



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Maestría en Conservación de la Biodiversidad.**

TESIS

Descripción del perfil reproductivo de hembras de manatí antillano *Trichechus manatus manatus* mediante monitoreo no invasivo de esteroides E2 y P4 en heces.

Tesis presentada para optar al título de Magíster de La Universidad de Buenos Aires en
Conservación de la Biodiversidad.

Fecha de defensa: diciembre 3 del 2024.

Presentada por:

Vanessa Bermúdez Cardona *Vanessa B.*

Directora:

Dra. Nataly Castelblanco Martínez *Nataly*

Codirector:

José Antonio Sandoval Zárate *Sandoval*

Tutora:

Dra. Bettina Mahler *B. Mahler*

**México
2024**

*A mi hermosa madre Donelia, tía Lucy y tío Juan, y Marce.
A mi increíble hermana, Adriana.
Y a mi padre, Alonso, que está en el cielo*

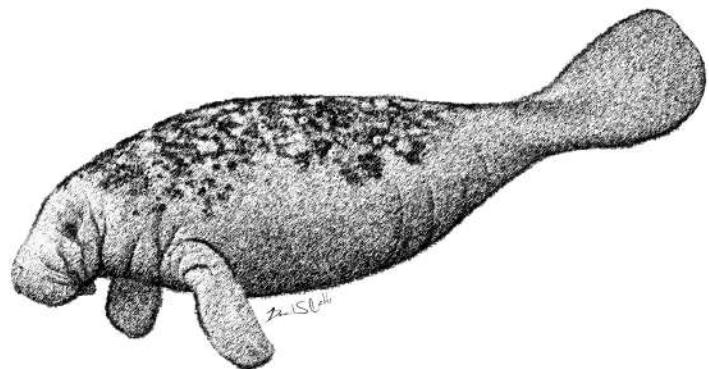


TABLA DE CONTENIDO

I. AGRADECIMIENTOS	7
II. RESUMEN	8
III. ABSTRACT	9
IV. INTRODUCCIÓN	10
V. MARCO TEORICO	12
5.1. Taxonomía	12
5.2. Distribución	12
5.3. Comportamiento	13
5.4. Madurez sexual	14
5.5. Fisiología y morfología reproductiva	14
5.6. Bases endocrinológicas	16
5.7. Tasa de pasaje digestivo	18
5.8. Problema	18
VI. OBJETIVOS	21
6.1. General	21
6.2. Específicos	21
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Área de estudio	22
7.2. Medición de la temperatura del agua	22
7.3. Obtención de muestras	22
7.4. Proceso de cuantificación hormonal	23
7.5. Extracción esteroideos	24
7.6. Factor de dilución de las muestras para la cuantificación hormonal	25
7.6.1. Preparación de la curva estándar para progesterona (P4) y estradiol (E2)	25
7.7. Ensayos inmunoenzimáticos para la cuantificación de hormonas esteroideas	27
7.7.1. Validación de los ensayos inmunoenzimáticos para las hormonas esteroideas	28
7.7.2. Variación de ensayo	29
7.7.3. Prueba de especificidad	29
7.8. Análisis estadísticos:	30
VIII. RESULTADOS	31
IX. DISCUSIÓN	38
9.1. Monitoreo hormonal no invasivo	38
9.2. Madurez sexual	40
9.3. Fisiología reproductiva y comportamiento	40

9.4.	Estacionalidad reproductiva	41
9.5.	Otros factores asociados a la reproducción	42
9.6.	Duración del ciclo estral	42
X.	<i>CONCLUSIONES</i>	44
	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución actual de los manatíes en México (Elaborado por SEMARNAT, 2020).....	12
Figura 2. Esquema representativo del sistema reproductivo de hembras de manatí (<i>Trichechus manatus</i>)	16
Figura 3. Toma de muestras de materia fecal mediante condicionamiento operante. Foto: créditos Vanessa Bermúdez Cardona.....	23
Figura 4. Proceso de preparación de extracción de esteroides a partir de muestras fecales para análisis hormonal.....	24
Figura 5. Esquema para la preparación para la curva estándar de calibración (CE) para Progesterona (P4).	25
Figura 6. Esquema para la preparación para la curva estándar de calibración (CE) para Estradiol (E2).	26
Figura 7. Esquema representativo placa de tiras de 96 pocillos donde se ubican: la unión no específica (UNE), solución de unión máxima (BO), la curva estándar de calibración (CE) y las muestras (M) para posteriormente ser leídas por el lector de placas y determinar las concentraciones de progesterona (P4) y estradiol (E2).....	27
Figura 8. Esquema representativo de preparación de las muestras para agregar en la placa de 96 pocillos.	28
Figura 9. Gráficas de densidad de Kernel: se presentan para las 100 pseudoreplicas de las pruebas de correlación. Las curvas en azul corresponden a Spearman y las curvas en rojo a Kendall. El eje x muestra la distribución de frecuencia de los valores p.	33
Figura 10. Distribución de datos de densidad de Estradiol y Progesterona en hembras de manatí antillano bajo cuidado profesional. Se observa que los valores de densidad de Estradiol se organizan de manera levemente asimétrica, mientras que los de Progesterona presentan una leve asimetría a la derecha, por lo cual, no cumplen con el supuesto de normalidad.	34
Figura 11. En el Box-plot se observa que no hay una posible diferencia significativa en las medias de las concentraciones de los esteroides evaluados entre individuos en hembras de manatí antillano bajo cuidado profesional.....	35
Figura 12. Representación grafica de los patrones hormonales de progesterona (P4) y estradiol (E2) en hembras puberes (Julieta y Dorothy) y prepúberes (Michellin y Sasil).	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Identificación y edades de las hembras de manatíes muestreadas durante este estudio.....	22
Tabla 2. Valores de especificidad del kit de inmunoensayo (ELISA) con número de catalogo: K025-H1/H5 reportada por el fabricante.....	29
Tabla 3. Valores de especificidad del kit de inmunoensayo (ELISA) con número de catalogo K030-H1/H5	29
Tabla 4. Cantidad de muestras fecales recolectadas por cada hembra de manatí antillano.....	31
Tabla 5. Concentraciones hormonales de progesterona (P4) y estradiol (E2), valores máximos y mínimos de cada ejemplar estudiado. Los valores máximos y mínimos en el conjunto de individuos se encuentran señalados en el recuadro rojo.....	32
Tabla 6. Comparación por pares entre las correlaciones (ρ = Spearman y τ = Kendall) hormonales de las hembras prepúberes (Sasil y Michelin) y puberes (Dorothy y Julieta).....	32
Tabla 7. Coeficientes de correlación (ρ = Spearman y τ = Kendall) entre la hormona P4 y E2 para cada individuo.	36
Tabla 8. Concentraciones hormonales de Sirenas en diferentes matrices de monitoreo.	39
Tabla suplementaria 1 Concentraciones metabolitos hormonales de E2 en heces ng/g en hembras de manatí <i>Trichechus manatus manatus</i> bajo cuidado profesional.....	50
Tabla suplementaria 2 Concentraciones de metabolitos esteroidales de P4 en heces ng/g en hembras de manatí <i>Trichechus manatus manatus</i> bajo cuidado profesional.....	52
Tabla suplementaria 3 Temperatura del agua mes de octubre, locación Puerto Aventuras, estado de Quintana Roo – México lugar donde se llevó a cabo el estudio.....	54
Tabla suplementaria 4 Temperatura del agua mes de noviembre, locación Puerto Aventuras, estado de Quintana Roo – México lugar donde se llevó a cabo el estudio.....	55

I. AGRADECIMIENTOS

Mi amada familia, quiero expresar mi profundo agradecimiento a cada uno de ustedes por su apoyo incondicional en mi camino para alcanzar mis sueños. A mi madre, mi tía, mi hermana, mi tío y mi prima Marce, gracias por estar siempre allí para apoyarme en todo momento, Aunque mi padre ya no esté con nosotros, su apoyo en este proceso significó mucho para mí.

Quiero agradecer especialmente a mi amiga Isabel, quien me brindó fuerza y confianza en mí misma cuando más lo necesitaba, su apoyo y amistad han sido invaluables. También quiero expresar mi gratitud al grupo Andino, quienes han sido mi apoyo académico y a quienes admiro y amo profundamente. A Fredy, que fue un gran apoyo durante toda mi formación académica, siempre estuvo presente.

A mis maestros y mentores, gracias por su paciencia y dedicación al enseñarme y guiarme en este camino, a mi directora de tesis, la Dra. Nataly y al Dr. José Antonio, por su paciencia y guía, su apoyo ha sido fundamental en mi éxito. También quiero agradecer al Dr. Roberto y la Dra. María Renée por confiar en mí.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos, quienes, a pesar de la distancia, siempre me han brindado ánimos y han sido incondicionales en los momentos difíciles y magníficos de esta aventura. Su amistad significa el mundo para mí.

Una vez más, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a cada uno de ustedes por su apoyo inquebrantable. Sin ustedes, este logro no habría sido posible ¡Gracias de todo corazón!

II. RESUMEN

La investigación endocrinológica reproductiva desempeña un papel importante en el manejo de especies en peligro de extinción. A través de técnicas convencionales y no invasivas, se comprende la naturaleza compleja de los procesos biológicos, reproductivos y comportamentales para crear estrategias efectivas de conservación como programas de reproducción, rehabilitación, reintroducción y manejo de poblaciones silvestres.

En el presente estudio, se aborda de manera integral la biología reproductiva del manatí antillano *Trichechus manatus manatus*, una subespecie en peligro de extinción, utilizando para ello técnicas no invasivas. Se realizó la medición de las concentraciones de metabolitos esteroidales progesterona (P4) y estradiol (E2), a través de muestras fecales, recogidas en manatíes antillanos bajo cuidado profesional, mediante condicionamiento operante. Este enfoque metodológico ofreció una alternativa efectiva y menos invasiva en comparación con los métodos tradicionales, proporcionando datos valiosos sin requerir la manipulación extensiva de los animales.

Mediante este estudio se logró por primera vez aplicar con éxito la evaluación endocrina utilizando la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA). Mediante un kit comercial de la marca DetectX®, se establecieron valores de referencia para estradiol y progesterona en hembras de manatí antillano bajo cuidado profesional. Los resultados obtenidos fueron las concentraciones de P4 con valor máximo de 334,4 ng/g y mínimo de 109,9 ng/g y para E2 un valor máximo de 90,0 ng/g, y mínimo de 12,2 ng/g. Los resultados sugieren una relación inversamente proporcional entre las dos hormonas, reflejando una compleja interacción entre las mismas en el ciclo estral de los manatíes. Sin embargo, también se observó que estas hormonas podrían actuar de forma independiente, lo que indica la existencia de mecanismos hormonales complejos en estos mamíferos marinos. Por otra parte, los resultados obtenidos mostraron similitudes en los patrones hormonales con otras especies del orden Sirenia como *Dugong dugon*, *Trichechus inunguis*, y la subespecie *Trichechus manatus latirostris*.

Otra similitud que se evidenció fueron niveles bajos en las concentraciones hormonales; esta característica es similar en el orden Sirenia, incluso en otras especies como elefantes que comparten parentesco filogenético. Sin embargo, en este estudio no fue posible relacionar las concentraciones hormonales con el estadio reproductivo ya que los valores fueron muy similares entre sí; por lo tanto, este avance metodológico proporciona una base fundamental para futuras investigaciones y para el manejo endocrinológico orientado a la conservación de estos mamíferos marinos.

III. ABSTRACT

Reproductive Profile Description of Antillean Manatee (*Trichechus manatus manatus*) Females Through Non-Invasive Monitoring of Fecal Steroids E2 and P4

Reproductive endocrinological research plays a crucial role in the treatment of endangered species. Through conventional and non-invasive techniques, the complex nature of biological, reproductive, and behavioral processes is understood to create effective conservation strategies such as breeding programs, rehabilitation, reintroduction, and management of wild populations.

In the present study, the reproductive biology of the Antillean manatee, an endangered subspecies, is comprehensively addressed using non-invasive techniques. The measurement of steroid metabolite concentrations, progesterone (P4) and estradiol (E2), was carried out through fecal samples collected from Antillean manatees under professional care using operant conditioning. This methodological approach provided an effective and less invasive alternative compared to traditional methods, yielding valuable data without requiring extensive manipulation of the animals.

This study successfully applied endocrine evaluation using the enzyme immunoassay technique (ELISA) for the first time. Using a commercial DetectX® kit, reference values for estradiol and progesterone in female Antillean manatees under professional care were established. The results showed maximum P4 concentrations of 334,4 ng/g and a minimum of 109,9 ng/g, and for E2, a maximum of 90,0 ng/g and a minimum of 12,2 ng/g. The results suggest an inversely proportional relationship between the two hormones, reflecting a complex interaction in the manatees' estrous cycle. However, it was also observed that these hormones could act independently, indicating the existence of complex hormonal mechanisms in these marine mammals. Moreover, the results showed similarities in hormonal patterns with other species of the Sirenia order such as *Dugong dugon*, *Trichechus inunguis*, and the subspecies *Trichechus manatus latirostris*.

Another similarity observed was the low levels in hormonal concentrations; this characteristic is similar across the Sirenia order, even in other related species such as elephants. However, in this study, it was not possible to correlate hormonal concentrations with the reproductive stage since the values were very similar among them; therefore, this methodological advancement provides a fundamental basis for future research and for the endocrinological management aimed at the conservation of these marine mammals.

IV. INTRODUCCIÓN

La sexta extinción masiva, un fenómeno actual de la crisis de biodiversidad, subraya la importancia de la comprensión detallada de la biología reproductiva para la conservación de especies amenazadas. Este entendimiento es clave no solo para prevenir la extinción de especies, sino también para preservar interacciones ecológicas esenciales que, de perderse, podrían causar un colapso de los ecosistemas (Ceballos et al., 2020).

En respuesta a esta crisis, la implementación de biotecnologías reproductivas, como la criopreservación de gametos, la inseminación artificial, y la fecundación *in vitro*, emergen como alternativas para facilitar la reproducción de especies silvestres (Brown, 2000). Estas técnicas facilitan el manejo de especies, especialmente en casos de comportamientos de apareamiento incompatibles, y ayudan a mantener el flujo genético sin necesidad de extraer individuos de su hábitat natural (Brown, 2000). Adicionalmente, estas tecnologías tienen el potencial de contribuir significativamente en la preservación genética, ya que a partir de ellas se pueden generar bancos genómicos de animales cautivos (Robeck et al., 2004). Estos procedimientos tienen el potencial de funcionar como estrategia para reproducir de forma asistida especies cuyas poblaciones se encuentran decreciendo, y que en vida silvestre enfrentan a desafíos tanto ambientales como antrópicos que afectan su viabilidad. El uso de técnicas reproductivas bajo cuidado profesional ha permitido la producción de animales genéticamente valiosos, que posteriormente son liberados en la naturaleza, contribuyendo así a la conservación de especies en peligro de extinción. La utilización de estas técnicas, en combinación con programas de conservación en el hábitat natural, puede aumentar significativamente las posibilidades de supervivencia de las poblaciones animales y mejorar la diversidad genética (O'Brien & Robeck, 2010). Proyectos de conservación exitosos, como la reintroducción del yaguareté en Iberá, Argentina (Di Martino et al., 2018), y la recuperación de la nutria gigante *Pteronura brasiliensis* en el río Paraná (Zamboni et al., 2018), demuestran la efectividad de estas herramientas en la protección de especies amenazadas.

Estas biotecnologías aplicadas a mamíferos marinos son aún objeto de estudio, sin embargo, ya se han reportado casos de éxito. Por ejemplo, en SeaWorld, Estados Unidos, tres hembras de orca de edades entre 13 y 20 años fueron sometidas a monitoreo endocrino y sincronización estral, y posteriormente preñadas mediante inseminación artificial (IA). Dos de las gestaciones culminaron con el nacimiento de crías vivas, mientras que la tercera resultó en una cría muerta (Robeck et al., 2004). Si bien, estos procesos pueden ser costosos y complejos dada la barrera de su hábitat (ambiente acuático) y al tamaño de los animales, representan una interesante alternativa para especies longevas, con ciclos reproductivos largos y complejos que, además, se encuentran en peligro de extinción. No obstante, para la implementación de estos procesos es necesario una mejor comprensión de la anatomía y fisiología reproductiva, con el fin de determinar los protocolos que se adapten a las condiciones de la especie. Adicionalmente, se requieren investigaciones para profundizar en técnicas de manipulación y congelación de gametos, así como líneas bases de valores de referencia endocrinos que ayuden a determinar la eficacia de los protocolos de sincronización o inducción de ovulación (Robeck et al., 1994).

Por otra parte, la investigación de las fluctuaciones hormonales es un aspecto relevante para predecir el pico de actividad reproductiva y comprender cómo los factores estresantes ambientales y antropogénicos pueden influir en la fertilidad de estas poblaciones en la naturaleza (Wilson et al., 2011). La caracterización de los esteroides resulta importante para la evaluación de la competencia reproductiva, la identificación de individuos con problemas de fertilidad y la determinación de la necesidad de intervenciones de reproducción asistida. Recientes esfuerzos se han centrado en la cría natural, utilizando técnicas reproductivas bajo cuidado profesional. El objetivo es garantizar la reproducción de animales con valiosos atributos genéticos, minimizar los riesgos asociados al transporte de animales y preservar la diversidad genética (Brown et al., 1994).

En este sentido, la determinación de los niveles hormonales, especialmente de los esteroides, se ha convertido en una herramienta crucial en la evaluación de la salud reproductiva en distintas especies animales (Brown, 2000). La medición de estas hormonas permite detectar alteraciones en los ciclos reproductivos y evaluar la función gonadal. Asimismo, el monitoreo de los niveles hormonales es esencial para el seguimiento de los programas de reproducción asistida y para evaluar su eficacia (Brown et al., 1994). Por otra parte, la determinación del estado reproductivo, madurez sexual y actividad reproductiva de organismos bajo cuidado profesional, es importante para tomar decisiones críticas de manejo tales como la selección del ambiente social, enriquecimiento ambiental, y tamaño y disposición del encierro (Burgess et al., 2013).

La subespecie de manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) actualmente está clasificada en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como una subespecie En Peligro (EN), con población decreciente (Self-Sullivan y Mignucci-Giannoni, 2008). Su vulnerabilidad se atribuye a factores como la baja tasa reproductiva, la baja variabilidad genética, la fragmentación de sus hábitats y el cambio climático (SEMARNAT, 2020). Los aspectos reproductivos de la subespecie de manatí de la Florida (*T.m. latirostris*) han sido ampliamente estudiados en individuos bajo cuidado profesional (Larkin, 2000), pero el estudio de estos aspectos en manatíes silvestres ha sido limitado debido a la baja eficiencia de las herramientas convencionales (Burgess et al., 2012).

Estudios más recientes han reportado la implementación de métodos no invasivos para el análisis de estas hormonas, utilizando matrices alternativas como saliva (Amaral et al., 2009, 2015), lágrimas (Amaral, 2013), y orina (Wakai et al., 2002; Amaral et al., 2014), y heces (Larkin, 2000; Horikoshi, 2004; Larkin et al., 2005; Burgess et al., 2012; Burgess et al., 2013). Mediante estas técnicas, se han podido determinar aspectos como la duración el ciclo estral, detención de gestación, y madurez sexual en dugongo (Lanyon & Burgess 2014), manatí amazónico (Amaral et al., 2013), y manatí de la Florida (Larkin, 2000; Horikoshi, 2004). A pesar de estos avances, hasta el momento no existe ningún estudio que haya abordado estos aspectos para el manatí antillano.

Este estudio se enfoca en la aplicación de técnicas no invasivas en manatíes antillanos bajo cuidado profesional, con el objetivo de profundizar en la comprensión de sus procesos reproductivos. Con este trabajo, se busca avanzar en el entendimiento fisiológico y reproductivo de esta subespecie en peligro de extinción a fin de generar conocimientos que sean aplicables a la conservación de las poblaciones silvestres de manatí.

V. MARCO TEORICO

5.1. Taxonomía

El orden Sirena posee dos familias: *Dugongidae* y *Trichechidae*. En la familia *Dugongidae* se encuentran la especie *Dugong dugon*, conocida con el nombre común de Dugongo y la extinta *Hydrodamalis gigas*, conocida como vaca marina de Steller (Self-Sullivan & Mignucci-Giannoni, 2008). La familia *Trichechidae* incluye a *Trichechus inunguis* (manatí amazónico), *T. senegalensis* (manatí de áfrica occidental) y *T. manatus* (manatí de las indias occidentales). Este último tiene dos subespecies: *T. m. latirostris* (manatí de la Florida) y *T. m. manatus* (manatí antillano) (Self-Sullivan & Mignucci-Giannoni, 2008).

5.2. Distribución

El manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) es una subespecie nativa de México, en donde históricamente ha tenido una amplia distribución en el golfo de México y la península de Yucatán, desde Tamaulipas hasta la costa de Quintana Roo (**Figura 1**). Debido a la fragmentación de su hábitat, la población se ha concentrado en tres regiones principales: los ríos y estuarios del estado de Veracruz, las cuencas de los ríos Grijalva y Usumacinta en Tabasco y Chiapas, y la región costera del mar Caribe, desde Holbox hasta el Río Hondo en Quintana Roo (Colmenero y Hoz, 1986; Morales-Vela et al., 2000; Olivera et al., 2022).



Figura 1. Distribución actual de los manatíes en México (Elaborado por SEMARNAT, 2020).

5.3. Comportamiento

Los manatíes exhiben comportamientos reproductivos que presentan notables similitudes con los elefantes, producto de una divergencia evolutiva que se inició en el Paleoceno. Estos paralelismos incluyen la poliandria, donde las hembras de manatí se aparean con múltiples machos dentro de un mismo ciclo estral, y la promiscuidad, caracterizada por un apareamiento indiscriminado y oportunista (Larkin, 2000; Hartman, 1979; Poole, 1985). Durante el estro, las hembras manatíes son receptivas a la cópula, atrayendo a grupos de hasta 17 machos. Esta concentración de machos a menudo conduce a una aparente competencia por el acceso a la hembra receptiva (O'Shea et al., 2022). Sin embargo, se ha propuesto que los manatíes son competidores espermáticos, de tal suerte que la selección del mejor genotipo ocurriría a nivel del canal vaginal (Reynolds et al., 2004). El comportamiento de receptividad a la cópula también ha sido observado en hembras acompañadas de crías (Hamlett et al., 1992).

La reproducción de los sirenios es estacional y poliéstrica (Anderson, 2002). Los manatíes, que han evolucionado en zonas tropicales con un fotoperíodo relativamente estable durante todo el año, han desarrollado la capacidad de reproducirse de manera asincrónica. Es decir, no están estrictamente limitados a una temporada de reproducción fija, lo cual sugiere que otras variables ambientales como la temperatura del agua, las precipitaciones y la disponibilidad de alimento podrían influir en sus ciclos reproductivos, tanto en machos como en hembras (Larkin, 2000; Hartman, 1979). Por ejemplo, los manatíes amazónicos están condicionados reproductivamente a los niveles fluviales, de tal suerte que la temporada reproductiva y los nacimientos están asociados al período de aguas altas (diciembre a julio), cuando la disponibilidad de alimento aumenta (Best, 1982). En Colombia, particularmente en el río Orinoco, se ha descrito la adaptabilidad del manatí antillano a diferentes entornos acuáticos, se sugiere que la actividad reproductiva del manatí antillano está influenciada con los cambios ambientales relacionados con los ciclos de inundación, mostrando una tendencia a incrementar su actividad reproductiva durante la estación seca. En esta época, la escasez de vegetación y los niveles de agua reducidos posiblemente faciliten el aislamiento de los individuos, lo que podría ser un factor clave en la dinámica de apareamiento. Contrariamente, durante los períodos de aguas altas, se ha observado una reducción en la frecuencia de encuentros reproductivos, sugiriendo que las variaciones estacionales en el hábitat podrían influir significativamente en los patrones reproductivos de esta población (Castelblanco-Martínez et al., 2009a).

Aunque ambas investigaciones concuerdan en que las fluctuaciones de los ríos interfieren en la reproducción, las razones subyacentes podrían divergir. En el caso del manatí antillano se relacionaría con el confinamiento por los niveles de agua, mientras que, en el manatí amazónico, se vincularía a un aumento en los requerimientos nutricionales. Respuestas similares se han registrado en elefantes africanos y otros ungulados, donde la cantidad de nutrientes se asocia con la reproducción (Best, 1982).

5.4. Madurez sexual

La madurez sexual es un parámetro importante en la biología reproductiva de las poblaciones, esta etapa fisiológica se encuentra muy relacionada con la pubertad. Durante esta última, las hembras son capaces de liberar gametos, un proceso fisiológico que generalmente se manifiesta durante la primera ovulación y que coincide con la aparición de la conducta de celo (Valencia, 2023). Por lo tanto, la madurez sexual se establece cuando las hembras pueden reproducirse sin experimentar efectos adversos, tales como la interrupción del crecimiento, el desarrollo físico inadecuado, distocia, entre otros posibles problemas reproductivos (Valencia, 2023). El criterio más común para evaluar pubertad en hembras de mamíferos es la primera ovulación, evidenciada por la presencia de al menos un cuerpo lúteo en los ovarios. En hembras de manatíes la determinación de madurez sexual es difícil de percibir por observación corporal, a menos de que se registre la hembra acompañada de una cría, glándulas mamarias alargadas y activas o abdomen distendido por un feto grande (Marsh et al., 2011).

Para determinar el estado de pubescencia en hembras de sirenios (prepúberes vs. púberes), se utiliza el tamaño corporal, aunque este puede variar entre individuos, especies y probablemente a nivel poblacional. El término “prepúber” hace referencia a órganos reproductivos y ciertas características de los mismos: ovarios lisos y aplanados con numerosos y pequeños folículos, útero poco desarrollado y glándula mamaria inactiva (Marsh et al., 2011).

En los dugongos silvestres, la madurez sexual puede retrasarse en ambos sexos, debido a una confluencia de factores filogenéticos, genéticos y ambientales, estableciendo la edad de maduración sexual en aproximadamente 6 años. Sin embargo, en condiciones de cautiverio, donde los recursos están más disponibles, se ha observado que la maduración puede ocurrir más temprano (Burgess et al., 2013). Lanyon & Burgess (2014) documentaron que una hembra de dugongo mostraba signos hormonales de inicio de pubertad a los 4 años, en tanto, la madurez sexual se determinó que iniciaba a los 5 años.

Para *Trichechus inunguis* la edad exacta de madurez sexual aún no está claramente definida, pero podría ser entre los 6 y 10 años según los reportes de Amaral et al. (2013). Observaciones recientes de la actividad reproductiva de esta especie bajo cuidado profesional, han demostrado que la madurez sexual del *Trichechus manatus manatus* podría presentarse a una edad más temprana, entre los 2 y 5 años aproximadamente (Sánchez-Okrucky com. pers.).

5.5. Fisiología y morfología reproductiva

Elefantes y manatíes exhiben similitudes en los intervalos de inactividad sexual y en los períodos de actividad reproductiva intensa, como evidencian múltiples apareamientos en cortos lapsos de tiempo. Ambos grupos desarrollan folículos ovulados como no ovulados y múltiples cuerpos lúteos (Larkin, 2000; Horikoshi, 2004).

La configuración anatómica del sistema reproductor en hembras de manatíes se distingue por la localización de la apertura genital, la cual se sitúa adyacente al ano (Hartman, 1979; Poole,

1985; Bonde et al., 1983). La estructura del aparato reproductor se asienta en el segmento caudal del abdomen (Rodríguez et al., 2008). Las estructuras reproductivas externas de la hembra del manatí incluyen la vulva, el clítoris y el vestíbulo; este último está a un costado de los labios mayores, que se manifiestan como pliegues cutáneos notables circundando la apertura urogenital, cercanos al ano. El vestíbulo se extiende hacia la parte interna proximal. El clítoris, de una forma distintivamente cónica, emerge dorso ventralmente en dirección a la apertura urogenital, culminando en una protuberancia diminuta conocida como el glande del clítoris (Rodríguez et al., 2008). En la vagina se observa una mucosa conformada por epitelio escamoso queratinizado con una longitud promedio de 267,1115 μm . La submucosa sugiere una composición de tejido conectivo muy grueso y vascularizado (Bezerra et al., 2018).

El aparato reproductivo interno de las hembras del manatí se caracteriza por un útero bicórneo que se pliega a lo largo de su eje y presenta un cuerpo uterino de dimensiones reducidas. Los cuernos uterinos son cortos y robustos, y se prolongan hacia oviductos de similar longitud. En su estado no gestante, el útero exhibe una morfología bilobulada con rugosidades transversales que alcanzan hasta los oviductos (Ronald et al., 1978). Los ovarios, de forma ancha y aplanada, se ubican lateralmente a los riñones y están contenidos dentro de una bolsa peritoneal, como se observa en la **figura 2**. Se ha establecido una similitud en la placentación decidua y en la estructura uterina bicorne entre manatíes y elefantes (Hamlett et al., 1992). Los ovarios disponen de una corteza constituida por una banda estrecha que alberga folículos rodeados de tejido de soporte. Se evidencia una predominancia de folículos primordiales, aunque también se identifican folículos secundarios, terciarios y de Graaf abundante. El tejido medular ocupa aproximadamente el 80% del órgano, y se caracteriza por una rica y difusa vascularización compuesta por vasos sanguíneos de diversos calibres (Bezerra et al., 2018).

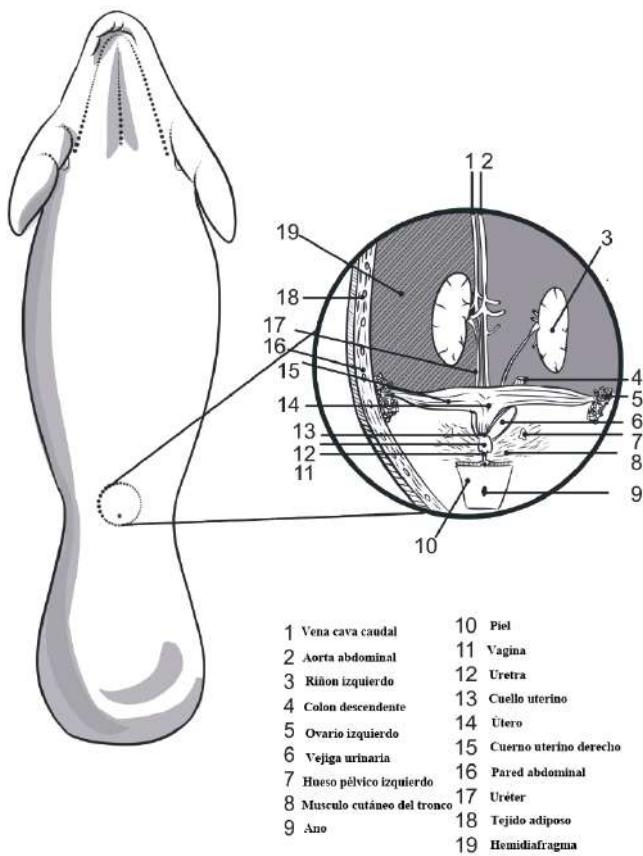


Figura 2. Esquema representativo del sistema reproductivo de hembras de manatí (*Trichechus manatus*)

5.6. Bases endocrinológicas

Se ha sugerido que los sirenios son poliéstricos, es decir que tienen ciclos estrales durante todo el año y solo se interrumpen por la preñez. Se han observado grupos manáties de la Florida en estro incluyendo hembras con crías lo que, asumiendo que la ovulación no ocurre durante la lactancia, indica que en los manáties pueden ocurrir períodos de estro infértil (Hartman 1979). Sin embargo, esto solo se ha demostrado histológicamente en los dugongos (Marsh et al., 1984) y queda por demostrar en los manáties.

La fisiología reproductiva de los manatíes exhibe variabilidad en cuanto a la duración del ciclo estral, la cual puede diferir entre especies y poblaciones específicas. Para sirenios bajo cuidado profesional, se ha estimado una duración de ciclo estral de entre 28 y 42 días para *Trichechus manatus latirostris* (Larkin, 2000), de entre 42 y 48 días para *Trichechus inunguis* (Amaral et al., 2013), y de 53.6 días para *Dugong dugon* (Wakai et al., 2002).

Las hormonas esteroideas son compuestos derivados del colesterol y se clasifican en cinco grupos distintos: progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides. Estas hormonas son termoestables y liposolubles, esta última

característica les permite atravesar la membrana celular y permanecer en el tracto digestivo por varios días sin ser degradadas por los jugos gástricos (Zarco-L et al., 2018).

Las hormonas esteroideas en el torrente sanguíneo, libres de unión a proteínas, tienen la capacidad de atravesar el epitelio de las glándulas exocrinas, como las glándulas salivales, mamarias y lagrimales, principalmente mediante un proceso de difusión pasiva. Este mismo mecanismo permite el paso de hormonas esteroideas a través de la mucosa pulmonar (Amaral, 2010). El metabolismo principal de los esteroides se lleva a cabo en el hígado, el cual ejerce una función predominante en su catabolismo; sin embargo, se reconoce que los riñones también presentan actividad catabólica significativa en relación a estos compuestos. Los productos del metabolismo esteroideo son excretados en el duodeno a través del sistema biliar y posteriormente transportados junto con los productos de la digestión (Amaral, 2010).

La progesterona es una hormona que se produce principalmente en las células del cuerpo lúteo, aunque en algunas especies también es secretada por la placenta. Esta hormona desempeña una función importante en el sistema reproductivo, actuando en sinergia con los estrógenos para llevar a cabo diversas funciones reproductivas, como el crecimiento del epitelio glandular del útero y de la glándula mamaria, en preparación para la lactancia. Además, se ha observado que la progesterona también está implicada en la regulación del ciclo estral y en la prevención de la ovulación durante la gestación (Zarco-L et al., 2018).

Los estrógenos son hormonas responsables de los signos de estro o receptividad sexual de las hembras. La mayor parte de sus efectos están encaminados a lograr la fertilización del óvulo. Además, favorece a la apertura del cérvix y a las contracciones uterinas para impulsar el transporte de los espermatozoides (Zarco-L et al., 2018). Los cuerpos lúteos constituyen estructuras endocrinas especializadas, y desempeñan una función crítica en la síntesis de progesterona, hormona esencial para la preparación del organismo para la gestación y el parto. Se ha planteado la hipótesis de que las dificultades para la concepción en estos mamíferos marinos podrían estar relacionadas con una producción insuficiente de progesterona, un indicio de una posible disfunción hormonal subyacente (Hamlett et al., 1992).

En estudio que realizaron Floyd et al. (1991) en *Trichechus manatus* encontraron niveles de P4 (progesterona) muy bajos durante algunos de sus muestreos, lo cual atribuyeron a las dificultades que se presentan en la toma de muestras sanguíneas ya que los ejemplares no siempre se encontraban receptivos a la toma de sangre y podría generar estrés. No obstante, se ha encontrado que las concentraciones de P4 en muestras sanguíneas de *Trichechus manatus latirostris* durante los estadios iniciales de la gestación son relativamente bajas (Tripp et al., 2009), una característica que no es exclusiva de los manatíes, sino que se extiende a otras especies de sirenios y a los elefantes. Esta observación sugiere que podría existir un metabolismo acelerado de la P4 sintetizada por el cuerpo lúteo, un fenómeno previamente reportado en ciertas especies de carnívoros (Tripp et al., 2009).

Dadas las características de las hormonas esteroidales, es posible extraerlas de las heces y determinar sus concentraciones. Debido a su termoestabilidad, estas hormonas pueden permanecer intactas en el tracto digestivo por días o incluso semanas sin que se vea afectada su estructura química (Brown et al., 1996). Esta capacidad de cuantificación de las hormonas

esteroidales permite describir el perfil reproductivo de una especie. Por lo anterior, el uso de técnicas no invasivas de monitoreo se convierte en una herramienta confiable para el estudio de la actividad reproductiva de animales bajo cuidado profesional y en vida silvestre (Wasser et al., 1994; Brown, 2000; Lanyon & Burgess, 2014).

5.7. Tasa de pasaje digestivo

Los manatíes de las Américas son considerados herbívoros oportunistas, consumen una variedad de hasta 60 especies de vegetales presentes en hábitats marinos, estuarios y de agua dulce. Además, su dieta incluye macroalgas e invertebrados, y en ocasiones, pastos terrestres cercanos a la costa e incluso peces atrapados en redes (Worthy & Worthy 2014; Castelblanco-Martínez et al., 2009b).

Los manatíes se distinguen por tener una tasa metabólica baja y, aunque no son rumiantes, poseen un intestino superior agrandado que les permite una eficiente extracción de nutrientes, especialmente de la celulosa. El sistema digestivo del manatí incluye un intestino delgado de más de 20 metros de longitud, que equivale a 6-7 veces la longitud de su cuerpo. Este intestino se divide en dos partes principales: el duodeno, que es la porción libre, y el yeyuno e íleon, que conforman la porción adherida o mesentérica. Por otra parte, en el intestino grueso del manatí se produce la mayor parte de la celulólisis, con velocidades de paso digestivo más lentas. Esto podría estar relacionado con el gran tamaño del intestino, que representa alrededor del 23% del peso corporal total (Larkin et al., 2007). Además, en el intestino grueso está compuesto por el ciego del intestino medio, el colon y el recto (Reynolds et al 1996). Estas adaptaciones digestivas permiten a los manatíes procesar eficazmente una amplia gama de materia vegetal en su dieta.

Los manatíes pueden tener períodos más breves de retención digestiva en el estómago y en su relativamente extenso intestino delgado (Larkin et al., 2007). Por ejemplo, se observa que estos órganos suelen contener una cantidad mínima de material vegetal. Además, la digestión estomacal ocurre dentro de una densa capa de moco que posiblemente reduce la absorción de nutrientes. En lugar de células predominantemente absorbentes en el intestino delgado del manatí, las células caliciformes constituyen el tipo celular principal. Por lo cual, la medición de la tasa de paso digestivo desde el momento de la ingestión hasta la defecación puede ser informativa con respecto a la función gastrointestinal, en el sentido que revela información como indicar retrasos en las concentraciones hormonales al comparar con valores de muestras de suero con heces. El tiempo de paso digestivo del manatí de la Florida es de 6 a 10 días con un promedio de 7 días (Larkin et al., 2007).

5.8. Problema

El manatí antillano enfrenta diversas amenazas que ponen en peligro su supervivencia. Entre éstas se incluye la caza furtiva, la pesca incidental, las colisiones con embarcaciones, enfermedades infecciosas, la contaminación de fuentes hídricas, el cambio climático, la fragmentación del hábitat y el crecimiento de las zonas urbanas, turísticas y agropecuarias (SEMARNAT, 2020). Su estado de vulnerabilidad se debe a factores como la baja tasa reproductiva, la baja variabilidad genética, el comportamiento migratorio local que podría atribuirse a las actividades antrópicas y la fragmentación de los hábitats. Además, las

migraciones locales pueden tener incidencia negativa en la supervivencia de los animales debido a que se solapan con las actividades humanas, ya que se están concentrando en ríos principales donde se ejercen actividades económicas, recreativas y culturales (SEMARNAT, 2020).

En México no se ha reportado una estimación poblacional exacta de manatíes, debido a la dificultad para observarlos en vida silvestre. Recientes estudios sugieren que probablemente la población estaba sobreestimada (González et al., 2012). Con base en la opinión de expertos nacionales (Rodas-Trejo et al., 2008; Puc-Carrasco et al., 2016; Puc-Carrasco et al., 2017; González et al., 2012), se estiman entre 800 a 1100 ejemplares, de los cuales 200 a 250 se encuentran ubicados en la costa de Quintana Roo y entre 600 y 850 en el Golfo de México (SEMARNAT, 2020).

La clasificación de los manatíes como especies sombrilla y emblemáticas subraya su papel fundamental no solo en la preservación de hábitats, sino también por su trascendencia ecológica que protege a otras especies residentes en los mismos ecosistemas (SEMARNAT, 2020). Frente a los desafíos inherentes al estudio de su biología reproductiva, agravados por las dificultades de monitoreo en su entorno natural, los ejemplares en cautividad se convierten en una fuente valiosa de información (Lanyon et al., 2014).

Con el fin de contribuir al manejo *ex-situ* y la conservación de esta subespecie, resulta crucial comprender algunos aspectos de la biología y reproducción del manatí antillano. La disciplina de la endocrinología de la conservación, aún en desarrollo dentro de la conservación de mamíferos marinos, proporciona datos críticos para la gestión futura de estas poblaciones (Lanyon et al., 2014). Esta tesis propone el empleo de técnicas no invasivas como instrumentos esenciales para la determinación del estado reproductivo, vital tanto para el manejo de especies en la naturaleza como para las poblaciones en cautiverio.

La aplicación de tecnologías endocrinológicas facilita el estudio de estados fisiológicos a través del análisis de fluidos corporales, aprovechando el metabolismo de los esteroides, que pueden cruzar diversas barreras biológicas como las salivales y las mamarias por difusión pasiva (Amaral, 2010). Aunque la obtención de muestras sanguíneas es una técnica común, presenta complejidades, especialmente en especies acuáticas y durante muestreos prolongados, pudiendo alterar el comportamiento por el estrés inducido al capturar y sujetar al animal, lo que incrementa el riesgo de flebitis (Amaral, 2010).

Mantener animales bajo cuidado profesional no solo posibilita la observación directa de comportamientos de apareamiento, partos, y la estimación de la edad reproductiva, sino que también facilita el adiestramiento para la entrega voluntaria de muestras fisiológicas que simplifican el estudio de eventos reproductivos (Lanyon et al., 2014). El condicionamiento operante, en sinergia con tecnologías de monitoreo, permite la determinación de los ciclos reproductivos en intervalos temporales definidos (Lanyon et al., 2014). La medición de hormonas en heces ofrece ventajas sobre los análisis sanguíneos, ya que reflejan valores promedio acumulativos a lo largo del tiempo, proporcionando un indicador más estable y menos susceptible a variaciones inmediatas comparado con las mediciones directas en sangre. El avance en estas tecnologías ha facilitado que el estudio fisiológico de grandes mamíferos se extienda más allá del muestreo letal (Lanyon et al., 2014).

En consecuencia, la presente tesis busca aplicar dichas tecnologías para cubrir los vacíos de información acerca del ciclo estral en hembras del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*). Además, identificar si factores como las interacciones sociales, las variaciones estacionales y los cambios en la temperatura del agua pueden afectar el ciclo estral, lo cual, es fundamental como punto de partida en la investigación de las fluctuaciones hormonales que influyen en la reproducción. Con base en esto, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son los valores de referencia de estradiol y progesterona para hembras de *Trichechus manatus manatus* y cuál es la relación entre dichas hormonas?

VI. OBJETIVOS

6.1. General

Determinar el perfil reproductivo de hembras de la subespecie *Trichechus manatus manatus*, para establecer las diferencias asociadas al estadio reproductivo entre púberes y prepúberes, mediante monitoreo hormonal no invasivo.

6.2. Específicos

1. Estimar las concentraciones de hormonas esteroides (progesterona y estradiol) en el manatí antillano, mediante monitoreos hormonales no invasivos, utilizando muestras de heces.
2. Determinar si existe correlación entre las concentraciones de estradiol y progesterona en las hembras de manatí antillano, para interpretar la interacción de estos esteroides en el ciclo reproductivo bajo cuidado profesional.
3. Determinar si existen diferencias en las concentraciones hormonales de progesterona y estradiol entre hembras púberes y prepúberes de manatí antillano bajo cuidado profesional.
4. Determinar el efecto de la temperatura del agua en los valores de hormonas esteroides de hembras de manatí antillano bajo cuidado profesional.
5. Comparar patrones hormonales de estradiol y progesterona entre el manatí antillano y el reportado para otros sireníos como *Trichechus manatus latirostris*, *Trichechus inunguis*, y *Dugong dugon*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Área de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en el delfinario del Grupo *The Dolphin Company*, ubicado en el Estado de Quintana Roo, México, en la localidad de Puerto Aventuras. Latitud 20,500333718580382, Longitud -87,22674910245138. Allí se tuvieron a disposición cuatro hembras que en el momento del muestreo se encontraban entre las edades de dos años hasta 21 años (**Tabla 1**).

Tabla 1. Identificación y edades de las hembras de manatíes muestreadas durante este estudio.

Nº	Identificación	Edad (años)	Estado Reproductivo
1	Sasil	2	Prepúber
2	Michellin	4	Prepúber
3	Dorothy	15	Púber
4	Julietta	21	Púber

Los cuatro ejemplares se encontraban en un hábitat semiabierto, donde solo había hembras, sin presencia de machos en los alrededores. Los animales tenían una dieta conformada por papaya, plátano, lechuga, e hidroponía que es un germinado de maíz y espinaca. Los individuos presentaban buen estado de salud con base en los monitoreos periódicos realizados por el departamento de veterinaria del centro.

7.2. Medición de la temperatura del agua

En este estudio, se midió la temperatura del agua del hábitat donde se encontraban las hembras, con el fin de evaluar posibles variaciones significativas. Para esto, se utilizaron termómetros sumergibles de la marca HOBO® Pendant® MX Temp (MX2201). Estos dispositivos están diseñados para soportar inmersiones de hasta 30 metros (aproximadamente 100 pies) y están equipados con tecnología de conexión y transferencia de datos mediante Bluetooth Low Energy (BLE), lo que facilita su manejo inalámbrico. Los termómetros presentan una precisión de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,9^{\circ}\text{F}$) y han sido programados para registrar las temperaturas a lo largo de todo el año. Las mediciones se llevaron a cabo cada 6 horas en los siguientes horarios: 5:33, 11:33, 17:33 y 23:33 horas.

La información recopilada por estos dispositivos se descargó y procesó a través de la aplicación HOBO Onset. Esta metodología permitió obtener registros detallados y precisos de las temperaturas del agua durante los períodos de muestreo, para la posterior correlación con los datos obtenidos del monitoreo endocrinológico.

7.3. Obtención de muestras

El tiempo estimado de paso digestivo del manatí de la Florida es de seis a diez días con un promedio de siete días (Larkin et al., 2007), es posible relacionar la fecha de la toma de la

muestra con la actividad hormonal, teniendo en cuenta el tiempo del paso digestivo. Además, el ciclo estral en manatí de la Florida tiene una duración de 42 a 45 días (Larkin, 2000). Por lo anterior, para determinar las fluctuaciones diarias en el ciclo, el periodo de muestreo fue de 45 días, las cuales fueron recolectadas en el mes de octubre y noviembre del 2022, asumiendo que este sería el ciclo completo, haciendo una extrapolación los datos según lo reportado para el manatí de la Florida.

Las muestras fueron recolectadas entre 10:00 am y 12:30 pm, estableciendo un comportamiento de entrega voluntaria de las muestras por condicionamiento operante, como se observa en la **Figura 3**. Para la toma de muestras se utilizaron guantes de látex y fueron depositadas en bolsa *whirl pak®*. Se tomó una cantidad aproximada de 5 gramos de heces directamente del ano de cada ejemplar, evitando su contaminación con el agua del recinto. Luego de ser recolectadas, las muestras fueron almacenadas en congelación a -20° C en el laboratorio de Dolphin Discovery, Puerto Aventuras, hasta el proceso de extracción.



Figura 3. Toma de muestras de materia fecal mediante condicionamiento operante. Foto: créditos Vanessa Bermúdez Cardona.

7.4. Proceso de cuantificación hormonal

El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de Reproducción y Endocrinología de la Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre, en la Ciudad de México. Para la cuantificación de esteroides, se utilizaron los kits DetectX®, de inmunoensayo (ELISA) con número de catalogo: K025-H1/H5 y K030-H1/H5, los cuales están diseñados para medir cuantitativamente la presencia de progesterona y estradiol, respectivamente en muestras extraídas de heces secas. Estos kits ya se han utilizado en cuantificación de esteroides en heces de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) (Morales, 2020) y ballena azul (*Balaenoptera musculus*) (Valenzuela, 2013). Para la utilización de estos kits se siguieron las instrucciones del fabricante.

7.5. Extracción esteroides

La metodología de extracción se fundamentó en los protocolos establecidos por Wasser et al. (1994), Burgess et al. (2012) y Brown et al. (2004), Sandoval & Sánchez-Espinoza (2024) pero con adaptaciones específicas para satisfacer las necesidades de esta investigación. Se implementaron cambios en la metodología de secado y en el proceso de agitación, donde se empleó un equipo de agitación especializado, adaptándose a la disponibilidad de equipos en el laboratorio.

El proceso de preparación de las muestras fecales para su análisis hormonal incluyó varias etapas. Inicialmente, las muestras fueron pesadas y posteriormente secadas en un horno a temperaturas entre 65 y 75 °C durante un periodo aproximado de 4 horas (Sandoval & Sánchez-Espinoza, 2024). Paralelamente, se procedió a la preparación de una solución al 90% de metanol, la cual se añadió a las muestras secas para su re-suspensión. Cada muestra, consistente en 0,3 g de heces secas, se colocó en tubos estériles de borosilicato al que se le añadió 3 ml de la solución de metanol, manteniendo una proporción de 1:10 en volumen/masa (Sandoval & Sánchez-Espinoza, 2024). Los tubos fueron sellados con papel Parafilm y agitados en vórtex durante un minuto, para después ser sometidos a agitación constante durante 12 horas, utilizando un agitador para tubos de hematología, como se observa en la **Figura 4**. Tras la agitación, las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 3000 RPM. Finalmente, la solución libre de residuos se traspasó a microtubos y se almacenó congelada a -20° C, hasta el momento de su análisis mediante la técnica ELISA, lo que permitió una conservación óptima de las muestras para su posterior estudio.

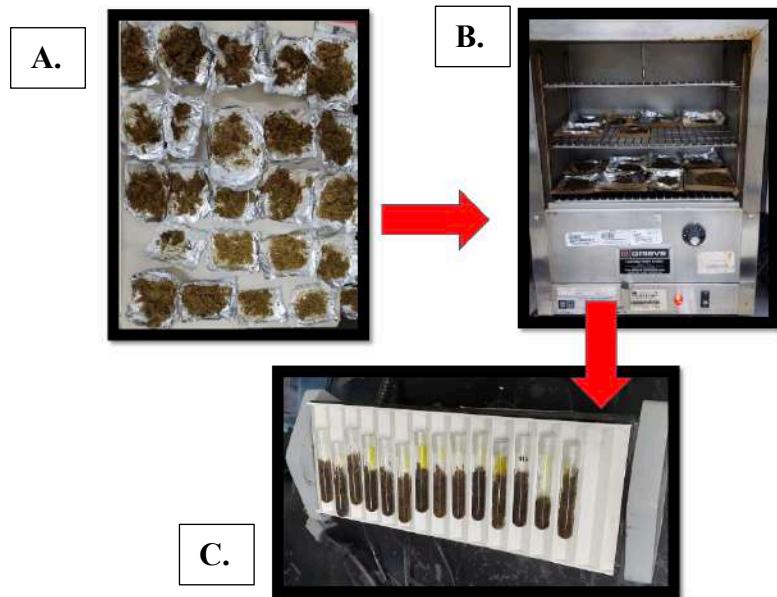


Figura 4. Proceso de preparación de extracción de esteroides a partir de muestras fecales para análisis hormonal.

A. preparación de la muestra para secado en el horno.

B. Proceso de secado en el horno.

C. Equipo de agitación de hematología que se empleo para el proceso de agitación.

7.6. Factor de dilución de las muestras para la cuantificación hormonal

Se realizaron dos ensayos preliminares utilizando muestras en diferentes estados: una con metanol evaporado y otra con metanol en su estado original (sin evaporar). El objetivo principal en esta etapa fue evaluar y comparar la interacción de los kits de análisis utilizados con las muestras en ambas condiciones de solución, con el fin de determinar si existían diferencias significativas en su comportamiento.

Los resultados de los ensayos mostraron que no hubo diferencias significativas en la eficacia de los kits de análisis al interactuar con las muestras en las dos soluciones de metanol. Por lo anterior, se decidió optar por la utilización de la solución de metanol sin evaporar para la extracción de todas las muestras. Antes de iniciar el ensayo para la cuantificación, las muestras fueron diluidas 1:10 para progesterona (P4) y 1:5 para estradiol (E2). Los ensayos se hicieron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posterior a esto se procedió a preparar la curva de estándar de calibración.

7.6.1. Preparación de la curva estándar para progesterona (P4) y estradiol (E2)

Para establecer una curva estándar de calibración (CE), se utilizó la solución amortiguadora suministrada con cada kit de ensayo inmunoenzimático. Para la Progesterona (P4), se prepararon siete puntos en la curva, utilizando diluciones por duplicado, comenzando en una concentración máxima de 3200 ng/ml y una mínima de 50 ng/ml, como se muestra en la **Figura 5**. En el caso del Estradiol (E2), se configuraron cinco puntos de calibración, también con diluciones seriadas cuádruples, partiendo de una concentración inicial de 10000 ng/ml y una mínima de 39,06 ng/ml, representados en la **Figura 6**.

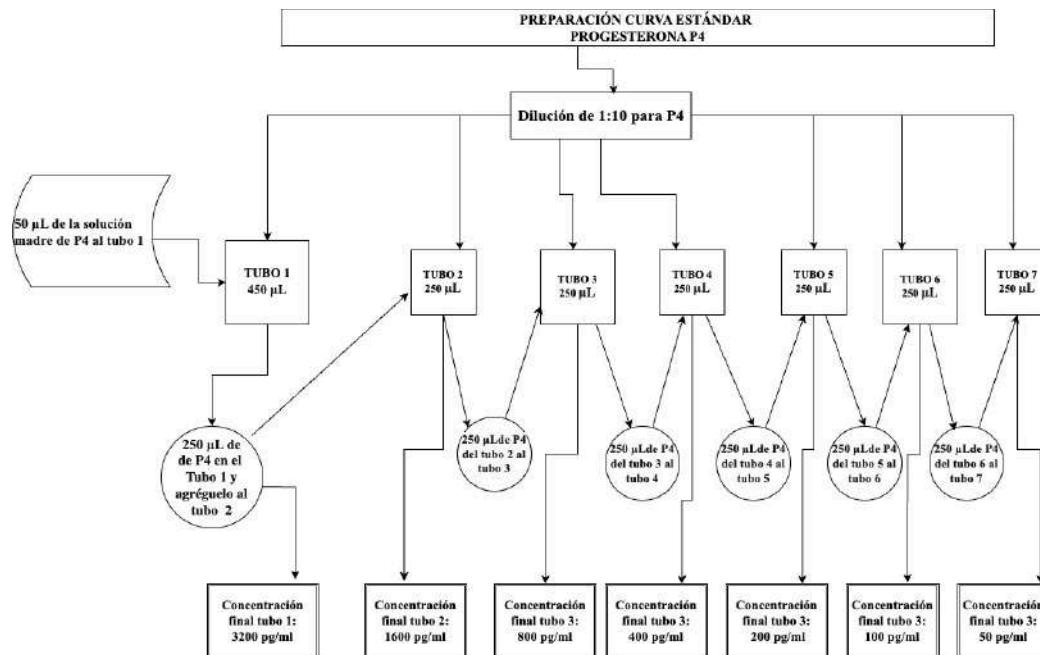


Figura 5. Esquema para la preparación para la curva estándar de calibración (CE) para Progesterona (P4).

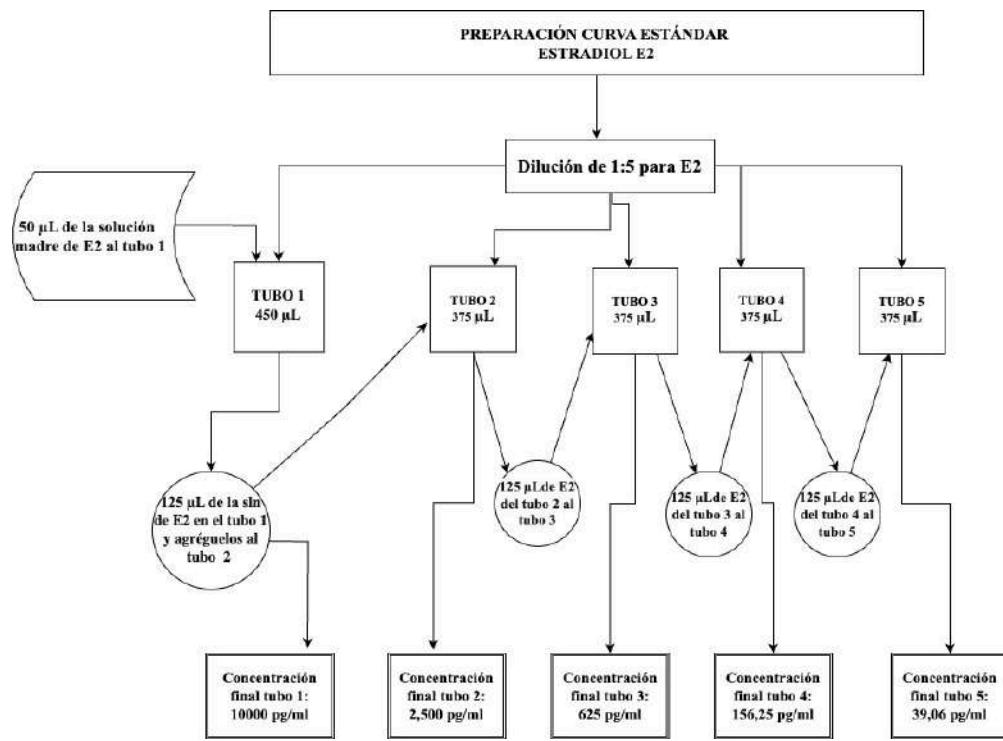


Figura 6. Esquema para la preparación para la curva estándar de calibración (CE) para Estradiol (E2).

7.7. Ensayos inmunoenzimáticos para la cuantificación de hormonas esteroideas

Para la cuantificación de progesterona (P4) y estradiol (E2), se empleó una placa de tiras de 96 pocillos, conservada a 4 °C hasta su uso. El procedimiento comenzó con la adición de la solución buffer de unión no específica (UNE). Luego, se agrego la solución buffer de unión máxima (B0). Posteriormente, se agrego la curva estándar de calibración (CE), todo por duplicado como se observa en la **Figura 7**. Finalmente, se agregaron las muestras, excluyendo los pozos UNE como se observa en la **Figura 8**.

La placa se agitó suavemente y se cubrió con tapa autoadherente para incubar a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se aspiraron las soluciones de los pocillos y se procedió a lavarlos tres veces con 300 µL de solución de lavado. Después, se escurrió la placa en toallas limpias y absorbentes, se añadieron 100 µL del sustrato tetrametilbenzidina TMB a cada pozo, y se dejó en incubación sin agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para finalizar el proceso, se agregaron 50 µL de la solución de parada a cada pozo. La densidad óptica generada se leyó con un lector de placas con una longitud de onda de 450 nm, utilizando un equipo ELX880 *Ridasoft win R-Biopharm* con un software *Ridawin* para la interpretación de los datos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	UNE	UNE	CE ⁷	CE ⁷								
B	BO	BO	M ¹	M ¹								
C	CE ¹	CE ¹	M ²	M ²								
D	CE ²	CE ²	M ³	M ³								
E	CE ³	CE ³	M ⁴	M ⁴								
F	CE ⁴	CE ⁴	M ⁵	M ⁵								
G	CE ⁵	CE ⁵	M ⁶	M ⁶								
H	CE ⁶	CE ⁶										

Figura 7. Esquema representativo placa de tiras de 96 pocillos donde se ubican: la unión no específica (UNE), solución de unión máxima (BO), la curva estándar de calibración (CE) y las muestras (M) para posteriormente ser leídas por el lector de placas y determinar las concentraciones de progesterona (P4) y estradiol (E2).

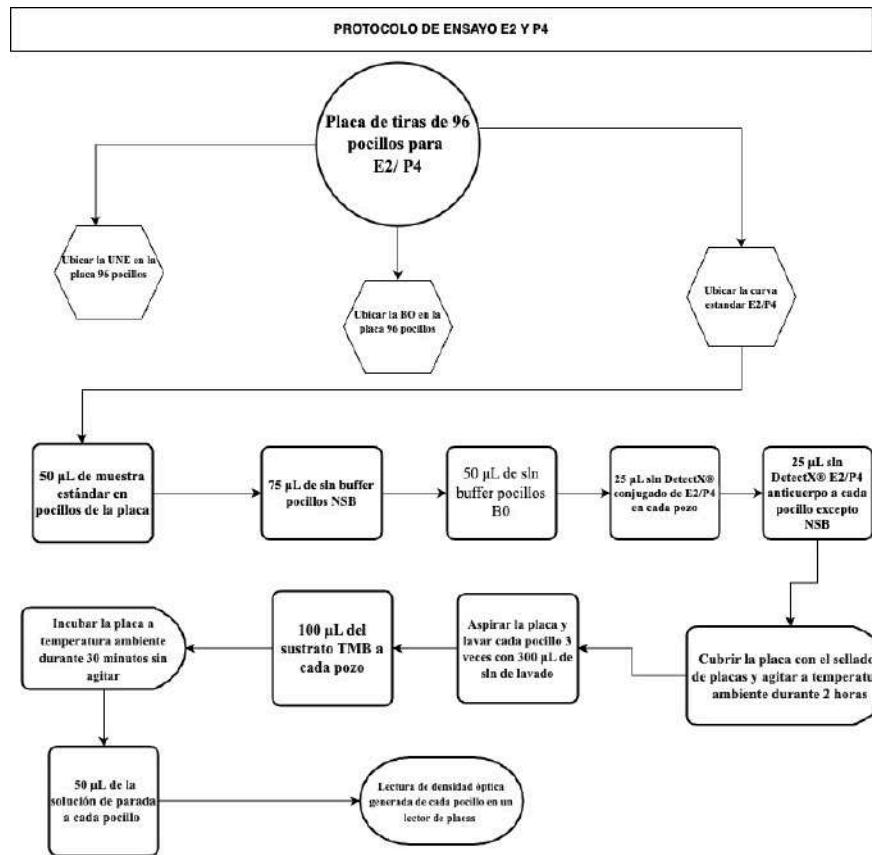


Figura 8. Esquema representativo de preparación de las muestras para agregar en la placa de 96 pocillos.

7.7.1. Validación de los ensayos inmunoenzimáticos para las hormonas esteroideas

La prueba de validación inicialmente consistió en comparar la dilución trabajo, la dilución de los extractos contra la curva estándar, lo que indicó que el anticuerpo receptor se estaba uniendo adecuadamente a los metabolitos fecales a través de un rango de concentración (IAEA, 1984). Para progesterona y estradiol se corroboró un porcentaje cercano del 50% de la unión en relación a la curva de estándar de calibración.

7.7.2. Variación de ensayo

Este método posibilita la evaluación de la exactitud del análisis. El coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo no debe ser mayor al 15% como reporta Brown et al., (2004).

7.7.3. Prueba de especificidad

Los valores de especificidad para P4 determinados por el fabricante se encuentran reflejados en la **Tabla 2** y los determinados para E2 se encuentran reflejados en la **Tabla 3**.

Tabla 2. Valores de especificidad del kit de inmunoensayo (ELISA) con número de catalogo: K025-H1/H5 reportada por el fabricante

Esteroides	Especificidad (%)
Progesterona	100%
3 β -Hidroxi-progesterona	172%
3 α -Hidroxi-progesterona	188%
11 β -Hidroxi-progesterona	2,7%
11 α -Hidroxi-progesterona	147%
5 α -Dihidropogesterona	7,0%
Pregnenolona	5,9%

Tabla 3. Valores de especificidad del kit de inmunoensayo (ELISA) con número de catalogo K030-H1/H5

Esteroides	Especificidad (%)
17 β -Estradiol	100%
Estrona	0,78%
17 α -Estradiol	0,22%
17 α -Etinilestradiol	0,11%

7.8. Análisis estadísticos:

Para el análisis estadístico de los datos recolectados en esta investigación, se utilizó el software R en su versión 4.3.0. Las correlaciones de Spearman y Kendall se aplicaron para manejar datos no paramétricos. Para el análisis de la medición de las hormonas entre estadios reproductivos (prepúberes vs. púberes), se realizaron las comparaciones un total de 100 veces, utilizando el número mínimo común de mediciones del individuo identificado como Michellin (n=16). Este proceso se llevó a cabo mediante submuestreo aleatorio. Además, para evaluar las diferencias entre las concentraciones de progesterona y estradiol entre los individuos estudiados, se empleó el método estadístico Skillings-Mack a través del paquete R "Skillings-Mack 1.10", el cual es útil en diseños de bloques con datos faltantes de forma arbitraria, como detallan Skillings y Mack (1981).

VIII. RESULTADOS

En este estudio el tiempo de monitoreo fue de 45 días. Sin embargo, en algunos días los animales no entregaron muestra fecal, en consecuencia, no se obtuvieron la misma cantidad de muestras por animal. Por lo cual, se obtuvieron un total de 88 muestras como se observa en la (**Tabla 4**) discriminado por cada animal muestreado.

Tabla 4. Cantidad de muestras fecales recolectadas por cada hembra de manatí antillano.

Identificación	Número de muestras recolectadas
Sasil	24
Michellin	16
Dorothy	28
Julieta	20

En este estudio, se observó que la variación intra-ensayo para la progesterona (P4) tuvo un promedio de 9,8%, mientras que para el estradiol (E2) fue de 10,75% Además, se registraron variaciones inter-ensayo, con un porcentaje de 16,3% para progesterona (P4) y de 19,3% para estradiol (E2).

Para este estudio, el porcentaje de sensibilidad de unión mínimo fue de 52,9 ng/ml para progesterona (P4) y 26,5 ng/ml para estradiol (E2), valores suministrados por el fabricante.

Por otra parte, el porcentaje de unión para la cuantificación de progesterona (P4) fue de 34,1% y máximo de 68,8%, y para estradiol (E2) fue de 35% y el máximo de 70%.

Las concentraciones mínimas de progesterona fueron de 109,9 ng/g, mientras que las máximas registraron valores de hasta 334,3 ng/g. En lo que respecta al estradiol, las concentraciones mínimas observadas fueron de 12,2 ng/g, y las máximas alcanzaron los 90,9 ng/g (**Tabla 5**).

En vista de que los datos presentados en la **Figura 10** no cumplen con la suposición de normalidad, se procedió a aplicar pruebas estadísticas no paramétricas que permitieran la evaluación de la correlación entre las concentraciones de Progesterona y Estradiol. A partir de las pruebas de correlación de Spearman ($\rho = 0,122$, $p\text{-value} = 0,254$) y Kendall ($\tau = 0,084$, $p\text{-value} = 0,245$) se evidenció que no existe una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de Progesterona y Estradiol entre los individuos analizados.

Del mismo modo, no se evidenció una correlación significativa entre la concentración de ambas hormonas entre las hembras prepúberes y púberes (**Tabla 6**). Debido a que cada hembra tiene un número diferente de datos, los valores presentados corresponden al valor promedio de 100 réplicas aleatorias usando un mínimo número común de datos ($n = 16$). Para corroborar si dentro de estos datos tomados aleatorios se presentaban un porcentaje significativo de correlación se realizaron unas gráficas de densidad de Kernel (**Figura 9**), dando como resultado, el mayor numero de datos con un p -valor mayor a 0,05. Por lo anterior,

se mantiene que no se encuentra correlación significativa entre las concentraciones de dichas hormonas.

Tabla 5. Concentraciones hormonales de progesterona (P4) y estradiol (E2), valores máximos y mínimos de cada ejemplar estudiado. Los valores máximos y mínimos en el conjunto de individuos se encuentran señalados en el recuadro rojo.

ID	HORMONA P4				HORMONA E2			
	Media (ng/g)	Máx	Mín	SD	Media (ng/g)	Máx	Mín	SD
JULIETA	205,6	334,3	150,6	39,2	53,2	85,8	18,6	15,9
DOROTHY	175,7	256,6	126,4	32,9	48,1	79,2	16,2	16,6
MICHELI N	170,0	236	120,4	33,7	49,9	86,8	27	15,6
SASIL	174,2	284,3	109,9	40,8	50,0	90,9	12,2	17,4

Tabla 6. Comparación por pares entre las correlaciones (ρ = Spearman y τ = Kendall) hormonales de las hembras prepuberes (Sasil y Michelín) y puberes (Dorothy y Julieta).

ID	HORMONA P4		HORMONA E2	
	Sasil	Michelin	Sasil	Michelin
DOROTHY	$\rho = < 0,01$ (0,477)	$\rho = 0,030$ (0,503)	$\rho = 0,016$ (0,519)	$\rho = 0,009$ (0,471)
	$\tau = < 0,01$ (0,465)	$\tau = 0,025$ (0,511)	$\tau = 0,014$ (0,519)	$\tau = 0,007$ (0,461)
JULIETA	$\rho = -0,021$ (0,481)	$\rho = 0,027$ (0,487)	$\rho = -0,026$ (0,517)	$\rho = -0,016$ (0,512)
	$\tau = -0,017$ (0,451)	$\tau = 0,021$ (0,484)	$\tau = -0,020$ (0,517)	$\tau = -0,011$ (0,502)

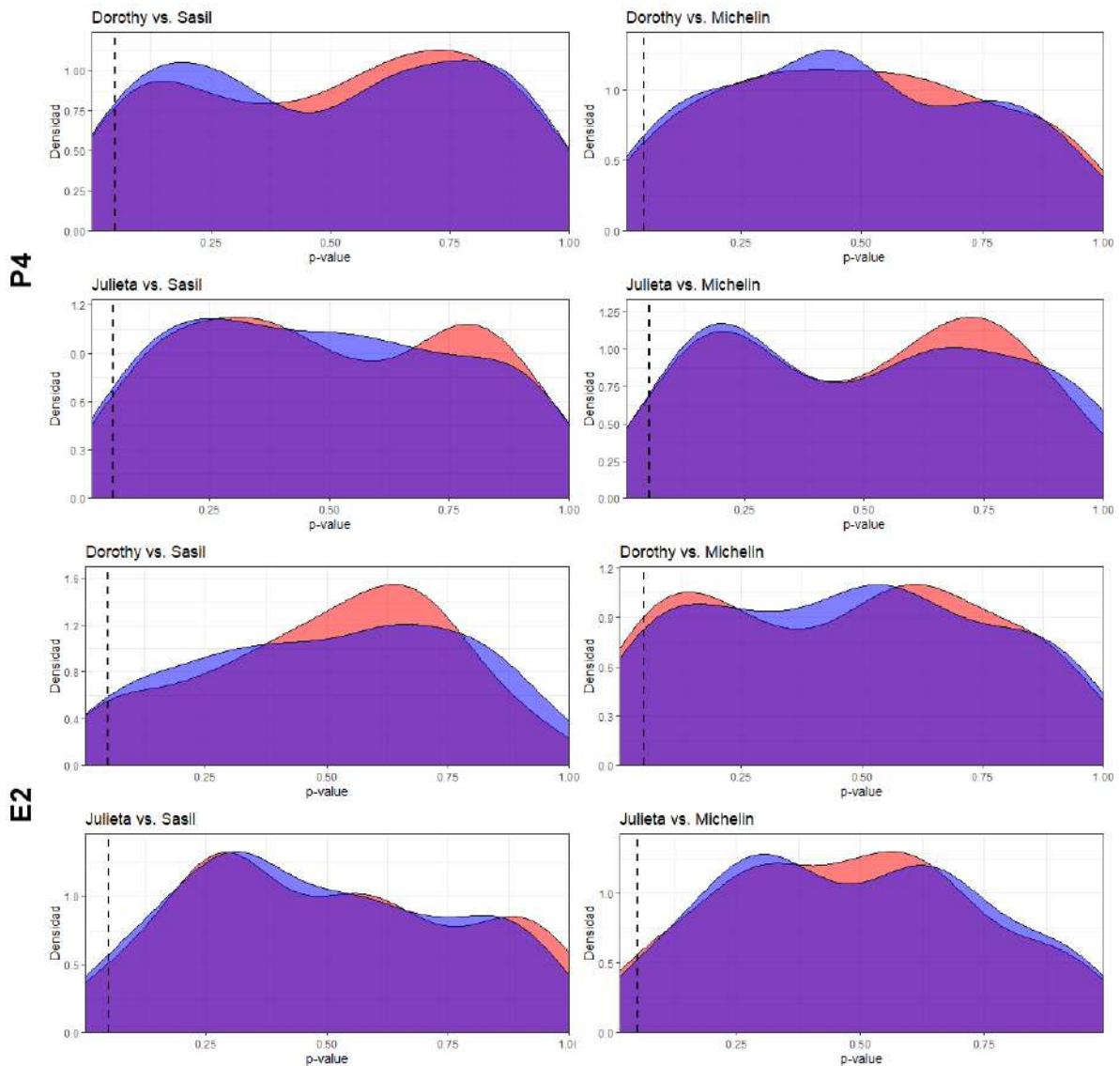


Figura 9. Gráficas de densidad de Kernel: se presentan para las 100 pseudoreplicas de las pruebas de correlación. Las curvas en azul corresponden a Spearman y las curvas en rojo a Kendall. El eje x muestra la distribución de frecuencia de los valores p.

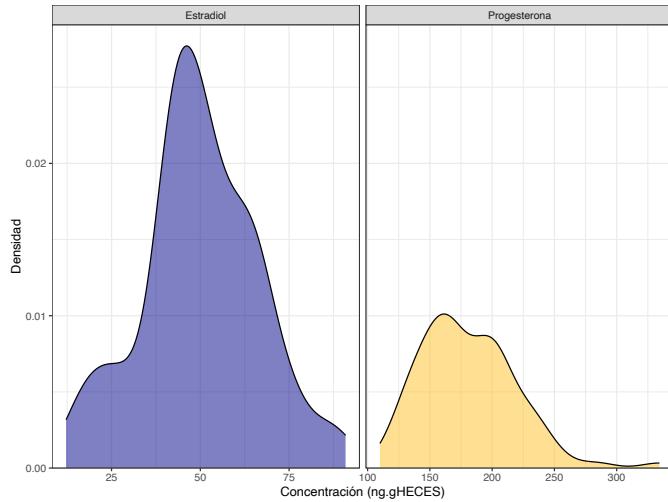


Figura 10. Distribución de datos de densidad de Estradiol y Progesterona en hembras de manatí antillano bajo cuidado profesional. Se observa que los valores de densidad de Estradiol se organizan de manera levemente asimétrica, mientras que los de Progesterona presentan una leve asimetría a la derecha, por lo cual, no cumplen con el supuesto de normalidad.

Por otra parte, en la **Figura 11** se observa que no hay diferencias significativas en las medias de las concentraciones de los esteroides evaluados entre individuos. Lo anterior, se encuentra soportado por el estadístico de Skillings-Mackin, para progesterona (P4) (p -value = 0,103123, $d.f = 34$, para 10000 repeticiones) y estradiol (E2) (p -value = 0,276130, $d.f = 34$, para 10000 repeticiones). Sin embargo, se observan unos cuantos valores atípicos para los individuos Julieta y Sasil en progesterona (P4) y Michelin y Sasil en estradiol (E2), lo cual puede deberse a factores externos.

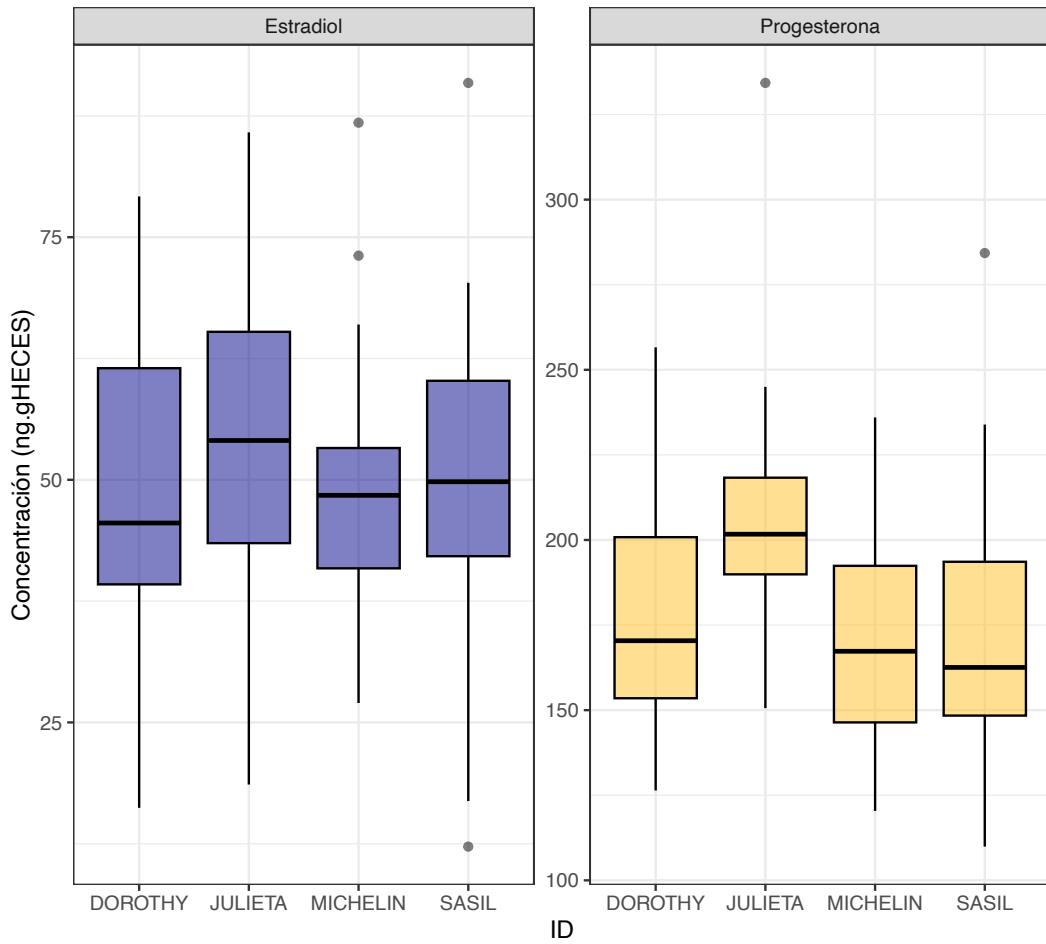


Figura 11. En el Box-plot se observa que no hay una posible diferencia significativa en las medias de las concentraciones de los esteroides evaluados entre individuos en hembras de manatí antillano bajo cuidado profesional.

Los resultados en la prueba correlación (ρ = Spearman y τ = Kendall) indicaron que no hay evidencia de que los niveles hormonales se relacionen a nivel individual. A partir de los patrones obtenidos, se observó una fase estrogénica y una fase progestacional, caracterizadas por una relación inversamente proporcional entre las dos hormonas.

Esto indica una interacción regulatoria compleja entre la progesterona y el estradiol, sugiriendo un mecanismo de regulación intrínseco al ciclo estral (**Figura 12**). No obstante, los valores de correlación presentados en la **Tabla 7** no mostraron significancia.

Tabla 7. Coeficientes de correlación (ρ = Spearman y τ = Kendall) entre la hormona P4 y E2 para cada individuo.

Individuo	Coeficientes
Julietta	$\rho = 0,343 (0,139)$ $\tau = 0,197 (0,229)$
Dorothy	$\rho = 0,108 (0,583)$ $\tau = 0,070 (0,607)$
Michelin	$\rho = -0,159 (0,556)$ $\tau = -0,127 (0,498)$
Sasil	$\rho = 0,175 (0,414)$ $\tau = 0,095 (0,519)$



Figura 12. Representación grafica de los patrones hormonales de progesterona (P4) y estradiol (E2) en hembras puberas (Julieta y Dorothy) y prepuberas (Michellin y Sasil).

IX. DISCUSIÓN

9.1. Monitoreo hormonal no invasivo

Las determinaciones de las concentraciones hormonales en los manatíes se han realizado tradicionalmente en plasma o suero sanguíneo (Brammer-Robbins et al., 2023, Tighe et al., 2016 y Ortiz et al., 2000). No obstante, la recolección de sangre implica manipulación directa e invasiva de los animales lo cual, en el caso de especies silvestres, conlleva procedimientos de captura y manejo costosos y estresantes (Amaral et al., 2013). Incluso, en situaciones donde los manatíes en cautiverio están entrenados para la recolección de sangre, la frecuente manipulación puede acarrear problemas como flebitis (Amaral et al., 2009; Amaral, 2010). Además, representan un obstáculo para el monitoreo hormonal continuo requerido en estudios longitudinales, como aquellos enfocados en ciclos estrales.

El análisis de los metabolitos esteroidales urinarios y/o fecales puede ser potencialmente útil en la evaluación del ciclo estral (Larkin, 2000 y Horikoshi, 2004), la gestación (Burgess et al., 2012), madurez sexual (Lanyon & Burgess 2014), el comportamiento reproductivo y los patrones estacionales (Morales-Vela et al., 2000) en una amplia gama de especies de mamíferos. Los ensayos inmunológicos que utilizan anticuerpos específicos para estrógenos o anticuerpos contra estrógenos totales no conjugados se han mostrado especialmente fiables ejemplos de ellos son las especies cuya placenta es una fuente significativa de estrógenos (Schwarzenberger et al., 1996).

En este estudio se ha logrado, por primera vez, aplicar con éxito la evaluación endocrina mediante análisis de muestras fecales en hembras de manatí antillano bajo cuidado profesional. Se empleó la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) utilizando un kit comercial de la marca DetectX®, que demostró ser eficiente y fácil de manejar durante el proceso de extracción. Los resultados obtenidos en las concentraciones hormonales fueron muy específicos, estableciendo valores de referencia para estradiol y progesterona. Aunque técnicas como el radioinmunoanálisis (RIA) pueden ofrecer mayor especificidad y precisión, el ELISA es preferido debido a su menor impacto ambiental y requisitos menos estrictos en términos de manejo de residuos y capacitación especializada necesaria para su ejecución. Este avance metodológico no solo proporciona una base sólida para futuras investigaciones, sino que también apoya la gestión endocrinológica orientada a la conservación de estos mamíferos marinos, tanto en cautiverio como en su hábitat natural.

Un aspecto crucial de la recolección de muestras fue la minimización del estrés en los manatíes. Para ello, se empleó el condicionamiento operante con refuerzo positivo, facilitando así la entrega voluntaria de las heces por parte de los animales. Esta aproximación permitió recolectar las muestras directamente de los ejemplares, lo que redujo significativamente las posibilidades de contaminación entre individuos o del agua. Esta técnica de recolección no invasiva posibilita la realización de monitoreos a largo plazo, disminuyendo la manipulación directa de los manatíes y evitando prácticas que requieran su contención o extracción del agua.

Los resultados obtenidos mediante este método han demostrado ser confiables, como han reportado previamente otros autores en estudios similares (Larkin ,2000; Horikoshi, 2004;

Burgess et al., 2012; Burgess et al., 2013 y Amaral, 2010). La capacidad de obtener datos hormonales precisos con un impacto mínimo en el bienestar de los animales subraya el valor de este enfoque para el estudio continuo y la conservación efectiva de los manatíes antillanos bajo cuidado humano.

Se sabe que, aunque los niveles de progesterona en sangre en manatí de la Florida son reducidos, resultan ser adecuados para sostener la gestación (Tripp et al., 2009). Esto indica una utilización altamente eficiente de la progesterona (P4) por parte de los manatíes, lo cual resultaría en una presencia mínima de progestinas libres en la circulación periférica. En la **Tabla 8** se exponen los valores de referencia de concentraciones de metabolitos esteroideos reportados en investigaciones anteriores sobre manatíes bajo cuidado profesional. Sin embargo, es importante advertir que no es posible hacer una comparación directa de concentraciones hormonales entre distintas especies y subespecies del orden Sirenia, debido a las variaciones en las matrices de muestreo y en las técnicas de extracción utilizadas en cada estudio. A pesar de las limitaciones inherentes a los métodos usados, es factible analizar los patrones cílicos en la fluctuación de los metabolitos hormonales a lo largo de los períodos de muestreo. En general, los resultados indican que en los sirenios se presenta una relación inversamente proporcional entre las hormonas progesterona (P4) y estradiol (E2).

Cabe destacar que los niveles de ambas hormonas en sirenios son considerablemente más bajos en comparación con otras especies de mamíferos. Por ejemplo, en los elefantes se han documentado concentraciones hormonales bajas y fases lúteas prolongadas, con períodos de hasta 10 semanas de aumento en las concentraciones de progesterona entre las fases foliculares y el estro, (Comizzoli et al., 2019; Larkin, 2000 y Horikoshi, 2004). Este contraste en los niveles hormonales y la duración de las fases lúteas entre sirenios y otros mamíferos grandes como los elefantes resalta las diferencias significativas en los mecanismos de regulación endocrina y reproductiva entre estas especies.

Tabla 8. Concentraciones hormonales de Sirenias en diferentes matrices de monitoreo.

Especie	Valores de referencia Sirenia					Matriz	Referencia		
	Concentración de Progesterona (P4)		Concentración de Estradiol (E2)						
	Max	Min	Max	Min					
<i>Dugong dugón</i>	1,94 ng/mgCr	0,01 ng/mgCr	0,9 ng/mgCr	23,7 pg/mg Cr	Orina	Wakai et al., 2002			
<i>Trichechus inunguis</i>	62,89 pg/mL	2,84 pg/mL	19,64 pg/ml	4,26 pg/ml	Saliva	Amaral et al., 2013			
<i>T. m. latirostris</i>	102,66 ng/g	5,06 ng/g	128,19 ng/g	5,00 ng/g	Heces	Horikoshi, 2004			
<i>T. m. manatus</i> .	334,3 ng/g	109,9 ng/g	90,9 ng/g	12,2 ng/g	Heces	Este estudio			

9.2. Madurez sexual

Durante esta investigación se contó con datos preexistentes sobre la edad y estado médico de las manatíes estudiadas. Sin embargo, a través del análisis de las concentraciones de progesterona (P4) y estradiol (E2), no fue posible identificar diferencias fisiológicas entre individuos púberes y prepúberes. Este escenario es consistente con las observaciones de Larkin (2000) y Horikoshi (2004), quienes también reportaron una amplia variabilidad en las concentraciones hormonales entre hembras de manatí de la Florida de diferentes edades, y en algunos casos, niveles tan bajos que no fueron detectables por radioinmunoensayo (RIA).

En este estudio se observó que Sasil, una hembra prepúber de dos años, presentaba niveles fluctuantes de estradiol (E2), generalmente altos en comparación con las hembras adultas, lo que sugiere que podría estar iniciando su pubertad. Lo anterior, es consistente con el estudio de Burgess et al. (2013) quienes reportaron que los niveles de estradiol (E2) en una hembra de dos años mostraron una tendencia general al aumento. A los tres años, las concentraciones basales de estradiol (E2) superaron los niveles registrados en todas las hembras de dugongos silvestres, independientemente de su tamaño corporal o estado reproductivo. A partir de estos hallazgos, se pudo inferir que esta hembra alcanzó la madurez sexual a los cinco años de edad.

Las concentraciones hormonales resultaron similares entre los distintos individuos. Esta falta de variación significativa podría estar influenciada por múltiples factores. Para establecer esta relación de manera concluyente, se requieren estudios más extensos que permitan registrar una ventana de tiempo más amplia y que incluyan muestreos diarios, así como un número mayor de individuos. Así mismo, estos estudios se deben complementar con análisis citológicos vaginales, ecografías y evaluaciones etológicas (Larkin, 2000; Horikoshi, 2004; Morales-Vela et al., 2000; Biancani et al., 2009).

9.3. Fisiología reproductiva y comportamiento

A partir de los datos recolectados, se observó una fase estrogénica y una fase progestacional, caracterizadas por una relación inversamente proporcional entre las dos hormonas. Esto indica una interacción regulatoria compleja entre la progesterona y el estradiol, sugiriendo un mecanismo de regulación intrínseco al ciclo estral. Estos resultados resaltan la complejidad de interpretar los perfiles hormonales en manatíes y la necesidad de integrar múltiples indicadores para una evaluación más precisa de su estado fisiológico y reproductivo. Además, los hallazgos enfatizan la importancia de contemplar factores ambientales, así como las condiciones de manejo, en la fisiología reproductiva de sirenios, y destacan la variabilidad intrínseca en la maduración sexual dentro de este grupo de mamíferos marinos. Por lo tanto, es necesario considerar tantos factores genéticos, como ambientales, al estudiar y gestionar la reproducción, así como, la conservación de estas especies.

Aunque las mediciones de las concentraciones hormonales no revelaron diferencias significativas entre hembras prepúberes y púberes en términos de progesterona (P4) y estradiol (E2), los individuos analizados mostraron patrones similares. Lo anterior sugiere una actividad endocrina con fases estrogénicas y progestacionales detectadas. Sin embargo,

no se puede determinar si estaban concluyendo o comenzando un nuevo ciclo estral. Es posible que las hembras estuvieran en una fase anestral durante el periodo de muestreo, debido a la ausencia de signos evidentes de estro, como cambios de comportamiento, exposición del clítoris o receptividad. Esta condición podría estar influenciada por variables externas, como el grupo social, incluyendo la temporada del año en que se realizó el muestreo.

9.4. Estacionalidad reproductiva

Los estudios de Best (1982) y Castelblanco-Martínez et al (2009a) mencionan la naturaleza estacional de los comportamientos reproductivos de los manatíes. En este estudio, se determinó una temperatura promedio de 29 °C, sin descensos inferiores a 28 °C ni ascensos superiores a 30 °C. Por lo tanto, la temperatura del agua no parece estar asociada a los eventos reproductivos en este estudio. Sin embargo, en otros mamíferos marinos como *Zalophus californianus*, se ha observado que las concentraciones de progesterona en heces aumentan cuando el fotoperiodo se acorta en octubre y febrero (Morales-Vela et al., 2000), sugiriendo que esta variable debería considerarse.

Amaral et al. (2015) reportaron, concentraciones de progesterona salival en *Trichechus inunguis* más elevadas durante los meses de marzo a junio en comparación con el período de septiembre a noviembre. En paralelo, el estradiol alcanzó valores máximos en el mismo intervalo de marzo a junio. Es importante recalcar que, este estudio se basó en la saliva como matriz para el monitoreo hormonal, lo que intrínsecamente limita la posibilidad de comparar estos resultados con los obtenidos a través de otras matrices, ya que distintos tipos de muestras pueden reflejar diferencias significativas en las concentraciones hormonales. Sin embargo, es posible realizar comparaciones en los perfiles hormonales. Horikoshi (2004) realizó observaciones en *Trichechus manatus latirostris*, identificando que su temporada reproductiva se concentra en el verano, aunque se reportaron niveles de progesterona relativamente bajos durante la primavera y más elevados en el invierno y el verano. Este último periodo coincidió con un aumento en la cantidad de fases lúteas. Estos hallazgos sugieren que el manatí de Florida, al menos en condiciones de cautiverio, no sigue un patrón reproductivo estacional estricto. Este resultado contrasta con los descubrimientos de Larkin (2000), quien registró variaciones estacionales en las hormonas reproductivas de los manatíes, con niveles más altos durante la primavera y el otoño, basándose en un estudio realizado en 1996 con doce hembras en cautiverio en Estados Unidos.

Además, estudios en manatíes de la Florida bajo cuidado profesional han descartado la estacionalidad reproductiva, ya que los niveles de progesterona fueron bajos en primavera y muy altos durante el invierno y el verano, lo que indica que no hay un patrón estacional en cautiverio (Larkin, 2000; Horikoshi, 2004). Para establecer definitivamente la existencia de un patrón estacional, sería necesario realizar un monitoreo a lo largo de un año completo que permita evaluar todas las estaciones del año y determinar si esta subespecie sigue una dinámica similar a las ya reportadas.

9.5. Otros factores asociados a la reproducción

En este estudio, las hembras estaban agrupadas en un ambiente exclusivamente femenino durante un periodo extenso. Esta dinámica podría ser un elemento crítico en la modulación del ciclo estral. Es importante considerar que la ausencia de machos, y por ende, la falta de estímulo copulatorio y de exposición a feromonas masculinas, haya contribuido a la no manifestación de signos de estro (Poole, 1985). En otras especies la presencia de machos puede ser un factor inductor de la ovulación (Larkin, 2000). En muchas especies, la orina puede contener secreciones olorosas que transmiten mensajes dentro de un grupo social. Este es un método común por el cual las hembras de los mamíferos señalan que están en celo (Poole, 1985).

En este grupo de hembras manatí antillano, las dos adultas previamente han demostrado ciclos estrales efectivos y capacidad reproductiva confirmada por partos anteriores, lo que indica una función reproductiva normal al momento del muestreo. En contraste, las hembras prepúberes no habían tenido contacto con machos, una situación que puede repercutir significativamente en la activación o retraso de su ciclo reproductivo. Esta ausencia de interacción directa con machos plantea preguntas sobre el impacto de la dinámica social y las señales reproductivas en la regulación del ciclo estral en *Trichechus manatus manatus*, subrayando la necesidad de investigar más sobre cómo la interacción entre los sexos influye en la fisiología reproductiva del ciclo estral en *Trichechus manatus manatus*.

9.6. Duración del ciclo estral

La descripción y la duración del ciclo estral de las cuatro hembras de manatí antillano analizadas no pudo determinarse debido a que el tiempo de muestreo fue insuficiente. Además, las muestras fueron recolectadas de manera irregular, ya que en algunos días los animales mostraron comportamientos poco receptivos durante la recolección y en ocasiones no se disponía de heces. Esto ocasionó huecos en los perfiles hormonales. Se recomienda realizar monitoreos más prolongados con recolecciones día por medio, con una duración mínima de un año, para poder replicar varias veces el patrón hormonal. De esta manera, se podría determinar la cantidad de picos de progesterona (P4) y estradiol (E2) que se presentan durante el ciclo estral, la duración del mismo, así como los efectos ocasionados por la estación del año.

Larkin (2000) y Horikoshi (2004) reportaron que la duración del estro en *Trichechus manatus latirostris* oscila entre 28 y 42 días, basándose en análisis de muestras fecales. En una línea similar, Wakai et al. (2002) informaron que el ciclo estral en *Dugong dugón* tiene una duración promedio de 53,6 días, utilizando como indicadores los picos de progesterona en muestras urinarias. Amaral et al. (2013) encontraron que el ciclo estral del *Trichechus inunguis* varía entre 42 y 48 días, con un promedio de 44,67 días, a través del monitoreo salival. Es importante reconocer que las discrepancias entre los resultados de estos estudios podrían deberse al uso de diferentes matrices de monitoreo hormonal.

Larkin (2000) y Horikoshi (2004) documentaron 34 incrementos en los niveles de estradiol en 11 de 12 hembras analizadas, donde 15 de estos picos estuvieron seguidos por

concentraciones de progesterona inferiores al 40% del rango total. Estos datos sugieren que alrededor de un tercio de los incrementos en estradiol podrían estar asociados con subsecuentes aumentos en la progesterona, con períodos de aproximadamente dos semanas o más. Amaral et al., (2013) en su estudio también reportaron que en los picos de estradiol se observaban niveles basales de progesterona en el manatí amazónico. Por lo cual Larkin (2000) propuso que los picos pueden ser importantes en el comportamiento reproductivo y la atracción masculina.

X. CONCLUSIONES

- Los hallazgos de esta investigación constituyen un valioso punto de partida para establecer los niveles de referencia en cuanto a las concentraciones de esteroides fecales en manatíes antillanos, sentando así las bases para futuros estudios enfocados en el ciclo reproductivo de las hembras de esta subespecie.
- El uso de kits comerciales de la marca DetectX® inmunoenzimáticos (ELISA), resultó ser útil para la cuantificación de esteroides, en este caso P4 y E2 en heces manatíes antillanos bajo cuidado profesional.
- Las concentraciones de P4 y E2 analizadas no evidenciaron una relación directa a nivel individual, sin embargo, lo que sugiere, un patrón inversamente proporcional entre ambas hormonas: a mayores niveles de progesterona corresponden menores concentraciones de estradiol, y viceversa.
- Las concentraciones hormonales de P4 y E2 cuantificadas en este estudio, presentaron un patrón similar entre hembras púberes y prepúberes, dificultando observar una diferencia entre ambos estadios reproductivos. Por lo anterior, se sugiere que los animales muestreados podrían estar en una fase acíclica debido a factores externos.
- Los patrones hormonales observados en este estudio muestran una correspondencia con hallazgos previamente reportados por otros investigadores en estudios sobre el orden Sirenia. Se sugiere que existen similitudes en los perfiles de P4 y E2, dado que se observan coincidencias en las fluctuaciones de estas hormonas, sugiriendo que se producirán varios picos de E2 antes de que inicie la fase lútea.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amaral, R. S. (2010). Use of alternative matrices to monitor steroid hormones in aquatic mammals: a review. *Aquatic Mammals*, 36(2), 162–171. <https://doi.org/10.1578/am.36.2.2010.162>
- Amaral, R. S., Rosas, F. C., Da Silva, V. M., Nichi, M., & Oliveira, C. A. (2013). Endocrine monitoring of the ovarian cycle in captive female Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). *Animal Reproduction Science*, 142(1–2), 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.09.001>
- Amaral, R. S., Rosas, F. C. W., Da Silva, V. M. F., Graham, L. H., Viau, P., Nichi, M., & Oliveira, C. A. (2014). Seasonal variation in urinary and salivary reproductive hormone levels in Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). *Reproduction Fertility and Development*, 27(7), 1065. <https://doi.org/10.1071/rd13334>
- Anderson, P. K. (2002). Habitat, Niche, and Evolution of Sirenian Mating Systems Journal of Mammalian Evolution. *Journal of Mammalian Evolution*, 9(1–2), 55–98. <https://doi.org/10.1023/a:1021383827946>
- Best, R. C. (1982). Seasonal Breeding in the Amazonian Manatee, *Trichechus inunguis* (Mammalia: Sirenia). *Biotropica*, 14(1), 76. <https://doi.org/10.2307/2387764>
- Bezerra, A. R., Salmito-Vanderley, C. S., Bersano, P. R., Carvalho, V. L., Meirelles, A. C., Attademo, F. L., Luna, F. O., & Silva, L. D. (2018). Histological characterization of reproductive tract and fetal annexes of the West Indian Manatee (*Trichechus manatus*) from Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(11), 2166–2174. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5707>
- Bonde, R. K., O'shea, T. J., & Beck, C. A. (1983). Manual of procedures for the salvage and necropsy of carcasses of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*). Report of National Technical Information Service. Springfield, Virginia, United States.
- Brammer-Robbins, E., Nouri, M., Griffin, E. K., Aristizabal-Henao, J., Denslow, N. D., Bowden, J. A., Larkin, I. V., & Martyniuk, C. J. (2023). Assessment of lipids and adrenal hormones in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) from different habitats. *General and Comparative Endocrinology*, 337, 114250. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2023.114250>
- Biancani, B., Da Dalt, L., Lacave, G., Romagnoli, S., & Gabai, G. (2009). Measuring fecal progestogens as a tool to monitor reproductive activity in captive female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Theriogenology*, 72(9), 1282–1292. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.025>
- Brown, J. L. (2000). Reproductive endocrine monitoring of elephants: an essential tool for assisting captive management. *Zoo Biology*: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association, 19(5), 347–367.
- Brown, J., Walker, S., & Steinman, K. (2004). Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. *Endocrine research laboratory, Department of reproductive sciences, Conservation and research center, National zoological park, Smithsonian institution, Handbook*, 1, 93.
- Burgess, E. A., Blanshard, W. H., Barnes, A. D., Gilchrist, S., Keeley, T., Chua, J., & Lanyon, J. M. (2013). Reproductive hormone monitoring of dugongs in captivity: Detecting the onset of sexual maturity in a cryptic marine mammal. *Animal*

- Reproduction Science*, 140(3–4), 255–267.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.06.005>
- Burgess, E. A., Lanyon, J. M., Brown, J. L., Blyde, D., & Keeley, T. (2012). Diagnosing pregnancy in free-ranging dugongs using fecal progesterone metabolite concentrations and body morphometrics: A population application. *General and Comparative Endocrinology*, 177(1), 82–92.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.02.008>
- Castelblanco-Martínez, D. N., Bermúdez-Romero, A. L., Gómez-Camelo, I. V., Rosas, F. C. W., Trujillo, F., & Zerda-Ordoñez, E. (2009). Seasonality of habitat use, mortality and reproduction of the Vulnerable Antillean manatee *Trichechus manatus manatus* in the Orinoco River, Colombia: implications for conservation. *Oryx*, 43(02), 235.
<https://doi.org/10.1017/s0030605307000944>
- Castelblanco-Martínez, D. N., Morales-Vela, B., Hernández-Arana, H. A., & Padilla-Saldivar, J. (2009). Diet of the manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Chetumal Bay, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 7(1–2).
<https://doi.org/10.5597/lajam00132>
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (2020). Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(24), 13596–13602.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1922686117>
- Chatfield, M., & Mander, A. (2009). The Skillings–Mack Test (Friedman Test when There are Missing Data). *The Stata Journal Promoting Communications on Statistics and Stata*, 9(2), 299–305. <https://doi.org/10.1177/1536867x0900900208>
- Colmenero, L. D. C., & Zavala, M. E. H. (2022). Distribución de los manatíes, situación y su conservación en México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, Serie Zoología*, Vol. 38-75, 56(3), 955–1020.
- Comizzoli, P., Brown, J. L., & Holt, W. V. (2019). Reproductive sciences in animal conservation. In *Advances in experimental medicine and biology*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-23633-5>
- De Souza Amaral, R., Rosas, F. C. W., Viau, P., Neto, J. a. D., Da Silva, V. M. F., & De Oliveira, C. A. (2009). Noninvasive Monitoring of Androgens in Male Amazonian Manatee (*Trichechus inunguis*): Biologic Validation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(3), 458–465. <https://doi.org/10.1638/2008-0111.1>
- Di Martino, S., & Carro, N. (2018). Proyecto de reintroducción del yaguareté (*Panthera onca*) en el Parque Iberá, Corrientes, Argentina. Informe presentado al Ministerio de Medio Ambiente de la Nación.
- Francis-Floyd, R., White, J. R., Chen, C. L., Cardeilhac, P. T., & Cichra, C. E. (1991). Communications: Serum Progesterone and Estradiol Concentrations in Captive Manatees *Trichechus manatus*. *Journal of aquatic animal health*, 3(1), 70–73.
- Gonzalez-Socoloske, D., & Olivera-Gomez, L. D. (2012). Gentle giants in dark waters: using side-scan sonar for manatee research. *The Open Remote Sensing Journal*, 5(1), 1–14.
- Goździewska-Harłajczuk, K., Klećkowska-Nawrot, J., & Dzimira, S. (2017). The presence of ovarian cysts in a captive Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus* L. 1758). *BMC Veterinary Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1164-7>
- Hamlett, W. C. (1992). Reproductive biology of South American vertebrates. In *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2866-0>

- Hartman, D. S. (1979). Ecology and behavior of the manatee (*Trichechus manatus*) in Florida. Harvard University, Museum of Comparative Zoology. American Society of Mammalogists. Book.
- Horikoshi, C. (2004). Effect of hormonal and temporal factors on captive female manatee (*Trichechus manatus latirostris*) behavior. Thesis Master of Science in Biology, Georgia Southern University, United State.
- Lanyon, J. M., & Burgess, E. A. (2014). Methods to examine reproductive biology in Free-Ranging, Fully-Marine mammals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 753, 241–274. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0820-2_11
- Larkin, I. L. V. (2000). *Reproductive endocrinology of the Florida manatee (Trichechus manatus latirostris): estrous cycles, seasonal patterns and behavior*. PhD doctoral thesis University of Florida, United State.
- Larkin, I. L. V., Gross, T. S., & Reep, R. L. (2005). Use of Faecal Testosterone Concentrations to Monitor Male Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*) Reproductive Status. *Aquatic Mammals*, 31(1), 52–61. <https://doi.org/10.1578/am.31.1.2005.52>
- Larkin, I. L., Fowler, V. F., & Reep, R. L. (2007). Digesta passage rates in the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). *Zoo Biology*, 26(6), 503–515. <https://doi.org/10.1002/zoo.20150>
- Marsh, H., O'Shea, T. J., & Reynolds, J. E. (2011). *Ecology and conservation of the Sirenia: dugongs and manatees*, 18. Book. Cambridge University Press. United States.
- Morales-Vela, B., Olivera-Gómez, D., Reynolds, J. E., III, & Rathbun, G. B. (2000). Distribution and habitat use by manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Belize and Chetumal Bay, Mexico. *Biological Conservation*, 95(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/s0006-3207\(00\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s0006-3207(00)00009-4)
- O'Brien, J. K., & Robeck, T. R. (2010). The value of ex situ cetacean populations in understanding reproductive physiology and developing assisted reproductive technology for ex situ and in situ species management and conservation efforts. *International Journal of Comparative Psychology*, 23(3). <https://doi.org/10.46867/ijcp.2010.23.03.11>
- O'Shea, T. J., Beck, C. A., Hodgson, A. J., Keith-Diagne, L., & Marmontel, M. (2022). Social and reproductive behaviors. In *Ethology and behavioral ecology of marine mammals* (101–154). https://doi.org/10.1007/978-3-030-90742-6_4
- Olivera-Gómez, L. D., Jiménez-Domínguez, D., Morales-Vela, B., & García-Herrera, J. L. (2022). Distribución espacial del manatí en la planicie costera del sur del Golfo de México. *Ecosistemas Y Recursos Agropecuarios*, 9(2). <https://doi.org/10.19136/era.a9n2.3144>
- Ortiz, R. M., Mackenzie, D. S., & Worthy, G. A. (2000). Thyroid hormone concentrations in captive and free-ranging West Indian manatees (*Trichechus manatus*). *Journal of Experimental Biology*, 203(23), 3631–3637.
- Parsad, R. (2002). Non-parametric methods in analysis of experimental data. *Design and Analysis of Agricultural Experiments*. New Delhi, India: Indian Agricultural Statistics Research Institute, 693–694.
- Pomeroy, P. (2010). Reproductive cycles of marine mammals. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.021>
- Poole, T. B. (1985). Social behaviour in mammals. In *Springer eBooks*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2345-7>

- Puc-Carrasco, G., Morales-Vela, B., Olivera-Gomez, L. D., & González-Solís, D. (2017). First field-based estimate of Antillean manatee abundance in the San Pedro River system suggests large errors in current estimates for Mexico. *Ciencias Marinas*, 43(4). <https://doi.org/10.7773/cm.v43i4.2704>
- Puc-Carrasco, G., Olivera-Gómez, L. D., Arriaga-Hernández, S., & Jiménez-Domínguez, D. (2016). Relative abundance of Antillean manatees in the Pantanos de Centla Biosphere Reserve in the coastal plain of Tabasco, Mexico. *Ciencias Marinas*, 42(4). <https://doi.org/10.7773/cm.v42i4.2678>
- Reid, J. P., Bonde, R. K., & O'Shea, T. J. (1995). Reproduction and mortality of radio-tagged and recognizable manatees on the Atlantic coast of Florida. Report *Population biology of the Florida manatee*, Florida United States.
- Reynolds III, J. E., & Rommel, S. A. (1996). Structure and function of the gastrointestinal tract of the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris*. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 245(3), 539-558.
- Reynolds III, J. E., Rommel, S. A., & Pitchford, M. E. (2004). The likelihood of sperm competition in manatees-explaining an apparent paradox. *Marine Mammal Science*, 20(3), 464-476.
- Robeck, T. R., Curry, B. E., McBain, J. F., & Kraemer, D. C. (1994). Reproductive biology of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the potential application of advanced reproductive technologies. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25(3), 321-336. American Association of Zoo Veterinarians. United State.
- Robeck, T., Steinman, K., Gearhart, S., Reidarson, T., McBain, J., & Monfort, S. (2004). Reproductive Physiology and Development of Artificial Insemination Technology in Killer Whales (*Orcinus orca*). *Biology of Reproduction*, 71(2), 650-660. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.027961>
- Rodas-Trejo, J., Romero-Berny, E. I., & Estrada, A. (2008). Distribution and Conservation of the West Indian Manatee (*Trichechus manatus Manatus*) in the Catazajá Wetlands of Northeast Chiapas, México. *Tropical Conservation Science*, 1(4), 321-333. <https://doi.org/10.1177/194008290800100403>
- Rodrigues, F. R., Da Silva, V. M. F., Barcellos, J. F. M., & Lazzarini, S. M. (2008). Reproductive Anatomy of the Female Amazonian Manatee *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia: Sirenia). *The Anatomical Record*, 291(5), 557-564. <https://doi.org/10.1002/ar.20688>
- Ronald, K., Selley, L. J., & Amoroso, E. C. (1978). *Biological synopsis of the manatee*. Book. IDRC, Ottawa, ON, CA.
- Sandoval-Zarate, JA, Sánchez-Espinoza, AC (2024). Manejo reproductivo básico en fauna silvestre bajo cuidado profesional. Libro, 1ra Ed. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schwarzenberger, F., Tomášová, K., Holečková, D., Matern, B., & Möstl, E. (1996). *Measurement of fecal steroids in the black rhinoceros (Diceros bicornis) using group-specific enzyme immunoassays for 20-oxo-pregnanes*, New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. 15(2), 159-171.
- Self-Sullivan C, Mignucci-Giannoni A (2008) *Trichechus manatus* ssp. *manatus*. Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2024: e.T22105A43793924. <https://www.iucnredlist.org/species/22105/43793924>

- SEMARNAT, (2020). Programa de Acción para la Conservación de la Especie Manatí de las Antillas (*Trichechus manatus manatus*). SEMARNAT/CONANP, México. Documento digital.
- Skillings, J. H., & Mack, G. A. (1981). On the use of a Friedman-type statistic in balanced and unbalanced block designs. *Technometrics*, 23(2), 171-177.
- Tighe, R. L., Bonde, R. K., & Avery, J. P. (2016). Seasonal response of ghrelin, growth hormone, and insulin-like growth factor I in the free-ranging Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). *Mammalian Biology*, 81(3), 247-254. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2016.02.006>
- Tripp, K., Dubois, M., Delahaut, P., & Verstegen, J. (2009). Detection and identification of plasma progesterone metabolites in the female Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) using GC/MS/MS. *Theriogenology*, 72(3), 365-371. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.03.004>
- Valencia, J. (2023). Pubertad y estacionalidad reproductiva. En: L, Rangel-Porta, JH, Hernández-Medrano (Eds.), *Fisiología reproductiva de los animales domésticos. Segunda Edición*. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México.
- Wakai, Y., Hasegawa, K., Sakamoto, S., Asano, S., Watanabe, G., & Taya, K. (2002). Annual Changes of Urinary Progesterone and Estradiol-17 β of the Dugong (*Dugong dugon*) in Captivity. *Zoological Science*, 19(6), 679-682. <https://doi.org/10.2108/zsj.19.679>
- Wasser, S. K., Monfort, S. L., Southers, J., & Wildt, D. E. (1994). Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. *Reproduction*, 101(1), 213-220.
- Worthy, G. a. J., & Worthy, T. a. M. (2013). Digestive Efficiencies of Ex Situ and In Situ West Indian Manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(1), 77-91. <https://doi.org/10.1086/673545>
- Zamboni, T., Peña, J., Di Martino, S., & Leuchtenberger, C. (2018). Experimental reintroduction of the giant otter (*Pteronura brasiliensis*) in the Iberá Park (Corrientes, Argentina). *CLT The Conservation Land Trust*. Documento digital.
- Zarco, L (2018) Endocrinología En: M., García-Mondragón, F., Jiménez-Orozo, J., Mandoki, N., Mendoza-Patiño, J., Molina-Guarneros, M., Velasco-Velázquez, B., Casa-Tirao, García-Mondragón M, Jiménez-Orozco F, Mandoki J., Doley M, McDonald's., Pineda M, E., Squires 2018, *Fisiología reproductiva de los animales domésticos. Primera Edición*. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México.

ANEXOS

Tabla suplementaria 1 Concentraciones metabolitos hormonales de E2 en heces ng/g en hembras de manatí *Trichechus manatus manatus* bajo cuidado profesional.

Fecha	Sasil	Dorothy	Michelin	Julieta
14/10/22	53	47.1	-	
15/10/22	-	-	-	32.2
16/10/22	-	-	-	
17/10/22	-	32	-	73.1
18/10/22	-		-	-
19/10/22	-	24.6	-	-
20/10/22	50.6	16.2	71.4	-
21/10/22	-	24.8	-	-
22/10/22	40.9	-	-	-
23/10/22	-	-	-	-
24/10/22	-	41.2	65	-
25/10/22	90.9	42.6	85.8	-
26/10/22	-	41.9	66	51.8
27/10/22	-	44.3	-	-
28/10/22	70.3	40	42.2	-
29/10/22	19.3	-	47.1	46.8
30/10/22	-	-	-	-
31/10/22	41.6	-	-	-
1/11/22	46.4	21.6	26.1	38.1
2/11/22	-	-	-	-
3/11/22	-	39.3	43.9	47.1
4/11/22	62	39	-	30.7
5/11/22	-	-	70.9	27
6/11/22	59.6	44.3	66.5	-
7/11/22	-	-	-	-
8/11/22	47.9	66	-	47.2
9/11/22	67	63	57.3	66
10/11/22	-	-	-	-
11/11/22	-	53.4	18.6	-
12/11/22	56	79.2	49	57.7
13/11/22	48.6	51.4	41.9	-
14/11/22	-	38.1	-	-
15/11/22	49	55.1	41.9	-

16/11/22	41.9	77.3	43.9	-
17/11/22	-	-	-	-
18/11/22	-	-	-	-
19/11/22	-	-	-	-
20/11/22	16.9	-	60.1	50.8
21/11/22	63.5	75.5	-	86.8
22/11/22	66	64	53	49.6
23/11/22	42.2	64	-	-
24/11/22	59.6	-	55.1	-
25/11/22	50.6	53.8	-	-
26/11/22	-	-	-	-
27/11/22	12.2	61	58.7	-
28/11/22	43.2	46.8	-	-

Tabla suplementaria 2 Concentraciones de metabolitos esteroidales de P4 en heces ng/g en hembras de manatí *Trichechus manatus manatus* bajo cuidado profesional.

Fecha	Sasil	Dorothy	Michelin	Julieta
14/10/22	170.4	140.7	-	-
15/10/22	-	-	200.7	-
16/10/22	-	-	-	-
17/10/22	-	172.1	167.3	-
18/10/22	-	-	-	-
19/10/22	-	126.4	-	-
20/10/22	180.4	134.1	-	236.1
21/10/22	-	159.5	-	-
22/10/22	164.1	-	-	-
23/10/22	-	-	-	-
24/10/22	-	198	-	201.7
25/10/22	233.9	203.6	-	203.6
26/10/22	-	170.4	236	221.3
27/10/22	-	240.5	-	-
28/10/22	284.3	139.4	-	187.2
29/10/22	231.8	-	223.4	245
30/10/22	-	-	-	-
31/10/22	144.9	-	-	-
1/11/22	158	164.1	167.3	155
2/11/22	-	-	-	-
3/11/22	-	256.6	152.5	217.3
4/11/22	132.8	159.5	130.4	-
5/11/22	-	-	176.2	196.2
6/11/22	150.6	170.4	-	196.2
7/11/22	-	-	-	-
8/11/22	140.7	153.5	176.2	-
9/11/22	173.7	134.1	130.4	334.3
10/11/22	-	-	-	-
11/11/22	-	156.5	-	194.4
12/11/22	149.1	132.8	120.4	172.1
13/11/22	127.6	199.9	-	190.8
14/11/22	-	182.1	-	201.7
15/11/22	207.4	213.3	-	-
16/11/22	231.8	203.6	134.4	225.5
17/11/22	-	-	-	-

18/11/22	-	-	-	-
19/11/22	-	-	-	-
20/11/22	155	-	165.1	203.6
21/11/22	146.3	167.2	198.1	-
22/11/22	189	192.6	150.4	150.6
23/11/22	109.9	189	-	-
24/11/22	172.1	-	-	164.1
25/11/22	155	153.5	-	-
26/11/22	-	-	-	-
27/11/22	161	203.6	190.5	215.3
28/11/22	211.3	203.6	-	-

Tabla suplementaria 3 Temperatura del agua mes de octubre, locación Puerto Aventuras, estado de Quintana Roo – México lugar donde se llevó a cabo el estudio

Temperatura < 30 °C Puerto Aventuras				
Fecha/Hora	05:33	11:33	17:33	23:33
01/10/2022	29.81	30.33	30.67	30.2
02/10/2022	30.11	30.28	30.54	29.81
03/10/2022	29.86	30.28	30.33	29.9
04/10/2022	30.24	30.59	30.59	30.2
05/10/2022	30.28	30.33	30.37	30.16
13/10/2022	29.3	29.81	30.33	30.16
14/10/2022	29.64	30.07	30.33	30.07
15/10/2022	29.73	29.77	30.03	29.98
16/10/2022	29.6	29.6	30.07	30.07
17/10/2022	29.56	29.3	29.38	29.43
18/10/2022	29.38	29.94	29.73	29.47
19/10/2022	29.34	29.77	29.64	29.47
20/10/2022	29.51	29.6	29.6	29.43
21/10/2022	29.43	29.43	29.47	29.08
22/10/2022	29.08	29.26	29.51	29.13
23/10/2022	28.78	29.38	29.6	29.34
24/10/2022	29	29.38	29.51	29.34
25/10/2022	28.87	29.56	29.51	29.43
26/10/2022	29.08	29.56	29.73	
27/10/2022	28.95	29.81	29.81	29.64
28/10/2022	29.13	29.6	29.73	29.6
29/10/2022	29.17	29.47	29.64	29
30/10/2022	28.87	29.73	29.47	28.91
31/10/2022	29.13	29.64	30.03	29.13

Temperatura promedio: 29.67

Tabla suplementaria 4 Temperatura del agua mes de noviembre, locación Puerto Aventuras, estado de Quintana Roo – México lugar donde se llevó a cabo el estudio

Temperatura < 30 °C Puerto Aventuras				
Fecha/Hora	5:33	11:33	17:33	23:33
1/11/22	29.3	29.64	29.9	29
2/11/22	29.26	29.04	28.83	28.83
3/11/22	28.87	29	29	28.83
4/11/22	28.74	29.08	29.21	28.78
5/11/22	28.74	29.08	29.43	29.13
6/11/22	28.74	29.34	29.43	29.26
7/11/22	28.74	29.38	29.3	29.08
8/11/22	28.61	29.26	29.13	29
9/11/22	28.87	29	29	28.83
10/11/22	28.74	29.08	29.21	28.78
11/11/22	28.74	29.08	29.43	29.13
12/11/22	28.74	29.34	29.43	29.26
13/11/22	28.74	29.38	29.3	29.08
14/11/22	28.61	29.26	29.13	29
15/11/22	28.57	29.13	29.43	29.34
16/11/22	29.21	29.43	29.68	29.26
17/11/22	29.13	29.17	29.43	29
18/11/22	29.08	28.95	29.3	28.95
19/11/22	28.95	29.08	29.34	29
20/11/22	28.87	29.21	28.47	29.26
21/11/22	28.95	29.3	29.47	29.34
22/11/22	28.78	29.34	29.43	29.43
23/11/22	29.21	29.43	29.68	29.26
24/11/22	29.13	29.17	29.43	29
25/11/22	29.08	28.95	29.3	28.95
26/11/22	28.95	29.08	29.34	29
27/11/22	28.87	29.21	28.47	29.26
28/11/22	28.95	29.3	29.47	29.34
29/11/22	28.78	29.34	29.43	29.43

Temperatura promedio: 29.12