 Obtención del Suero.....	17
3.3.5 Química sanguínea.....	17
3.4 Curva de calibración de cortisol.....	17
3.4.1 Análisis de cortisol.....	18
Capítulo 4	19
Resultados.....	19
4.1 Zona de estudio.....	19
4.2 Delfines.....	19
4.3 Biometría y Química sanguínea.....	21
4.3.1 Enzimas asociadas a daño muscular.....	21

Contenido (Continuación)

4.4 Concentración de Cortisol.....	23
4.4.1 Curva de calibración	23
4.4.2 Niveles de cortisol	23
4.6 Análisis estadísticos.....	25
4. 6. 1 Enzimas musculares	25
4. 6. 3 Niveles de cortisol en suero	32
Capítulo 5	33
Discusión.....	33
5.1 Calidad del agua	33
5.2 Enzimas de daño muscular.....	34
5.3 Niveles de cortisol	34
Capítulo 6	36
Conclusiones.....	36
Capítulo 7	37
Perspectivas.....	37
Referencias:	38
Anexo 1	44
Anexo 2.....	45

Lista de Figuras

- Figura 1: Diferencias morfológicas entre el ecotipo costero y el oceánico de *Tursiops truncatus*. Ilustración de Brett Jarrett, del libro Whales, dolphins y seals. (Shirihai y Jarrett, 2006)..... 1
- Figura 2: Mapa de distribución de *Tursiops truncatus*, en negro se observan los mares tropicales y templados del mundo donde se encuentra esta especie (Shirihai y Jarrett, 2006)..... 2
- Figura 3: Mapa donde se muestra la ubicación de las diferentes instalaciones de Dolphin Discovery donde se realizó este estudio, Imagen satelital de Google Earth..... 13
- Figura 4: Se observa como el delfín está entrenado para la toma de muestra sanguínea. La sangre se obtuvo de las venas superficiales de la aleta caudal. Foto: Cecilia Rangel. 14
- Figura 5: Células blancas de delfín, a la izquierda se observa un monocito mientras que en la parte inferior podemos observar un eosinófilo y en la parte superior a la derecha un linfocito, las células de color rojo son eritrocitos. Foto: Cecilia Rangel. 16
- Figura 6: Curva de calibración obtenida con los valores estándar y la regresión de 4PL. En el eje de las X se encuentra la concentración de cortisol en ng/ml, mientras que en el eje Y se observan los valores de la densidad óptica obtenida en las muestras estándar. 23
- Figura 7: Medias y desviación estándar de los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura. 26
- Figura 8: Medias y desviación estándar de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura. 27

Lista de Figuras (Continuación)

- Figura 9: Medias y desviación estándar de los niveles de fosfatasa alcalina (ALKP) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura. 28
- Figura 10: Medias y desviación estándar de los niveles de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel, y (PA) Puerto Aventura. 29
- Figura 11: Medias y desviación estándar de los niveles de creatina quinasa (CK) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura. 30
- Figura 12: Medias y desviación estándar de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura. 31

Lista de Tablas

Tabla 1: Calidad de Agua de los diferentes delfinarios.	19
Tabla 2: Información general de los delfines muestreados.	20
Tabla 3: Valores de las Enzimas asociadas a daño muscular antes y después del programa de nado.	22
Tabla 4: Datos obtenidos de la regresión de 4 puntos.	23
Tabla 5: Concentración de los niveles de cortisol en suero de <i>T. truncatus</i> , obtenidos antes y después de los programas de nado.	24
Tabla 6: Prueba <i>t</i> -Student de los niveles de cortisol sanguíneo, comparación de medias antes vs. después de los programas de nado.	32
Tabla 7: Datos obtenidos de las biometrías y químicas sanguíneas de <i>T. truncatus</i>	46
Tabla 8: Comparación de las enzimas hepáticas entre antes y después de los programas de nado.	48

Capítulo 1

Introducción

1.1 *Tursiops truncatus* (Toninas)

Los delfines del género *Tursiops* pertenecen a la orden Cetacea y a la familia Delphinidae, la taxonomía del género de la especie sigue en discusión, actualmente se reconocen dos especies *T. aduncus* que se encuentra en el océano indo-pacífico, habitando cerca de Australia, China y Sudáfrica. y *T. truncatus* con una distribución cosmopolita. Para *T. truncatus* se describen dos ecotipos, costero que suelen vivir en aguas más calidas y costeras, típicamente más pequeños, presentan pigmentaciones más claras y las aletas son proporcionalmente más grandes. El ecotipo oceánico suele vivir en aguas profundas, suelen ser de tamaño más grande y robusto y sus coloraciones son de un gris más oscuro (Díaz, 2003; Salinas, 2005; Niño, *et al.*, 2011; Verme y Iannaccone, 2012).



Figura 1: Diferencias morfológicas entre el ecotipo costero y el oceánico de *Tursiops truncatus*. Ilustración de Brett Jarrett, del libro Whales, dolphins and seals. (Shirihai y Jarrett, 2006).

1.1.1 Morfología

Tursiops truncatus es un delfín de tamaño mediano y cuerpo robusto, presenta una longitud de 1.9 a 3.8m y un peso aproximado de 200 a 600kg, los machos suelen ser más grandes que las hembras. El hocico es corto y bien definido, la mandíbula es más larga que el maxilar (Sapoznikow *et al.* 2000). Presenta una aleta dorsal grande y curvada, localizada en la parte media del cuerpo. El patrón de coloración va de un gris oscuro en la zona dorsal a un gris más claro o en ocasiones rosa en el vientre, existe gran variabilidad de tamaño, coloración y hábitos entre los ecotipos costero y oceánico (Niño *et al.*, 2011).

1.1.2 Distribución y alimentación

Es una especie de delfín cosmopolita que se distribuye en aguas tropicales y templadas del mundo (Figura 1), se ha observado en ambientes costeros y oceánicos (Trujillo, *et al.*, 2005), es por esto que es uno de los delfines mejor conocidos.

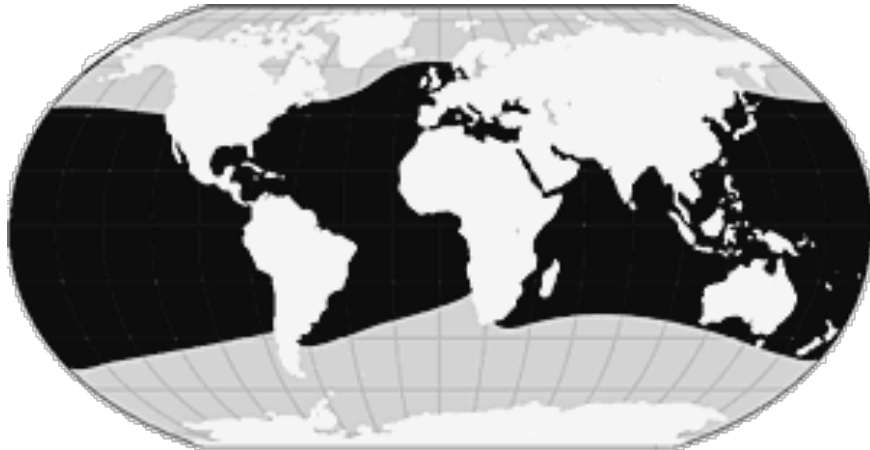


Figura 2: Mapa de distribución de *Tursiops truncatus*, en negro se observan los mares tropicales y templados del mundo donde se encuentra esta especie (Shirihai y Jarrett, 2006).

Son depredadores oportunistas con comportamientos de alimentación que va de forma cooperativa a individual (Jefferson, *et al.*, 1993). Su dieta varía de acuerdo a las condiciones ambientales y a la disponibilidad del alimento (Pérez, 2006), dentro de su dieta hay peces esasmobranquios, teleósteos, cefalópodos y crustáceos (Salinas, 2005).

1.1.3 Grupos sociales

La especie *Tursiops truncatus* es altamente social, presentan una estructura social de tipo fisión-fusión que se caracteriza en que la composición y estabilidad del grupo varían a lo largo del día, los delfines ingresan y salen constantemente del grupo, en especial los machos. Este tipo de sociedad limita el efecto de competencia dentro de la unidad, ya que cuando existe un periodo de alta competencia el grupo se divide y cuando los costos de agresión son bajos se unen obteniendo beneficios de cooperación y sociabilidad (Díaz y Bernal, 2008; Verme y Iannacone, 2012).

Los toninas presentan dos tipos de agrupaciones, una agrupación primaria o pod que consta de pocos individuos (2-10) y siempre se ven juntos como grupo. Los delfines presentan vínculos fuertes especialmente entre madre y cría, aunque también se ha visto entre parejas y tercias de machos. Están los grupos secundarios o manadas, que se caracteriza por ser una agrupación de varios grupos primarios (hasta 1000 individuos) y son de carácter temporal.(Salinas, 2005; Trujillo, *et al.*, 2005; Verme y Iannacone, 2012).

1.1.4 Factores de Riesgo y Conservación

De acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), *Tursiops truncatus* se encuentra en la lista roja en la categoría de preocupación menor (LC). Sin embargo, reconoce que la especie es vulnerable a la cacería, a la muerte por captura incidental y a la degradación de su ambiente por perturbación y contaminación (Hammond *et al.*, 2012).

En el caso de la convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre (CITES), *T. truncatus* se encuentran en el Apéndice II, que incluye especies que no se encuentran en peligro de extinción, pero su comercio debe ser controlado para evitar cambios graves en su diversidad (CITES, 2013).

En México contamos con la NOM-059-SEMARNAT (DOF 2010) para identificar las especies de flora y fauna silvestre que se encuentran en riesgo en nuestro país, y *T. truncatus* se clasifica como sujeta a protección especial (Pr), que si bien no es una especie en peligro de extinción podría llegar a serlo por lo que se determina la necesidad de recuperarla y conservarla.

1.2 Mamíferos marinos en cautiverio

El cautiverio de los cetáceos inició en 1860 (Mayer, 1998; Alaniz, 2010) desde entonces 51 especies diferentes se han mantenido en distintas condiciones de cautiverio. *T. truncatus* ha sido durante mucho tiempo la especie más comúnmente mantenida en cautiverio por su capacidad de tolerar los cambios en su ambiente. Para el 2006 existían alrededor de 880 *T. truncatus* en cautiverio en el mundo (Pérez, 2006). México inicio en la industria del cautiverio de mamíferos marinos en 1970 con la captura comercial y exhibición de delfines en presentaciones públicas. Esta industria fue creciendo y en la actualidad existen aproximadamente 27 delfinarios operando en diferentes entidades de la república como Quintana Roo, Jalisco, Guerrero, Sonora, Distrito Federal y Baja California Sur (Alaniz, 2010).

En los años 90 comenzaron los programas de nado con delfines (SWTD por sus siglas en Inglés) donde el público interactúa de manera directa con los delfines. Esta práctica es una de las más lucrativas y utilizadas en los delfinarios (Curtin y Wilkes 2007). En esta época también surgió la terapia asistida con delfines (DTA por sus siglas en Inglés), en la cual se argumenta que los delfines cuentan con propiedades curativas procedentes de su sonar, lo que ayuda a personas con autismo, síndrome de Down, déficit de atención, depresión, ansiedad y desorden del sueño (Williamson, 2008; Marino, 2011).

Con la finalidad de regular los delfinarios, en México se publicó la NOM-135-SEMARNAT (DOF, 2004) que establecen las pautas para la captura, el uso científico, el transporte, la exhibición, el manejo y el mantenimiento de mamíferos marinos en cautiverio, así como la actividad de SWTD. La norma tiene provisiones para evitar el maltrato, mantener el bienestar de los organismos y apoyar a la conservación y protección, además de aumentar el conocimiento sobre las especies (Alaniz, 2010).

Tursiops truncatus, al igual que otros mamíferos marinos que han sido mantenidos en cautiverio, tiene que afrontar factores de estrés relacionados con los cambios ambientales tanto físicos como sociales relacionados con el diseño de los encierros, así como los cambios en su alimentación y los nuevos grupos sociales. Estos factores provocan alteraciones en el comportamiento individual y sus interacciones, lo que puede repercutir de manera negativa sobre su bienestar. La preocupación sobre esta condición llevó a que los científicos buscaran una forma de mantener el bienestar de los animales en cautiverio (Luna, *et al.*, 2012).

1.3 Estrés

El bienestar está relacionado con la manera en que un organismo enfrenta su entorno y generalmente está relacionado con el estrés (Esch, *et al.*, 2009). El estrés se define como una variedad de respuestas fisiológicas frente a estímulos internos o externos, llamados estresores, que modifican la homeostasis. Esta última es el equilibrio entre el medio interno de un ser vivo y el entorno en el cual se desarrolla (Fair y Becker 2000; Schmitt *et al.* 2010).

Selye (1973) describió el síndrome de adaptación al estrés, el cual divide en tres fases: la primera denominada “reacción de alarma”, el cual se caracteriza por la activación del eje Simpático Adreno Medular (SAM) y Hipotalámico-Pituitario-Adrenal (HPA), con el fin de restaurar la homeostasis. Lo que da lugar a la segunda fase llamada “resistencia”, en la cual el organismo se adapta, llegando a un estado óptimo. Si el estresor persiste, se da inicio a la tercera fase “agotamiento”, en la que el organismo no puede adaptarse y termina enfermando o muriendo (Klinger *et al.*, 2005; Moscoso, 2009).

La respuesta al estrés está controlada por el sistema nervioso central (SNC) y también controla los tres sistemas encargados de mantener la homeostasis, son el sistema autónomo, el endocrino y el inmune (Sánchez, *et al.*, 2007).

Cuando se da una situación de estrés se activan dos ejes principalmente, el eje SAM que está coordinado por el Sistema Nervioso Autónomo Simpático. En este caso la situación adversa activa las neuronas preganglionales y posganglionales simpáticas, fomentando la liberación de las catecolaminas, epinefrina y noradrenalina. Esta liberación estimula a las glándulas suprarrenales, en la parte medular, a secretar adrenalina al torrente sanguíneo. La adrenalina ocasiona un aumento en la tasa cardíaca y respiratoria, así como un incremento en el flujo sanguíneo a los músculos, preparando al organismo para pelear o huir (Gómez y Escobar 2006).

A su vez se da la respuesta del eje HPA, que inicia con la secreción de hormonas liberadora de corticotropinas (CRH) por el hipotálamo. Estas estimulan a la hipófisis anterior para secretar hormona adenocorticotrópica (ACTH) que induce la secreción de glucocorticoides de la corteza adrenal. Una vez que los niveles de cortisol sanguíneos son altos se activa una respuesta de retroalimentación negativa, el cortisol provoca que el hipotálamo deje de secretar CRH, volviendo a niveles normales de glucocorticoides (Brousset, *et al.*, 2005; Dickens, *et al.*, 2010; Sheriff, *et al.*, 2011). El tiempo en que se puede ver un aumento en los niveles de cortisol en sangre es de aproximadamente 3-5 minutos después de presentarse el evento estresante. Estos niveles aumentan por unos 15-30 minutos para llegar al pico más alto de la concentración de glucocorticoides. A los 40 minutos podemos observar el inicio en la disminución de la concentración de cortisol por efecto de la retroalimentación negativa, volviendo a niveles normales entre los 60-90 minutos después del evento estresante (Sheriff *et al.*, 2011).

Si el factor estresante es de larga duración o alta intensidad las señales de retroalimentación son débiles y el sistema HPA permanece activo durante períodos más largos, presentando efectos negativos. En los delfines se ha observado supresión del sistema inmune, llamados de frecuencia más alta, pérdida del apetito, inestabilidad social, cambios en la frecuencia respiratoria de buceo, movimientos estereotipados y

enfermedades (Waples y Gales 2002; Esch *et al.*, 2009; Luna *et al.*, 2012). En el caso de *T. truncatus* se considera que los niveles de cortisol en la sangre bajo condiciones de encierro podrían estar comprendidos entre los 0.6-3.6 µg/dL (Dierauf y Gulland 2001).

1.4 Estrés y respuesta inmune

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

El sistema inmune se comunica y modula por contacto celular o por proteínas de bajo peso molecular llamadas interleucinas o citocinas. Estas son producidas por activación inmune de las células blanco. Los corticoides inhiben la migración y proliferación de las células inmunológicas, así como de un gran número de citocinas, en especial las pro-inflamatorias como la IL-8, que tiene una variedad de efectos indispensables en el inicio de la respuesta inmune, como son el aumento de quimiotaxis (señales que permiten la migración extracelular de neutrófilos, basófilos y linfocitos al área afectada), activación de neutrófilos, producción de especies reactivas de oxígeno y estimula la angiogénesis (Itou *et al.*, 2003); en su lugar induce la producción de IL-10 que es una citosina inmunoreguladora, capaz de inhibir la proliferación de citocinas pro-inflamatorias ocasionando depresión del sistema inmune (Klinger *et al.*, 2005).

Trabajando con *T. truncatus* Mancía *et al.* (2008) descubrieron diferencias significativas en los niveles de interleucina 8 después de la captura y de realizar estudios de evaluación de salud, por lo que la IL-8 puede ser un indicador de la respuesta inmune al estrés en esta especie.

1.5 Enzimas asociadas a daño muscular

El nado con delfines es una actividad física que puede ocasionar daño muscular en los delfines por el esfuerzo que realizan en actividades como el foot-push, donde los participantes son empujados de los pies por el hocico de dos delfines (Alaniz, 2010). Una manera de determinar si existe daño muscular es con las enzimas asociadas a daño muscular, las cuales normalmente se encuentran presentes en el plasma 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 (Geraci y ST. Aubin, 1979; Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003).

La aspartato aminotransferasa (AST) es una enzima citoplasmática y mitocondrial que cataliza la deaminación de aspartato para formar oxalacetato que puede entrar al ciclo de Krebs. La AST tiene una vida media de 7 a 8 días y los niveles altos de esta enzima pueden deberse a daño muscular o enfermedades del hígado y el corazón en cetáceos (Geraci y ST. Aubin, 1979; Fowler y Miller, 2003; Fauquier, *et al.*, 2008).

La alanina aminotransferasa (ALT) es la enzima catalizadora que transforma piruvato y glutamato. Esta enzima se encuentra principalmente en el músculo esquelético e hígado, por lo que niveles altos pueden indicar daño en alguno de estos (Fowler y Miller, 2003).

La fosfatasa alcalina (ALKP) son un grupo de enzimas situadas en la membrana celular que intervienen en diferentes procesos fisiológicos como la precipitación de fosfato cálcico en huesos, absorción de fosfatos en el intestino e hidrólisis de los ésteres fosfáticos en riñón e hígado. En los cetáceos se observa principalmente en el hígado, riñón, hueso, corazón y músculo esquelético. Pueden presentarse niveles altos en delfines jóvenes en crecimiento, los niveles bajos de esta enzima pueden ser indicadores de infecciones o de pérdida de peso (Geraci y ST. Aubin, 1979; Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003).

La gamma glutamil transferasa (GGT) es clave en la síntesis y degradación de glutatión para formar cisteína y así preservar la homeostasis intracelular del estrés oxidativo. En mamíferos marinos se ha estudiado el aumento de esta enzima por daño muscular o

enfermedades del hígado (Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003; Fauquier, *et al.*, 2008).

La creatina Quinasa (CK) es una enzima específica del músculo, ya que permite la contracción del músculo mediante la fosforilación de adenosín difosfato (ADP) desde fosfocreatina. La CK es un indicador muy sensible de daño muscular, pequeños golpes o incluso inyecciones provocan aumentos detectables, por lo que solo grandes aumentos de esta enzima tienen importancia clínica (Geraci y ST. Aubin, 1979; Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003).

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que cataliza la conversión de piruvato a lactato al final de la glucólisis. Esta enzima se encuentra en varios órganos por lo que el aumento en los niveles puede indicar daño en músculo esquelético, hígado, corazón, riñón, bazo o pulmón (Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003).

1.6 Bienestar animal y enriquecimiento

El enriquecimiento es una herramienta empleada con el fin de mejorar situaciones de aburrimiento y estrés, evitando así movimientos estereotipados, los cuales son patrones de movimiento que se realiza en repetidamente y no tiene una función u objetivo aparente; (Castillo-Guevara, *et al.*, 2012) y enfermedades causadas por la inactividad asociada a la vida en cautiverio. A diferencia de la naturaleza, donde los animales tienen que enfrentarse a diferentes actividades y retos en su vida diaria para asegurar su sobrevivencia, en cautiverio sus necesidades primarias son provistas, lo que genera una vida monótona (Ruiz Ramos y Díaz Castillo, 2008).

El enriquecimiento implica la adición de objetos o incentivos ambientales, diseñados para estimular uno o más de los sentidos, aumentando la actividad física y la curiosidad, llevando a una psicología óptima y un bienestar fisiológico (Shepherdson, *et al.*, 1999; Shepherdson, 2003; Hoy, *et al.*, 2010). Se busca que estos incentivos sean lo más parecidos a los que podrían tener en estado natural, por lo que es importante estudiar la biología, historia natural y ecología de la especie (Hunter, *et al.*, 2002). Existen diferentes tipos de enriquecimiento dependiendo del estímulo que generen,

como son los de alimentación, táctiles, olfatorios, visuales, auditivos, estructurales, sociales y la interacción humano-animal (Hoy, *et al.*, 2010; Delfour y Beyer, 2012).

El enriquecimiento tiene como objetivos: 1. Crear encierros con un ambiente novedoso y complejo que ofrece interacción con su alrededor y fomentar diversos comportamientos e interacciones sociales. 2. Proveer problemas cognitivos o desafíos que fomenten la actividad cerebral. 3. Satisfacer las necesidades específicas de la especie y fomentar su comportamiento natural (Shepherdson, 2003).

El enriquecimiento por interacción humano-animal puede ser determinado de tres maneras. La primera es una relación negativa que se caracteriza por que el animal es muy temeroso de los seres humanos y evita el contacto o proximidad con ellos. La interacción "neutral" presenta un animal que muestra niveles bajos de miedo hacia la gente, pero todavía evita el contacto con ellos. Una relación positiva se da si el animal no tiene miedo y en su lugar muestra un poco de confianza hacia los humanos. Una interacción positiva puede ser enriquecimiento ya que fomenta la interacción, curiosidad y el juego (Claxton, 2011).

Uno de los mayores problemas que enfrenta el enriquecimiento actualmente es comprobar la eficiencia de las diferentes actividades. Una de las técnicas más utilizadas es la etología que conlleva a observaciones del comportamiento, detectando la reducción de movimientos estereotipados y aumento de actitudes deseadas como la curiosidad, explorar o jugar (Claxton, 2011). El problema de evaluar mediante esta técnica es que es difícil hacer observaciones diario y durante todo el día.

Aunque el enriquecimiento es un campo que ha crecido mucho en los últimos años (Hoy *et al.*, 2010), existen pocos estudios con mamíferos marinos, a comparación de los realizados con especies terrestres (Hunter, *et al.*, 2002; Delfour, 2010; Claxton, 2011; Delfour y Beyer, 2012).

Por eso este estudio compara de manera objetiva los efectos del SWTD en el bienestar de *T. truncatus*.

Capítulo 2

2.1 Hipótesis

Existirán niveles más altos de cortisol y enzimas musculares en sangre en los delfines *Tursiops truncatus* que presenten estrés durante los programas de nado a diferencia de aquellos delfines que relacionen al nado con sesiones de enriquecimiento.

Los niveles de cortisol y enzimas musculares en sangre de *Tursiops truncatus* como efecto de los programas de nado serán mayores a los anteriores al nado.

2.2 Objetivo General

Para determinar el efecto del nado como un programa de bienestar para *Tursiops truncatus* en cautiverio se determinarán los niveles de cortisol y enzimas musculares en sangre de delfín.

2.2.1 Objetivos Particulares

- * Evaluar la salud general de los delfines con biometrías y químicas sanguíneas para comparar niveles basales con los posteriores al enriquecimiento.
- * Evaluar si existe diferencias significativas en los niveles de las enzimas asociadas a daño muscular en sangre para determinar la existencia de daño muscular por los programas de nado.
- * Evaluar los niveles de cortisol presentes en sangre antes y después de los programas de nado para determinar si estas actividades pueden ser consideradas como una forma de enriquecimiento a *T. truncatus* en cautiverio.

Capítulo 3

Metodología

En este trabajo se realizó un estudio básico de salud que consta de un análisis de química y biometría hemáticas, con el fin de realizar el estudio en organismos sanos, posteriormente se realizó un análisis de las enzimas asociadas a daño muscular para determinar alteraciones sugestivas de daño muscular durante los programas de nado y por ultimo se llevo acabo un análisis de niveles de cortisol en sangre por ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Hemos elegido esta prueba al ser la más utilizada para medir niveles de cortisol en suero, por su alta sensibilidad y especificidad del 80%, dependiendo de los anticuerpos utilizados (Brousset et al., 2005; Sheriff et al., 2011).

3.1 Zona de estudio

Se realizaron los estudios en seis delfinarios de la empresa Dolphin Discovery en el estado de Quintana Roo, México.

- 1) Puerto Aventura (PA): 20°30'01.03"N, 87°13'35.26"O
- 2) Dreams (D): 20°30'5.45"N, 87°13'8.49"O
- 3) Parque Chankanaab, Cozumel (COZ): 20°26'38.27"N, 86°59'38.56"O
- 4) Maroma (MM): 20°43'25.39" N, 86°58'38.94"O
- 5) Moon Palace (MP): 20°59'0.35"N, 86°49'33.22"O
- 6) Isla Mujeres (IM): 21°14'4.31"N, 86°44'30.03"O



Figura 3: Mapa donde se muestra la ubicación de las diferentes instalaciones de Dolphin Discovery donde se realizó este estudio, Imagen satelital de Google Earth.

A cada delfinario se le evaluarán diferentes condiciones, las cuales fueron contrastadas por las establecida en la NOM-135-SEMARNAT (DOF, 2004). Como se miden varios corrales, al final se hizo un promedio por instalación para poder manejar los datos más fácilmente.

- Encierro: cerrado o abierto
- Calidad del agua: temperatura, pH y cuenta de bacterias coliformes.
- Delfines: tiempo en cautiverio, sexo y edad de cada uno de ellos.

3.2 Toma muestras de sangre

Los delfines han sido entrenados para levantar la aleta caudal para la obtención de la muestra de sangre (Figura 3) y disminuir así el estrés por la toma de la muestra (Brando, 2010). A cada delfín se le extrajeron dos muestra de sangre con la ayuda de un catéter de mariposa, una se coloca en tubos vacutainers con EDTA (1mg/ml) para

evitar la formación de coágulos y se uso para las biometrías, la segunda muestra se usó para la química sanguínea y evaluación del cortisol, se tomó en un tubo vacutainer de tapa roja (activadores de coagulación), una vez formado el coágulo se centrifugó para obtener el suero, ya que éste se mantiene bastante estable cuando se almacena a -20°C (Hall *et al.*, 2007; Sheriff *et al.*, 2011).



Figura 4: Se observa como el delfín está entrenado para la toma de muestra sanguínea. La sangre se obtuvo de las venas superficiales de la aleta caudal. Foto: Cecilia Rangel.

Como control negativo ($n=3$) se muestrearon delfines que no presentaron ningún tipo de actividad por un periodo de 12 horas. Para los controles positivos ($n=3$) se muestrearon delfines antes y después de sesiones de entrenamiento o enriquecimiento. Los delfines problema ($n=26$) fueron muestreados antes y después de los programas de nado con delfines.

3.3 Biometría

Con la técnica descrita por Thrall *et al.*, (2012) se realizó el hemograma completo sólo de las muestras de sangre de antes del programa de nado o sesión de enriquecimiento. Para determinar el valor de las proteínas plasmáticas y el hematocrito, se llenaron $\frac{3}{4}$ partes de un capilar, posteriormente se centrifugó en una microcentrífuga (QBC VET centrifuge) a 11,000 rpm durante 5 minutos y se utilizó una tabla para determinar el valor de hematocrito. El volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH) y la concentración corpuscular media de hemoglobina (CMHC) se calcularon a partir del valor hematocrito, la concentración de hemoglobina y el recuento de eritrocitos.

3.3.1 conteo de glóbulos rojos

En el caso de los glóbulos rojos se utilizó el diluyente isotónico Hayen en una concentración de 1:200 sangre: solución, para evitar lisis y fragmentación (Weiss y Wardrop, 2010; Thrall *et al.*, 2012). Se realizó el conteo en la cámara de Neubauer utilizando el objetivo 10x del microscopio compuesto (Olympus, CX21). El recuento de glóbulos rojos se expresa en eritrocitos/mm³ (Thrall *et al.*, 2012).

3.3.2 conteo de glóbulos blancos

Para el conteo de glóbulos blancos a la muestra de sangre se le añadió un diluyente de glóbulos rojos llamado Turk, que permite evidenciar los leucocitos. Se recomienda su uso en una concentración de 1:20 de sangre total por solución de Turk (Weiss y Wardrop, 2010). Posteriormente se realizó el conteo por microscopía con el objetivo de 40x, con la ayuda de una cámara de Neubauer. El recuento de glóbulos blancos se expresa en leucocitos/mm³ (Thrall *et al.*, 2012).

3.3.3 Diferencial de frotis sanguíneo

Se realizó un frotis sanguíneo para cada organismo, en uno de los extremos del portaobjetos se colocó una gota de sangre y se expandió con la ayuda de otro portaobjetos, se dejó secar y posteriormente se tiñó con tinción hemocolorante rápido (HYCEL) que contienen una solución 1 con eosina que es un colorante ácido, una solución 2 con azul de metileno (colorante alcalino). El portaobjetos se introdujo en la solución fijadora asegurándose de cubrir toda la muestra y se dejó ahí por 30 segundos, posteriormente se retiró el exceso y se introdujo en la solución 1 por 30 segundos, se revisó que toda la muestra tuviera un color rosa, se eliminó el exceso y se introdujo en la solución 2 por 30 segundos, una vez pasado este tiempo se retiró el exceso y se lavó con agua destilada hasta eliminar el exceso de color y se observó al microscopio.

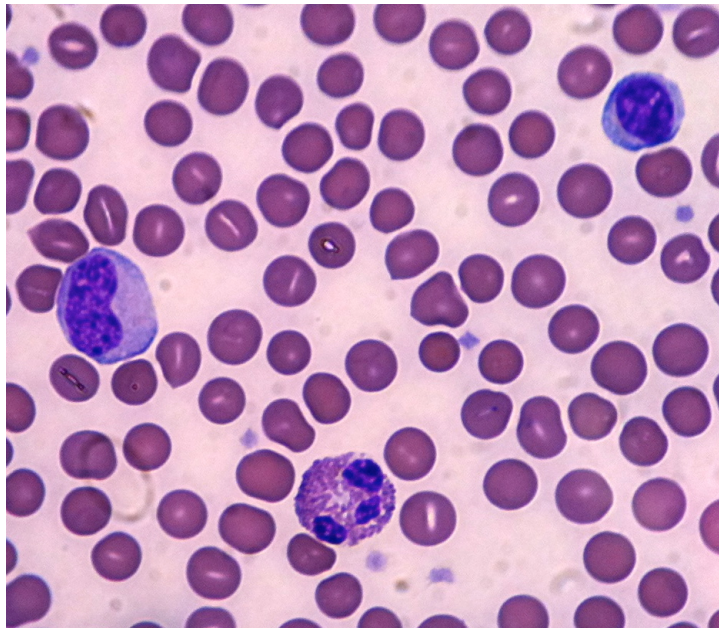


Figura 5: Células blancas de delfín, a la izquierda se observa un monocito mientras que en la parte inferior podemos observar un eosinófilo y en la parte superior a la derecha un linfocito, las células de color rojo son eritrocitos. Foto: Cecilia Rangel.

Se realizó el recuento diferencial utilizando el objetivo de 100x. Se cuentan 100 células, diferenciando entre neutrófilos, basófilos, monocitos, eosinófilos y linfocitos.

3.3.4 Obtención del Suero

Se dejaron reposar los tubos vacutainer de tapa roja por 20 a 40 minutos hasta que se formara el coagulo, posteriormente se centrifugó la muestra (Hamilton Bell, V6500) a 13,000rpm por 30 minutos, se verificó que la muestra no presentara fibrina en el suero, si era el caso se despegaba la fibrina y se centrifugaba de nuevo a 13,000rpm por 15 minutos. Posteriormente el suero se extrajo con cuidado del tubo con una micropipeta y fue transferido a un tubo nuevo.

3.3.5 Química sanguínea

La biometría y la química sanguínea de todos los individuos muestreados, solo se llevó a cabo en la primera muestra obtenida antes del programa de nado o sesión de enriquecimiento. Otros metabolitos químicos como son: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALKP), creatina quinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) se analizaron antes y después del programa o sesión, para evaluar si existe alguna asociación en su alteración sugestiva de daño muscular durante los programas de nado.

La determinación de los parámetros bioquímicos, enzimas, metabolitos, proteínas totales y glucosa se realizó mediante un autoanalizador IDEXX (Vet-Test) utilizando las laminillas correspondientes del equipo (Equine Health Profile). Para este análisis se utilizó 1ml de la muestra de suero y se corrió en el programa de ganado de carne, ya que es la especie evolutivamente más cercana y filológicamente más parecida a los delfines de las especies que analiza el IDEXX (Dwyer, 2000).

3.4 Curva de calibración de cortisol

La concentración de cortisol en plasma se cuantificó por la prueba de ELISA, utilizando el kit comercial Cortisol ELISA, DRG para suero humano. Para poder utilizar el kit se siguió el protocolo de concentración de cortisol en suero de mamífero marino utilizado por Kershaw, *et al.*, (2013). Se mezclaron 230µl de suero de delfín en 1ml de éter

etílico y se agitó en vortex por 20 segundos, posteriormente se centrifugó a 3800xg por 5 minutos y los tubos se congelaron a -80°C por 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se separó la fase acuosa por decantación y se puso a evaporar el éter a temperatura ambiente en una campana de extracción, hasta llegar a un volumen de $\approx 100\mu\text{l}$, se enjuagaron las paredes del tubo con $150\mu\text{l}$ de éter etílico y el tubo se puso en una unidad ultrasónica por 10 minutos. Posteriormente se evaporó nuevamente el éter hasta $\approx 10\mu\text{l}$ y se le agregaron $40\mu\text{l}$ del mismo suero de delfín al que se le extrajo el cortisol, se agitó en vortex y centrifugo por 3 minutos a 3,800xg. Este suero se guardó a -80°C hasta su uso. Se realizó una curva de calibración utilizando los valores usando los estándares del kit con concentraciones de 0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 ng/ml. Con los valores de densidad óptica, se hizo una regresión de cuatro puntos; con los valores obtenidos de A, B, C, D y $F =$ densidad óptica (DO), se obtuvieron las concentraciones de cortisol utilizando la siguiente formula:

$$F(X) = \left[\frac{A - D}{1 + \frac{\left[\frac{X}{C} \right] B}{C}} \right] + D \quad (1)$$

3.4.1 Análisis de cortisol

Para la prueba se colocaron $20\mu\text{l}$ de muestra y $200\mu\text{l}$ del conjugado de enzima en cada pocillo de la placa de ELISA correspondiente. Se mezcló bien y reposaron por 60 minutos a temperatura ambiente. En este caso el cortisol de la muestra de plasma y el cortisol conjugado compiten para unirse a los anticuerpos. Posteriormente se lavaron los pocillos con la solución de lavado de $\approx 400\mu\text{l}$ y se agrega $100\mu\text{l}$ de la solución de sustrato, dejando reposar por 15 minutos. Al agregar el sustrato de la enzima se produce un color, la intensidad de la coloración es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra de plasma analizada. Pasado el tiempo de incubación se detuvo la reacción con $100\mu\text{l}$ de la solución de "STOP" y se leyó la densidad óptica a $450 \pm 10 \text{ nm}$, en un lector de microplacas.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Zona de estudio

De cada delfinario se obtuvieron los datos de las últimas mediciones sobre calidad de agua.

Tabla 1: Calidad de Agua de los diferentes delfinarios.

Rangos	NOM-135 Art. 9.2	MM	COZ	DMS	PA	MP	IM
Tipo de encierro	Abierto/Cerrado	Cerrado	Abierto	Abierto	Abierto	Abierto	Abierto
Temperatura (°C)	14-27	31	29	30	28	31	28
Coliformes	1000 NMP/100ml	60	255	224	43	95	174
E.coli	-	0	28	25	0	10	18
Salinidad	18-36 ppm	32	NA	NA	NA	NA	NA
pH	6.0-8.0	8	NA	NA	NA	NA	NA
Cloro	-	0	NA	NA	NA	NA	NA

Se muestran los promedios obtenidos por cada instalación y las establecidas por la NOM-135-SEMARNAT (DOF, 2004).

4.2 Delfines

Para cada delfín se obtuvieron los datos de edad, sexo, nacido en cautiverio o vida libre y tiempo en cautiverio.

Tabla 2: Información general de los delfines muestreados.

No.	Ejemplar	Localidad	Sexo	Edad (años)	Origen	Tiempo en cautiverio (años)
1	Chaac (-)	COZ	M	16	vida libre	9
2	Krista (-)	COZ	H	9	cautiverio	9
3	Noel (-)	COZ	H	4	cautiverio	4
4	Davinci (+)	COZ	M	13	cautiverio	13
5	Leia (+)	COZ	H	8	cautiverio	8
6	Quintus (+)	MP	M	4	cautiverio	4
7	Atila	IM	M	6	cautiverio	6
8	Danni	MM	M	4	cautiverio	8
9	John	MM	M	3	cautiverio	3
10	Morelos	MM	M	3	cautiverio	3
11	Myranda	IM	H	4	cautiverio	4
12	Padme	COZ	H	7	cautiverio	7
13	Ramses	MP	M	6	cautiverio	6
14	Vale	IM	H	9	cautiverio	9
15	Cielo	PA	H	17	vida libre	11
16	Diana	PA	H	16	vida libre	10
17	Izamal	IM	M	17	vida libre	9
18	Jupiter	PA	M	16	vida libre	10
19	Madonna	IM	H	17	vida libre	10
20	Odisea	IM	H	18	vida libre	13
21	Regina	PA	H	19	vida libre	14
22	Simbad	IM	M	16	vida libre	13
23	Apolo	PA	M	18	vida libre	17
24	Amaya	COZ	H	24	vida libre	19
25	Daniela	IM	H	24	vida libre	18
26	Estrella	PA	H	23	vida libre	16
27	Foxie	COZ	H	20	vida libre	15
28	Hellen	IM	H	33	vida libre	23
29	Hera	DMS	H	33	vida libre	14
30	Lissy	PA	H	24	vida libre	18
31	Lulu	DMS	H	33	vida libre	23
32	Picasso	IM	M	20	vida libre	15

Los delfines que presentan (+) son los que se usaron como control positivo y (-) como control negativo. Localización es Cozumel (COZ), Puerto aventura (PA), Isla Mujeres (IM), Maroma (MM), Moon Palace (MP) y Dreams (DMS).

4.3 Biometría y Química sanguínea

A cada delfín se le hizo la biometría y química sanguínea completa para evaluar estado de salud general (Anexo 1). Estas se compararon con los historiales medios que tiene Dolphin Discovery de sus delfines y se determinaron como organismos sanos.

4.3.1 Enzimas asociadas a daño muscular

Las enzimas asociadas a daño muscular fueron analizadas antes y después del programa para evaluar algún tipo de daño muscular al realizar los programas de nado.

Tabla 3: Valores de las Enzimas asociadas a daño muscular antes y después del programa de nado.

No.	Antes de Programa							Después de Programa						
	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALKP (U/L)	GGT (U/L)	CK (U/L)	LDH (U/L)		AST (U/L)	ALT (U/L)	ALKP (U/L)	GGT (U/L)	CK (U/L)	LDH (U/L)	
1	441	63	421	28	40	1830		440	74	392	27	25	1873	
2	546	82	672	57	107	3406		448	68	523	53	61	1327	
3	419	67	878	34	102	3314		432	77	863	39	59	1907	
4	431	82	636	49	50	2800		433	89	655	48	84	1584	
5	391	68	827	43	72	1419		388	78	750	40	50	1508	
6	427	98	985	46	68	4115		441	90	908	48	88	1796	
7	385	79	524	65	80	2170		361	74	522	73	50	1730	
8	622	97	684	45	94	1892		540	93	598	39	120	1768	
9	376	73	1210	51	60	1413		334	66	1038	43	74	1313	
10	343	64	1467	33	119	1332		323	53	1479	32	111	1379	
11	497	126	645	47	83	3682		503	105	631	49	109	1655	
12	459	100	507	32	69	1800		455	95	452	32	58	4578	
13	514	91	1254	73	64	3793		467	103	1063	70	90	2873	
14	557	91	527	49	75	3083		555	92	464	50	64	3873	
15	185	61	407	18	38	1095		225	51	306	15	0	1422	
16	184	68	547	29	36	910		159	45	438	24	4	954	
17	411	90	476	58	62	3503		413	68	406	58	38	1881	
18	344	82	440	63	42	1489		340	70	400	68	42	1472	
19	539	97	605	81	91	3288		521	112	542	78	117	1707	
20	367	47	366	23	55	1209		325	77	320	17	67	1033	
21	561	69	669	39	83	1656		551	89	662	42	67	1706	
22	225	52	1149	41	61	1538		199	61	1146	36	61	1366	
23	369	84	672	26	166	1559		362	55	560	26	96	1596	
24	274	51	487	70	60	1360		302	76	439	76	82	1355	
25	355	83	357	32	68	1397		341	67	328	31	81	1422	
26	854	147	216	71	198	4261		875	113	202	77	251	5907	
27	360	91	512	40	25	1488		348	100	463	39	43	1538	
28	463	75	485	74	28	4837		429	106	453	74	42	1803	
29	565	142	257	107	24	3230		545	134	250	108	19	1992	
30	533	126	359	65	23	1624		500	87	328	65	25	1579	
31	1432	154	339	270	18	3915		1099	151	296	258	4	4253	
32	330	81	534	37	68	1695		341	69	497	41	57	1613	

4.4 Concentración de Cortisol

4.4.1 Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración utilizando los valores estándares del kit. Se obtuvieron los siguientes puntos de la regresión no lineal.

Tabla 4: Datos obtenidos de la regresión de 4 puntos.

REGRESION 4PL	
A	0.0774
B	-1.13389
C	53.33054
D	1.054

Con los 4 puntos obtenidos se calculó la concentración de cortisol en cada muestra de la curva de calibración.

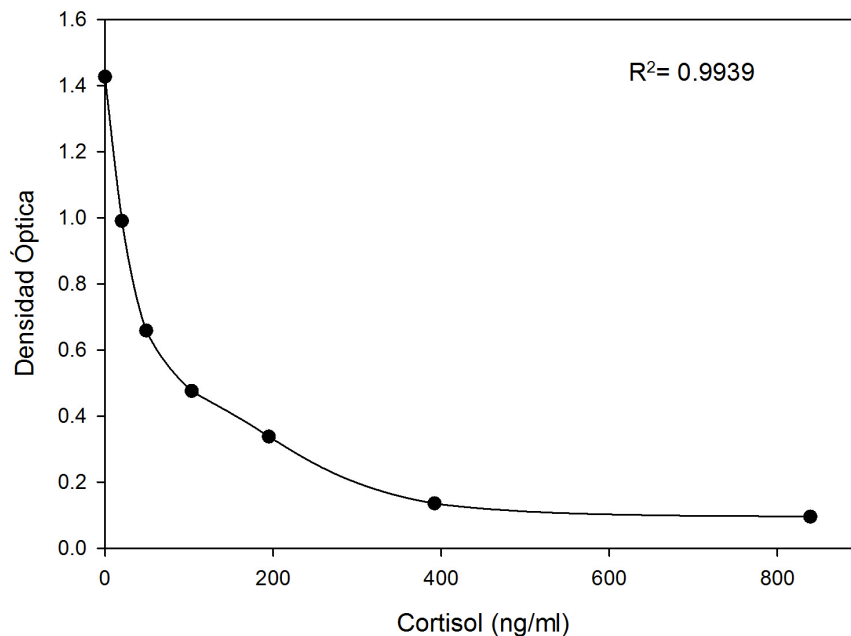


Figura 6: Curva de calibración obtenida con los valores estándar y la regresión de 4PL. En el eje de las X se encuentra la concentración de cortisol en ng/ml, mientras que en el eje Y se observan los valores de la densidad óptica obtenida en las muestras estándar.

4.4.2 Niveles de cortisol

Una vez obtenida la curva se obtuvieron las concentraciones de cortisol de cada muestra en ng/ml, los cuales fueron convertidos en $\mu\text{g/dL}$, para poder compararlos con los valores reportados para delfines en cautiverio.

Tabla 5: Concentración de los niveles de cortisol en suero de *T. truncatus*, obtenidos antes y después de los programas de nado.

No.	Antes del programa $\mu\text{g/dL}$	Después del Programa $\mu\text{g/dL}$
1	0.9	0.8
2	0.9	0.9
3	1.3	1.1
4	1.2	1.1
5	1.2	1.3
6	1.3	1.1
7	7.2	1.5
8	7.9	2.3
9	1.3	0.8
10	12.6	3.6
11	0.8	0.8
12	0.6	0.3
13	2.8	2.2
14	1.2	1.4
15	1.5	1.1
16	1.2	0.8
17	0.5	0.5
18	1.1	0.8
19	0.5	0.3
20	3.0	2.5
21	1.0	0.8
22	2.6	1.3
23	3.7	1.0
24	2.1	2.6
25	4.4	2.2
26	4.5	4.3
27	1.4	0.1
28	4.5	2.7
29	1.1	1.1
30	0.4	0.8
31	0.4	0.4
32	3.0	1.1

Delfines con (+) son los que se usaron como control positivo y los que presentan(-) son los controles negativos.

Según los valores reportados para delfines en cautiverio de 0.6-3.6 $\mu\text{g/dL}$ (Dierauf y Gulland, 2001), los delfines que presentaron valores más altos a los reportados antes de los programas de nado fueron los individuos 7, 8, 10, 25, 26 y 28; mientras que 12, 19 y 27 presentaron valores más bajos a los reportados después de los programas de nado; el resto de los delfines están dentro del rango reportado anteriormente. Todos presentaron una disminución en los niveles de cortisol después de los programas de nado.

4.6 Análisis estadísticos

4. 6. 1 Enzimas musculares

Se analizaron las enzimas hepáticas con una prueba *t* de Student para buscar diferencias significativas entre el antes y el después de los programas de nado con delfines en los diferentes grupos analizados (Anexo 2).

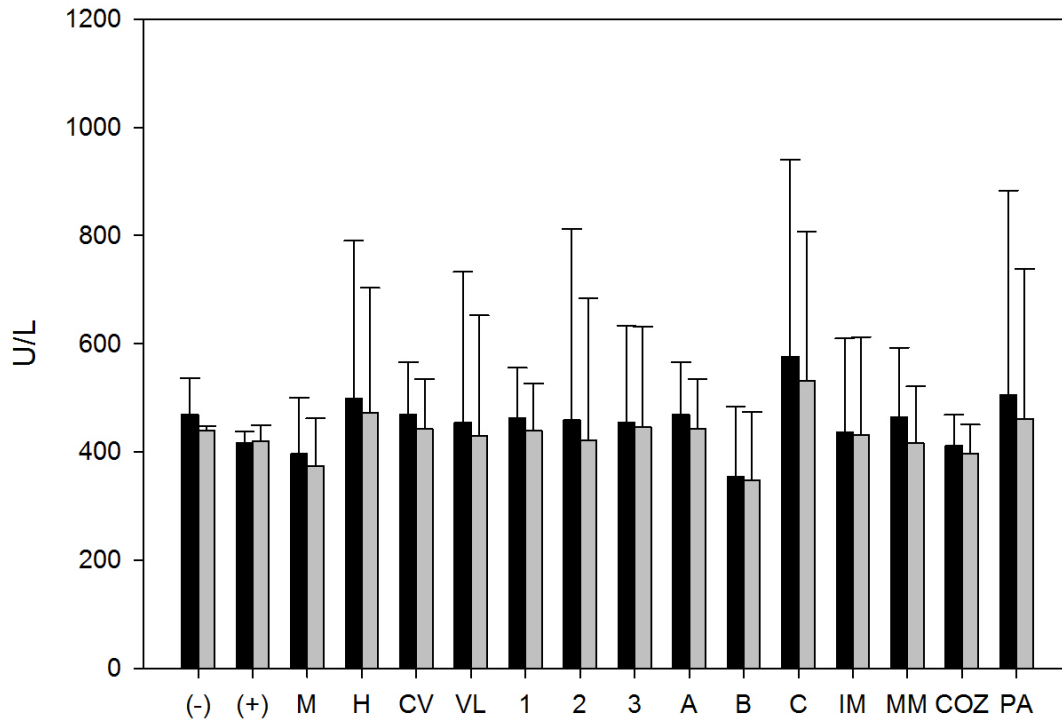


Figura 7: Medias y desviación estándar de los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura.

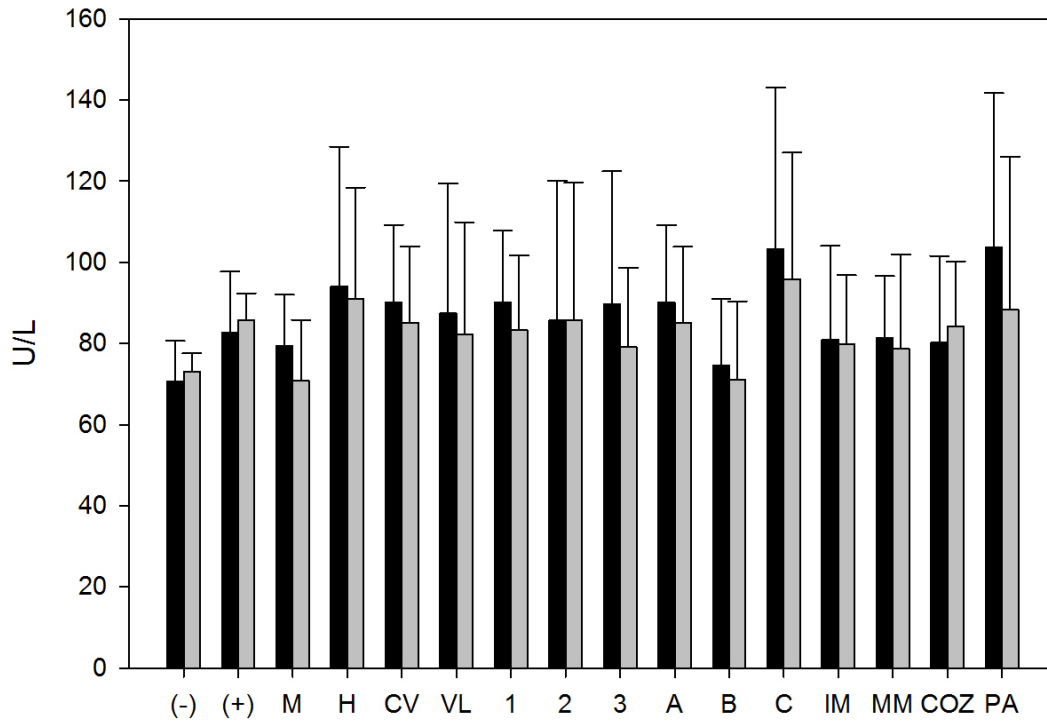


Figura 8: Medias y desviación estándar de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura.

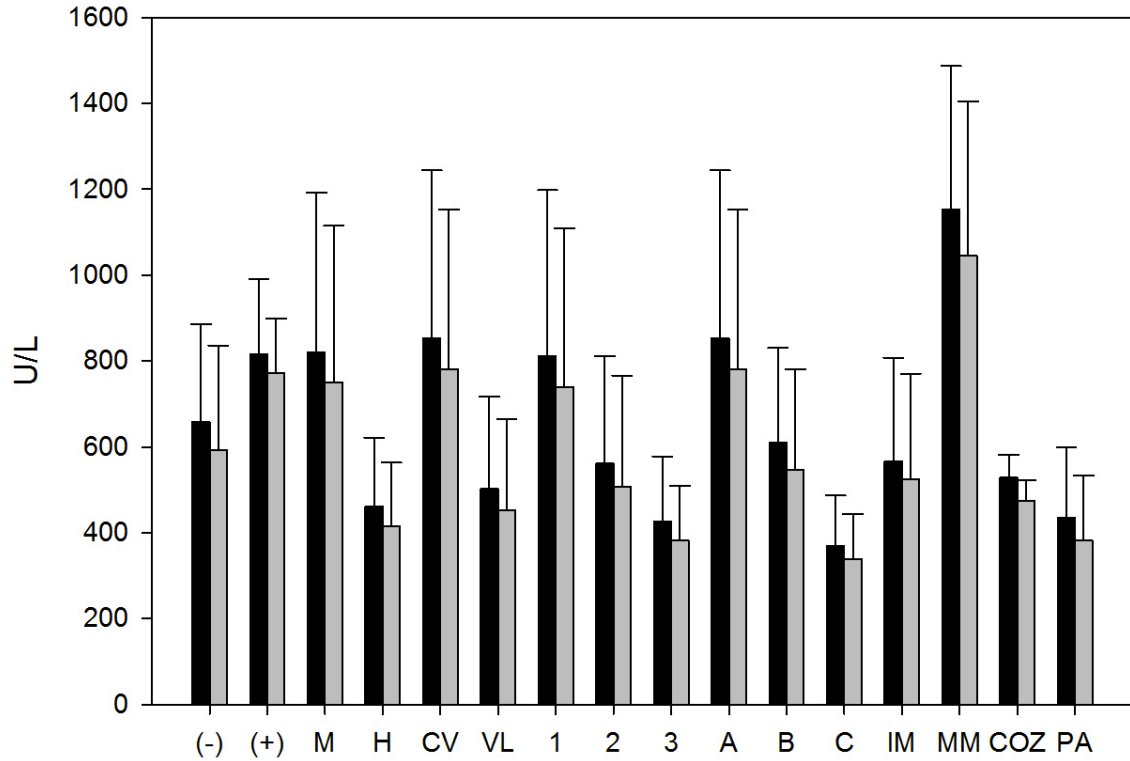


Figura 9: Medias y desviación estándar de los niveles de fosfatasa alcalina (ALP) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura.

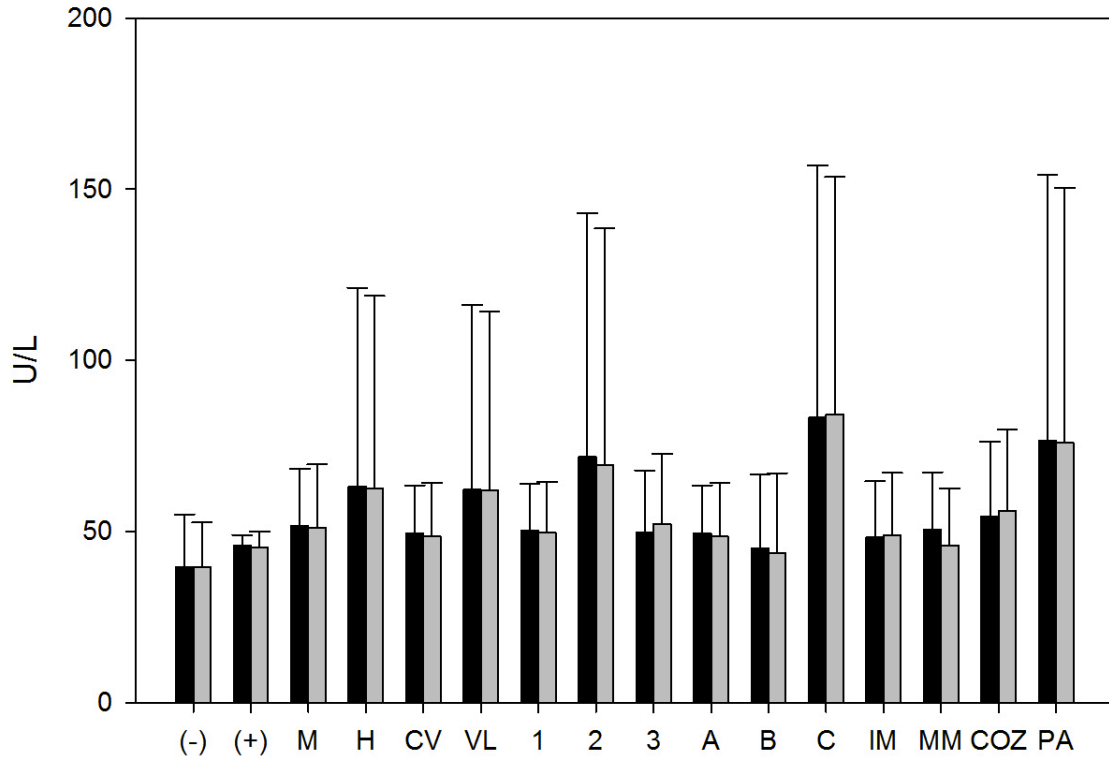


Figura 10: Medias y desviación estándar de los niveles de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel, y (PA) Puerto Aventura.

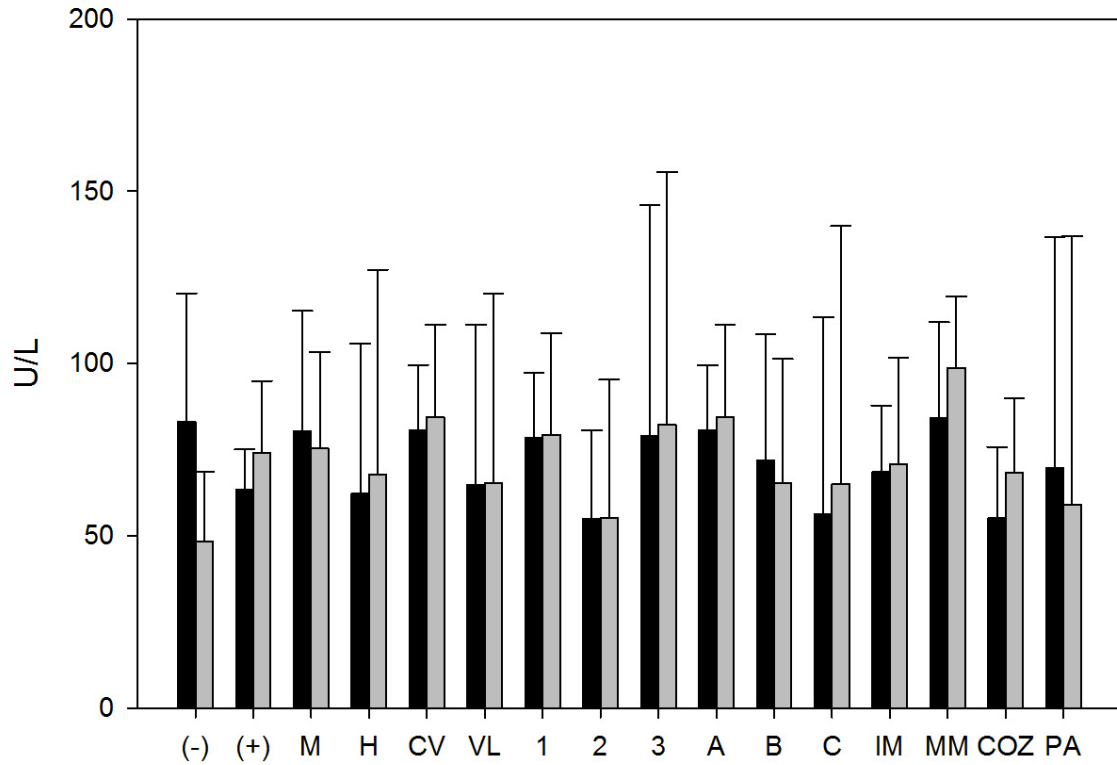


Figura 11: Medias y desviación estándar de los niveles de creatina quinasa (CK) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura.

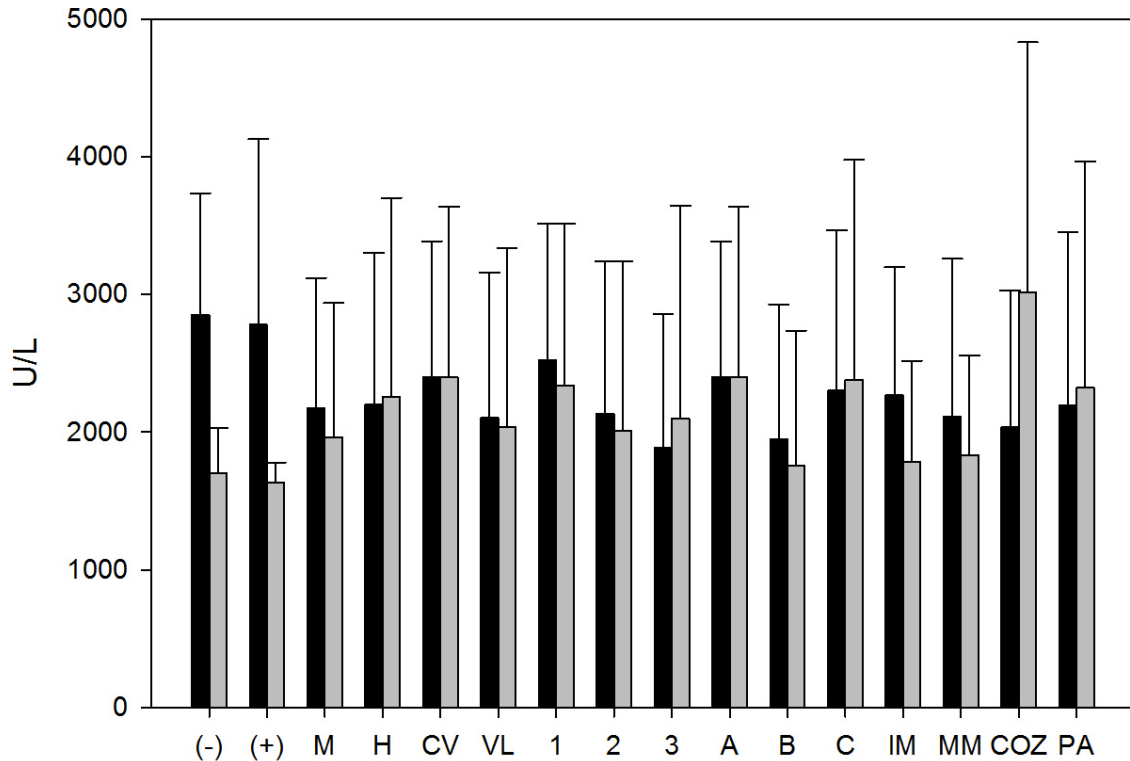


Figura 12: Medias y desviación estándar de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) antes (color negro) y después (color gris) de los programas de nado, analizados por grupos: controles (-) negativo, (+) positivo; sexos (H) hembras, (M) machos; origen, cautiverio (CV), vida libre (VL), tiempo en cautiverio (1) menos de 10 años en cautiverio, (2) entre 10 y 14 años en cautiverio, (3) y más de 15 años en cautiverio; edades (A) de 1 a 9 años, (B) de 10 a 19 años, (C) de 20 años en adelante; y delfinarios (IM) Isla Mujeres, (MM) Maroma, (COZ) Cozumel y (PA) Puerto Aventura.

Aunque en la mayoría de los niveles de las diferentes enzimas se observa una tendencia a disminuir después de los programas de nado, al realizar la prueba *t* Student solo se encontraron diferencias significativas en el grupo de delfinarios en Cozumel en la enzima hepática de fosfatasa alcalina (ALPK), entre antes y después del programa de nado con un valor de $p=0.01$. No se encontraron diferencias significativas en los demás grupos, ni en las demás enzimas ($p > 0.05$).

4. 6. 3 Niveles de cortisol en suero

Las concentraciones de suero de *T. truncatus* obtenidos fueron comparados con una prueba *t* Student para buscar diferencias significativas entre el antes y el después de los programas de nado, en los grupos de interés. La muestra de Morelos se eliminó de este estudio por ser un valor extremo.

Tabla 6: Prueba *t*-Student de los niveles de cortisol sanguíneo, comparación de medias antes vs. después de los programas de nado.

		Media Antes del Programa	Media Después del Programa	t-value	p
Control -		1.03 ± 0.23	0.93 ± 0.15	0.63	0.57
Control +		1.23 ± 0.06	1.17 ± 0.12	0.89	0.42
Sexo	Machos	3.34 ± 2.60	1.28 ± 0.62	2.32	0.03
	Hembras	1.79 ± 1.48	1.39 ± 1.16	0.85	0.40
Origen	Vida Libre	2.05 ± 1.47	1.36 ± 1.08	1.61	0.12
	Cautiverio	4.30 ± 4.42	1.61 ± 1.06	1.67	0.12
Edad	1 a 9 años	3.11 ± 3.12	1.32 ± 0.75	1.47	0.17
	10 a 19 años	1.68 ± 1.15	1.01 ± 0.63	1.53	0.15
	20 años o más	2.42 ± 1.73	1.70 ± 1.35	0.99	0.34
Delinario	COZ	1.37 ± 0.75	1.00 ± 1.39	0.40	0.71
	IM	2.77 ± 2.16	1.43 ± 0.82	1.83	0.08
	MM	4.60 ± 4.67	1.55 ± 1.06	0.90	0.46
	PA	1.91 ± 1.55	1.37 ± 1.30	0.71	0.49
Tiempo en cautiverio	menos de 10 años	2.78 ± 1.27	1.08 ± 0.69	1.34	0.2
	de 10 a 14 años	1.52 ± 0.94	1.13 ± 0.71	1.04	0.31
	15 o más años	3.00 ± 1.56	1.85 ± 0.35	1.57	0.13

Al hacer el análisis por grupos se observa que los nacidos en cautiverio y los delfines de la instalación Maroma presentan valores más altos a los rangos de referencia (Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003), sin embargo disminuyen después del programa de nado. Al realizar la prueba *t* de Student, sólo se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de cortisol entre antes y después de los programas de nado en el caso de los machos $p=0.03$.

Capítulo 5

Discusión

5.1 Calidad del agua

En el caso de los mamíferos marinos es muy importante tomar en cuenta la calidad del agua para mantener su salud y bienestar (Dierauf y Gulland, 2001). En México la NOM-135-SEMARNAT (DOF, 2004) regula la captura, manejo, mantenimiento y transporte de los mamíferos marinos. En esta norma se especifican las diferencias entre un encierro de tipo abierto (confinamiento en su medio natural con intercambio de agua natural por mareas o corrientes) y uno de tipo cerrado (confinamiento con temperatura ambiental controlada y calidad del agua regulada por recambios o filtros), así como los diferentes parámetros que deben de tomar en cuenta para cada uno de los tipos de encierros.

Para los encierros de tipo abierto se debe de medir quincenalmente las bacterias coliformes y estas no deben de sobrepasar las 1000 NMP por cada 100ml de agua, además de hacer un registro anual de las temperaturas registradas. Mientras que en las instalaciones cerradas se debe de medir las bacterias coliformes, salinidad (18 a 36ppm), pH (6 a 8) y temperatura (14 a 27 °C) con un monitoreo de tres veces por día.

Según los datos obtenidos en los diferentes delfinarios, solo MM presenta una elevación de la temperatura a lo establecido en la NOM-135 (DOF, 2004), pero cumple con los demás parámetros. La temperatura de MM puede no ser un factor de estrés para *T. truncatus* ya que es un cetáceo que presenta una amplia distribución, que se encuentra en mares tanto de agua templada (15 °C) como tropicales (25 a 30°C) y tiene una amplia distribución en los mares de México. Se cree que los límites de distribución están directamente relacionados con la capacidad de sobrevivencia de sus presas a estas temperaturas ya que no es un factor limitante para el delfín (Aurioles Gamboa, 1993; Torres, *et al.*, 2005; Pérez, 2006; Meraz y Sánchez Díaz, 2008; Yeates y Houser, 2008).

5.2 Enzimas de daño muscular

Las medias por grupos presentaron niveles bajos en AST, ALT, ALKP, GGT y LDH después de los programas de nado, aunque solo se encontraron en ALKP en COZ diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.01$).

En el caso de CK solo el control negativo, machos, nacidos en vida libre, edades de 10 a 19 años y 20 años en adelante y los delfines del delfinario PA presentaron niveles bajos. Mientras que control positivo, hembras, nacidos en cautiverio, edad de 1 a 9 años y los delfines de COZ, IM y MM presentaron niveles más altos de CK después del programa de nado. Los aumentos que obtuvimos de CK pueden ser por un daño pequeño como la toma de muestra. Ya que esta enzima es mucho más sensible para distinguir daño muscular, puede verse una elevación en los valores por traumatismos pequeños como inyecciones, además presenta un tiempo de vida corto en suero, es por esto que es importante usar enzimas que tengan un tiempo de vida más largo en el suero como son AST, ALT, ALKP o LDH para diagnosticar el daño muscular en mamíferos marinos (Dierauf y Gulland, 2001; Fowler y Miller, 2003; Fauquier, *et al.*, 2008; ST. Aubin *et al.*, 2013). Como en el caso de COZ que presento niveles ligeramente más altos después de los programas de nado en las enzimas AST, ALT, GGT, CK y LDH lo que podría indicar posible daño muscular (ST. Aubin *et al.*, 2013) pero las diferencias no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$).

5.3 Niveles de cortisol

La concentración del cortisol presenta actividad circadiana, obteniendo los valores más altos durante la mañana, estos disminuyen en el transcurso del día y la noche, siendo valores altos otra vez a la mañana siguiente (Suzuki *et al.*, 2003; Funasaka *et al.*, 2011). Es por esto que se presentaron valores más altos antes de los programas de nado, ya que las muestras se obtuvieron al iniciar el día.

Al hacer el análisis por grupos los nacidos en cautiverio y los delfines de la instalación MM presentaron valores altos a los niveles de cortisol de referencia (0.4 a 3.6 $\mu\text{g}/\text{dL}$) para delfines en cautiverio reportados en la literatura (ST. Aubin, *et al.*, 1996; Dierauf y Gulland, 2001; Luna *et al.*, 2012).

Los delfines nacidos en cautiverio presentaron niveles más altos a diferencia de los nacidos en vida libre que presentan valores dentro de rango aceptado. Se ha reportado que los delfines de vida libre suelen presentar niveles más altos de cortisol que los delfines en cautiverio, ya que los primeros viven constante situaciones de estrés, por depredadores, búsqueda de alimento, degradación de su ambiente y el ruido ocasionado por el tráfico marítimo (ST. Aubin *et al.*, 1996; Fair y Becker, 2000; Wright *et al.*, 2007).

Los delfines de la instalación MM presentaron niveles altos de cortisol, se ha reportado que los delfines en instalaciones cerradas presentan valores más altos que los delfines en instalaciones abiertas. (Ugaz, 2009; Luna *et al.*, 2012).

Todos presentaron valores más bajos después de los programas de nado, aunque sólo los machos presentaron diferencias significativas ($p=0.03$). Los programas de nado no parecen haber ocasionado estrés en los delfines en cautiverio (Shepherdson, 2003; Claxton, 2011; Delfour y Beyer, 2012).

Capítulo 6

Conclusiones

Los delfinarios donde se realizó el estudio cumplen con lo establecido en la NOM-135 SEMARNAT, a excepción de la temperatura de MM, pero esta no parece ser un factor de estrés para *T. truncatus*.

Los niveles de cortisol del delfinario MM presento valores más altos a los establecidos en los rangos de referencia, este aumento puede deberse al tipo de encierro. Se observó una tendencia a disminuir los valores de cortisol después de los programas de nado, por lo que no indican un daño por estrés.

En los análisis realizados en este trabajo no se encontraron evidencias de que los programas de nado con delfines que plantea Dolphin Discovery ocasionen daño muscular ni estrés en sus delfines.

.

Capítulo 7

Perspectivas

Falta realizar más estudios para poder evaluar el efecto de los programas de nado sobre el bienestar de los delfines *T. truncatus* en cautiverio como:

- Aumentar el número de muestreos y organismos por instalación.
- Estudios etológicos para poder comparar el comportamiento con los valores fisiológicos.
- Determinar los valores de ácidos láctico e isoenzimas para determinar si existe daño muscular.
- Técnicas más sensibles como la cuantificación de la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune al estrés, a través de la técnica de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).

Referencias:

- Alaniz, Y. (2010). Reporte sobre Delfines Cautivos. Sociedad Mundial para la Protección Animal (WSPA). p. 33.
- Auriolles, D. (1993). Biodiversidad y estado actual de los mamíferos marinos en México. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 44 (1), 397–412.
- Brando, S. I. (2010). Advances in Husbandry Training in Marine Mammal Care Programs. *International Journal of Comparative Psychology*. 23 (4), 777–791.
- Brousset, D. M., Galindo, F. M., Valdez, R. A., Romano, M., y Schuneman, A. (2005). Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Revista Veterinaria de México*. 36 (3), 325–337.
- Castillo-Guevara, C., Unda-Harp, K., Lara, C. y Serio-Silva, J. C. (2012). Enriquecimiento ambiental y su efecto en la exhibición de comportamientos estereotipados en jaguares (*Panthera onca*) del parque zoológico “Yaguar Xoo”, Oaxaca. *Acta Zoológica Mexicana.*, 28 (2), 365–377.
- CITES. (2013). Apéndices I, II y III (Vol. 41). Suiza. p. 47. Recuperado de: <http://www.cites.org>
- 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), 1–10.
- Curtin, S., y Wilkes, K. (2007). Swimming with Captive Dolphins : A phenomenological exploration of tourist recollections. *International Journal of Tourism Research*. 8 (4), 131–146.
- Delfour, F. (2010). Marine Mammals Enact Individual Worlds, *International Journal of Comparative Psychology*. 23 (4), 792–810.
- Delfour, F., y Beyer, H. (2012). Assessing the effectiveness of environmental enrichment in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Zoo Biology*, 31 (2), 137–50.
- Díaz, B., y Bernal, J. A. (2008). Marine aquaculture and bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) social structure. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62 (6), 887–894.
- Díaz, R. E. (2003). Diferenciación entre tursiones *Tursiops truncatus* costeros y oceanicos en el golfo de California por medio de isótops estables de carbono y nitrógeno. (Tesis de Doctorado) Centro interdisciplinario de ciencias marinas, IPN. p.64.

- Dickens, M. J., Delehanty, D. J., y Michael Romero, L. (2010). Stress: An inevitable component of animal translocation. *Biological Conservation*, 143 (6), 1329–1341.
- Dierauf, L. A., y Gulland, F. M. D. (2001). *CRC handbook of marine mammal medicine* (2nd ed.). Estados Unidos: CRC Press LLC. p. 1116
- Dwyer, L. A. (2000). Performance of IDEXX VetTest Chemistry Analyzer. IDEXX Laboratories, Inc. pp. 6.
- Esch, H. C., Sayigh, L. S., Blum, J. E., y Wells, R. S. (2009). Whistles as potential indicators of stress in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Mammalogy*, 90 (3), 638–650.
- Fair, P. A., y Becker, P. R. (2000). Review of stress in marine mammals. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 7 (4), 335–354.
- 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), 1–5.
- Fowler, M., y Miller, E. R. (2003). *Zoo and wild animal medicine* (5th ed.). Saunders, St. Louis, MO: Elsevier.p. 992
- Funasaka, N., Yoshioka, M., Suzuki, M., Ueda, K., Miyahara, H., y Uchida, S. (2011). Seasonal difference of diurnal variations in serum melatonin, cortisol, testosterone, and rectal temperature in Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Aquatic Mammals*, 37 (4), 433–442.
- Geraci, J. R., y ST. Aubin, D. J. (1979). Tissue sources and diagnostic value of circulating enzymes in cetaceans. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 36 (2), 158-163.
- Google earth. (2013). Image Landsat, INEGI, SIO Data, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO. Recuperado de: <https://www.google.com/maps/@20.21207,-87.82094,370860m/data=!3m1!1e3>
- Gómez, G. B., y Escobar, A. (2006). Estrés y sistema inmune. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 7 (1), 30–38.
- Hall, A. J., Wells, R. S., Sweeney, J. C., Townsend, F. I., Balmer, B. C., Hohn, A. A, y Rhinehart, H. L. (2007). Annual, seasonal and individual variation in hematology and clinical blood chemistry profiles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, Florida. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 148 (2), 266–77.
- Hammond, P. S., Bearzi, G., Bjorge, A., Formey, K., Karkzmarski, L., Kasuya, T., y Wilson, B. (2012). *Tursiops truncatus* in IUCN. *IUCN Red List of threatened species*. Recuperado de: www.iucnredlist.org

- Hoy, J. M., Murray, P. J., y Tribe, A. (2010). Thirty years later: enrichment practices for captive mammals. *Zoo Biology*, 29 (3), 303–16.
- Hunter, S. A., Bay, M. S., Martin, M. L., y Hatfield, J. S. (2002). Behavioral effects of environmental enrichment on harbor seals (*Phoca vitulina concolor*) and gray seals (*Halichoerus grypus*). *Zoo Biology*, 21 (4), 375–387.
- Itou, T., Yoshida, Y., Shoji, Y., Sugisawa, H., Endo, T., y Sakai, T. (2003). Molecular cloning and expression of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) interleukin-8. *The Journal of Veterinary Medical Science /The Japanese Society of Veterinary Science*, 65 (12), 1351–4.
- Jefferson, T. A., Leatherwood, S., y Webber, M. A. (1993). *FAO species identification guide marine mammals of the world*. (1ªed.) Italia, Roma: United nations environment programme FAO.p. 320
- Kershaw, J. L., Ramp, C. A., Moss, S., y Hall, A. J. (2013). Blubber cortisol levels in a baleen whale (*Megaptera novaeangliae*) and a phocid seal (*Phoca vitulina*). In *International association for aquatic animal medicine. 44th Annual IAAAM Conference*
- Klinger, J. C., Herrera, J. A., Díaz, M. L., Jhann, A. A., Ávila, G. I., y Tobar, C. I. (2005). La psiconeuroinmunología en el proceso salud enfermedad. *Colombia Médica*, 36 (2), 120–129.
- Luna, B. A., Valdez, P. R., Romano, P. M., y Galindo, M. F. (2012). Comportamiento de mantenimiento y niveles de cortisol de toninas (*Tursiops truncatus*) en instalaciones cerradas y abiertas. *Veterinaria México*, 43 (2), 103–112.
- Mancia, a, Warr, G. W., y Chapman, R. W. (2008). A transcriptomic analysis of the stress induced by capture-release health assessment studies in wild dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology*, 17(11), 2581–2589.
- Marino, L. (2011). *Dolphin Assisted Therapy : From Ancient Myth to Modern Snake Oil*. *Phi Kappa Phi Forum*, 91 (I: Spring) 4–6.
- Mayer, S. (1998). *A Review of the Scientific Justification for Maintaining Cetaceans in Captivity*. *A Report of Whale and Dolphin Conservation Society*. p. 46.
- Meraz, J., y Sánchez Díaz, V. M. (2008). Los mamíferos marinos en la costa central de Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79 (1), 143–151.
- Moscoso, M. S. (2009). De la mente a la célula: impacto del estrés en psiconeuroinmunoendocrinología. *Liberabit*, 15 (2), 143–152.
- Niño, C. A., Urbán, J., y Vidal, O. (2011). *Mamíferos Marinos del Golfo de California* (1ª ed.). México: Alianza WWF México-Telcel.p. 192

- NOM-059-SEMARNAT. (2010). Protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio de lista de especies en riesgo. México: Diario Oficial de la Federación 30 de Diciembre de 2010.
- 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.
- Pérez, H. (2006). Comparación de las poblaciones de toninas, *Tursiops truncatus*, en Navachiste, Sin. y Bahía Magdalena, B.C.S. con fines de manejo. (Tesis de Doctorado). Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. IPN. p.131
- Ruiz Ramos, D. E., y Díaz Castillo, I. E. (2008). Enriquecimiento ambiental de nutria marina (*Lontra felina*) en el parque zoológico Huachipa entre febrero y marzo del 2007. *Ecología Aplicada.*, 7, (1–2) 49-54.
- Salinas, M. A. (2005). Ecología de los tursiones, *Tursiops truncatus*, en la Bahía de La Paz, BCS. (Tesis de Doctorado). Centro interdisciplinario de ciencias marinas, INP. p.104
- Sánchez, M., González, R. M., Cos, Y., y Marcías, C. (2007). Estrés y sistema inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 23 (2), 1–7.
- Sapoznikow, A., Sessa, G., Mansur, L., y De la Reta, M. (2000). Mamíferos Marinos (1ª ed.). Argentina: Fundación Patagonia Natural. p. 48
- Schmitt, T. L., St. Aubin, D. J., Schaefer, A. M., y Dunn, J. L. (2010). Baseline, diurnal variations, and stress-induced changes of stress hormones in three captive beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Marine Mammal Science*, 26 (3), 635–647.
- Selye, H. (1973). The evolution of the stress concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *American Scientist*, 61 (6), 692–699.
- Shepherdson, D. J. (2003). Environmental enrichment: past, present and future. *International Zoo Yearbook*, 38 (1), 118–124.
- Shepherdson, D. J., Mellen, J. D., y Hutchins, M. H. (1999). Second nature: Environmental Enrichment for Captive Animals. *Zoo and aquarium biology and conservation series* (2ª ed.). Smithsonian Institution press. p. 350
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., y Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166 (4), 869–87.

- Shirihai, H., y Jarrett, B. (2006). Whales, dolphins and seals. A field guide to the marine mammals of the world. (1^a ed.) A & C Black. p. 384.
- ST. Aubin, D. J., Ridgway, S. H., Wells, R. S., y Rhinehart, H. (1996). Dolphin thyroid and adrenal hormones : circulating levels in wild and semidomesticated *Tursiops truncatus*, and influence of sex, age and season. *Marine Mammal Science*, 12 (1), 1–13.
- ST. Aubin, D. J., Forney, K. A., Chivers, S. J., Scott, M. D., Romano, T. A., Wells, R. S., Gulland, F. M. D. (2013). Hematological, serum, and plasma chemical constituents in pantropical spotted dolphins (*Stenella attenuata*) following chase, encirclement, and tagging. *Marine Mammal Science*. 29 (1), 14-35.
- Suzuki, M., Uchida, S., Ueda, K., Tobayama, 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 (3), 427–433.
- Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W., & Campbell, T. W. (2012). *Veterinary hematology and clinical chemistry* (2nd ed.). Oxford: Wiley-Blackwell. p. 776
- Torres, L. G., McLellan, W. A., Meagher, E. R. I., y Pabst, D. A. (2005). Seasonal distribution and relative abundance of bottlenose dolphins , *Tursiops truncatus*, along the US mid-Atlantic Coast. *Journal of Cetacean Research and Management*, 7 (2), 153–161.
- Trujillo, F., Rodríguez, J. V., Díaz, M. C., Tirira, D., y González, A. (2005). *Mamíferos acuáticos y relacionados con el agua neotropicales*. (1^a ed.). Colombia, Bogotá: Conservación Internacional. p. 178
- Ugaz, C. (2009) Comportamiento social e individual de un grupo de toninas (*Tursiops truncatus*) en instalaciones abiertas y cerradas. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México. p.110
- Verme, V., y Iannaccone, J. (2012). Estructura social del delfín nariz de botella *Tursiops truncatus* (Cetacea:delphinidae) en la costa suroeste de la isla de Tenerife (Islas Canarias), España. *Ecología Aplicada*, 11 (2), 67–76.
- Waples, K. A., y Gales, N. J. (2002). Evaluating and minimising social stress in the care of captive bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Zoo Biology*, 21 (1), 5–26.
- Weiss, D. J., y Wardrop, J. K. (2010). *Veterinary Hematology* (6^a ed.). Iowa, USA: Wiley-Blackwell. p. 1232
- Williamson, C. (2008). Dolphin Assisted Therapy: can swimming with dolphins be a suitable treatment? *Developmental Medicine and Child Neurology*, 50 (6), 477-477.

- Wright, A. J., Soto, N. A., Baldwin, A. L., Bateson, M., Beale, C. M., Clark, C., Notarbartolo di sciara, G. y Martin, V. (2007). Do Marine mammals experience stress related to anthropogenic noise? *International Journal of Comparative Psychology*, 20 (2), 274–316.
- Yeates, L. C., y Houser, D. S. (2008). Thermal tolerance in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *The Journal of Experimental Biology*, 211 (20), 3249–57.

Anexo 2

Tabla 8: Comparación de las enzimas hepáticas entre antes y después de los programas de nado.

			Media Antes del Programa	Media Después del Programa	t-value	p
Control -	AST		468.66 ± 67.87	440.00 ± 8.00	0.73	0.51
	ALT		70.66 ± 10.2	73.00 ± 4.58	-0.37	0.73
	ALKP		657.00 ± 228.87	592.67 ± 243.11	0.33	0.76
	GGT		39.67 ± 15.31	39.67 ± 13.01	0.00	1.00
	CK		83.00 ± 37.32	48.33 ± 20.33	1.41	0.23
	LDH		2850.00 ± 884.54	1702.33 ± 325.49	2.11	0.10
Control +	AST		416.33 ± 22.03	420.67 ± 28.57	-0.21	0.85
	ALT		82.67 ± 15.01	85.67 ± 6.66	-0.32	0.77
	ALKP		816.00 ± 174.76	771.00 ± 127.80	0.36	0.74
	GGT		46.00 ± 3.00	45.33 ± 4.62	0.21	0.84
	CK		63.33 ± 11.72	74.00 ± 20.88	-0.77	0.48
	LDH		2778.00 ± 1348.14	1629.33 ± 149.26	1.47	0.22
Sexo	Machos	AST	397.33 ± 113.33	373.00 ± 95.19	0.49	0.62
		ALT	81.00 ± 13.01	73.22 ± 15.27	1.16	0.26
		ALKP	771.44 ± 335.41	692.22 ± 300.77	0.52	0.60
		GGT	51.00 ± 15.12	50.44 ± 17.09	0.07	0.94
		CK	77.44 ± 36.16	69.77 ± 27.49	0.50	0.61
		LDH	2038.40 ± 885.22	1699.10 ± 453.25	1.08	0.29
	Hembras	AST	511.56 ± 296.33	483.31 ± 233.85	0.30	0.77
		ALT	95.50 ± 34.37	93.75 ± 27.70	0.16	0.88
		ALKP	455.31 ± 132.85	410.88 ± 130.37	0.96	0.35
		GGT	65.44 ± 59.73	64.69 ± 57.75	0.04	0.97
		CK	60.88 ± 44.11	64.56 ± 61.23	-0.20	0.85
		LDH	2427.18 ± 1292.28	2298.56 ± 1481.06	0.26	0.80
Origen	Vida Libre	AST	463.94 ± 291.54	437.50 ± 232.31	0.30	0.77
		ALT	88.89 ± 32.91	85.05 ± 29.13	0.37	0.71
		ALKP	493.167 ± 207.25	446.44 ± 209.96	0.67	0.51
		GGT	63.56 ± 56.75	62.94 ± 54.98	0.03	0.97
		CK	63.67 ± 48.35	60.89 ± 57.52	0.16	0.88
		LDH	2225.22 ± 1237.54	1922.17 ± 1211.58	0.74	0.46
	cautiverio	AST	469.125 ± 96.84	442.25 ± 92.02	0.57	0.58
		ALT	90.13 ± 19.02	85.12 ± 18.68	0.53	0.60
		ALKP	852.25 ± 391.21	780.88 ± 371.21	0.37	0.71
		GGT	49.37 ± 14.14	48.50 ± 15.72	0.12	0.91
		CK	75.00 ± 11.77	80.71 ± 26.50	-0.52	0.61
		LDH	2395.62 ± 988.22	2396.12 ± 1240.07	0.01	0.99
Edad	1 a 9 años	AST	469.13 ± 96.84	442.25 ± 92.02	0.57	0.58
		ALT	90.13 ± 19.02	85.12 ± 18.68	0.53	0.60
		ALKP	852.25 ± 391.21	780.87 ± 371.21	0.37	0.71
		GGT	49.38 ± 14.14	48.50 ± 15.72	0.12	0.91
		CK	80.50 ± 19.00	84.50 ± 26.77	-0.34	0.74
		LDH	2395.63 ± 988.22	2396.12 ± 1240.07	0.00	1.00
	10 a 19 años	AST	353.89 ± 139.16	343.89 ± 136.50	0.15	0.88
		ALT	72.22 ± 17.19	69.78 ± 20.83	0.27	0.79
		ALKP	592.33 ± 236.28	531.11 ± 258.10	0.52	0.61
		GGT	42.00 ± 21.18	40.44 ± 22.85	0.15	0.88
		CK	70.44 ± 40.56	54.67 ± 38.62	0.85	0.41
		LDH	1805.22 ± 935.19	1459.67 ± 309.45	1.05	0.31
	20 años o más	AST	574.00 ± 366.05	531.11 ± 276.28	0.28	0.78
		ALT	105.56 ± 37.16	100.33 ± 29.06	0.33	0.74
		ALKP	394.00 ± 115.39	361.78 ± 104.55	0.62	0.54
		GGT	85.11 ± 73.13	85.44 ± 69.00	-0.01	0.99
		CK	56.89 ± 56.75	67.11 ± 73.84	-0.33	0.75
		LDH	2645.22 ± 1408.18	2384.67 ± 1594.46	0.37	0.72

Continuación: Comparación de las enzimas hepáticas entre antes y después de los programas de nado.

			Media Antes del Programa	Media Después del Programa	t-value	p
Delfinario	COZ	AST	364.33 ± 92.58	368.33 ± 78.50	-0.06	0.96
		ALT	80.67 ± 26.08	90.33 ± 12.66	-0.58	0.59
		ALKP	502.00 ± 13.23	451.33 ± 12.01	4.91	0.01
		GGT	47.33 ± 20.03	49.00 ± 23.64	-0.09	0.93
		CK	51.33 ± 23.25	61.00 ± 19.67	-0.55	0.61
		LDH	1549.33 ± 226.32	2490.33 ± 1810.29	-0.89	0.42
	IM	AST	412.90 ± 102.56	398.80 ± 107.90	0.30	0.77
		ALT	82.10 ± 22.34	83.10 ± 18.89	-0.11	0.92
		ALKP	566.80 ± 223.68	530.90 ± 236.06	0.35	0.73
		GGT	50.70 ± 18.66	50.70 ± 20.21	0.00	1.00
		CK	67.10 ± 17.62	68.60 ± 26.53	-0.15	0.88
		LDH	2640.20 ± 1210.81	1808.30 ± 766.83	1.84	0.08
	MM	AST	447.00 ± 152.45	399.00 ± 122.23	0.43	0.69
		ALT	78.00 ± 17.06	70.66 ± 20.40	0.48	0.66
		ALKP	1120.33 ± 399.13	1038.33 ± 440.50	0.24	0.82
		GGT	43.00 ± 9.17	38.00 ± 5.57	0.81	0.46
		CK	91.00 ± 29.61	101.67 ± 24.38	-0.48	0.66
		LDH	1545.67 ± 302.66	1486.67 ± 245.87	0.26	0.81
	PA	AST	432.86 ± 237.75	430.28 ± 204.05	0.02	0.98
		ALT	91.00 ± 32.67	72.86 ± 24.67	1.17	0.26
		ALKP	472.86 ± 167.32	413.71 ± 156.84	0.68	0.51
GGT		44.43 ± 21.52	45.28 ± 24.71	-0.07	0.95	
CK		83.71 ± 70.27	69.28 ± 87.09	0.34	0.74	
LDH		1799.14 ± 1121.92	2090.86 ± 1700.04	-0.38	0.71	
tiempo en cautiverio	menos de 10 años	AST	472.42 ± 92.21	451.57 ± 86.30	0.44	0.67
		ALT	93.71 ± 17.12	84.71 ± 15.18	1.04	0.32
		ALKP	653.28 ± 257.04	587.28 ± 214.39	0.52	0.61
		GGT	49.57 ± 10.39	49.14 ± 13.43	0.07	0.95
		CK	74.71 ± 12.10	73.28 ± 30.45	0.12	0.91
		LDH	2506.14 ± 903.04	2399.71 ± 1275.91	0.18	0.86
	de 10 a 14 años	AST	491.60 ± 364.28	443.10 ± 273.11	0.34	0.74
		ALT	86.31 ± 36.26	89.31 ± 35.37	-0.19	0.85
		ALKP	603.30 ± 339.93	542.30 ± 321.86	0.41	0.69
		GGT	74.40 ± 47.39	71.62 ± 27.04	0.09	0.93
		CK	51.21 ± 24.04	47.11 ± 14.08	0.28	0.78
		LDH	2212.3 ± 1193.91	1877.8 ± 994.71	0.68	0.50
	15 o más años	AST	442.25 ± 184.72	437.25 ± 187.49	0.05	0.96
		ALT	92.25 ± 30.27	84.12 ± 0.73	0.63	0.54
		ALKP	452.75 ± 138.56	408.75 ± 114.80	0.69	0.50
		GGT	51.87 ± 19.93	53.62 ± 21.51	-0.17	0.87
		CK	79.50 ± 60.53	84.62 ± 61.41	-0.15	0.88
		LDH	2277.62 ± 1414.63	2101 ± 1543.40	0.24	0.82