



EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR

Evaluación de la concentración de metales en tejido óseo de manatíes (*Trichechus manatus manatus*) en dos regiones de México

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de

Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Por

Ana Gabriela Romero Calderón

2014

Al “Poder Supremo y Conciencia” que siempre me mueve, guía y fortalece.

A toda mi familia porque son la mejor que puedo tener y porque los llevo conmigo siempre. A Ángel por hacerme una tía feliz. A la memoria de los abuelos que fueron como mis padres, por lo que en mí sembraron.

A Rugas “el perro-manatí” por la inspiración y como promesa a una amiga, por esos seres con “cachetes de manatí” y cola, “amigos callejeros” que nos alegran la vida y endulzan los momentos.

A ti, sirena en ocaso que aunque dé otro paso no me olvidaría de ti y de todo lo que aprendí...

AGRADECIMIENTOS

Considero que este trabajo es el resultado del esfuerzo y compromiso de todos los integrantes y que no podría haber alcanzado esta meta sin todo su apoyo.

Agradezco profundamente al director de este trabajo, el Dr. Benjamín Morales Vela, quién me recibió como su estudiante durante el segundo año de este posgrado, porque amablemente aceptó el reto de enseñarme y formarme, sobre todo porque me mostró el lado humano. ¡Gracias infinitas por devolverme la esperanza y confiar en mí!

Al M en C. René Rosiles Martínez, por toda su ayuda en el procedimiento de laboratorio, comentarios y consejos que refuerzan este estudio. También agradezco al Dr. José Rogelio Cedeño Vázquez por su tiempo y su amable ayuda en la elaboración de este documento, al Dr. León David Olivera Gómez por sus observaciones y al Dr. Alberto Delgado Estrella por sus valiosos comentarios que pulieron este escrito. Gracias a todos por la amabilidad, compromiso y dedicación. Expreso también un sincero agradecimiento a los sinodales: al Dr. David González Solís, al Dr. Juan Carlos Pérez Jiménez y a la Dra. Teresa Álvarez Legorreta, por sus comentarios precisos y por su amable enseñanza.

A CONACYT por la beca otorgada (No. 355408) y al Laboratorio de Toxicología de la FMVZ-UNAM. Al Museo de Zoología ECOSUR-Chetumal y la Región Naval 3, Campeche por el uso de la colección de mamíferos acuáticos.

A Carlos Trillanes Flores por toda su infinita ayuda, por convertirse en un gran amigo y extenderme su mano en todo momento. También aprovecho para dirigir mi gratitud al Dr. Luis Brunett Pérez porque me motivó a continuar sendero en la investigación.

Doy un profundo agradecimiento a la Dra. Elisa Ruiz Izaguirre, al Dr. David González Solís y al M en C. Sergio Guerrero, asesores que tuve durante el primer año de posgrado por sus palabras de aliento para continuar, además de su neutralidad y objetividad siempre, por sus correcciones y porque aunque quedamos en fase de protocolo sus comentarios son muy útiles para que pueda retomar mi idea. Gracias de corazón.

A la familia Ramírez Velázquez y a Darío, porque a pesar de la distancia los siento cerca en los momentos difíciles, y porque siempre me reciben con los brazos extendidos, aunque cada vez esté más lejos mi cariño para ustedes permanece.

A Rubén (mi confidente), León, Jarintzi, Rosa y Daniela por ser mis amigos, porque sé que puedo confiar plenamente en ustedes. Por disponer siempre de ese tiempo corto o largo para escucharnos, apoyarnos y también divertirnos, gracias por su cariño. Gracias a Liz, Cloe, Dulcecita, Malloni, Tlaloc y Eli, mis amigos en Chetumal, por ese gran afecto. A Nicolás Calvillo, por su ayuda en la toma de muestras y su grata compañía.

A todos los compañeros del posgrado y cursos porque en su momento puede aprender de sus experiencias: Lulú, Chiquini, Melina, Guada, Mariana, Wenceslao, Pavel y Martha Uc. A los profesores del posgrado, porque cada uno con su forma de ser me motiva a seguir aprendiendo de ellos: al Dr. Alejandro Morón, al Dr. José Armando

Alayón, al Dr. Eduardo Martínez Romero, a la Dra. Paula Enríquez, al Dr. José Luis Rangel y al Dr. Rafael Reyna Hurtado. Al M. en C. Holger Weissenberger por su ayuda.

Finalmente les expreso mi gratitud a Malena y Gaby, por su ayuda en las consultas bibliográficas. También a Yamile Castillo y Paty Bardales, por atenderme y orientarme siempre en todos los procesos hasta concluir. Sin olvidar a todo al personal que hace posible que ECOSUR funcione y a todos los que escaparon a mi memoria en esta larga lista.

Índice

Capítulo I. Introducción	1
1.1 Preguntas de investigación	5
1.2 Objetivos	6
General	6
Particulares	6
1.3 Hipótesis	7
Capítulo II. Resultados	8
2.1 Tamaño de muestra obtenido.....	8
2.2 Metales esenciales y no esenciales y diferencias de las concentraciones entre regiones	8
2.3 Diferencias entre sexos y clases de edad	12
2.4 Corroboración de concentraciones altas inusuales de Pb en un organismo de la Bahía de Chetumal.....	12
2.5 Correlaciones entre las concentraciones de los metales	13
Metals in bone tissue of manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay, Mexico*	15
*Manuscrito enviado a la revista Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology	15
Abstract	16
Materials and methods	17
Results	18
Discussion.....	20
Conclusions.....	21
Acknowledgments	22
References	22
Capítulo III. Discusión	25
3.1 Presencia y diferencias de la concentración de metales entre regiones	25
3.2 Diferencia de la concentración de metales entre sexos	26
3.3 Diferencia de la concentración de metales entre clases de edad.....	27

3.4 Concentraciones inusuales de Pb en tejido óseo de un organismo de la Bahía de Chetumal.....	28
3.5 Niveles, correlación de concentraciones de metales y la implicación de riesgo para el manatí	29
3.6 Otros hallazgos relevantes.....	32
Capítulo IV. Conclusiones	33
Aspectos éticos en la investigación	35
Literatura Citada	36
Anexos.....	49
Anexo 1. Promedio de la concentración de metales (µg/g) encontrados en sedimento, agua, mejillones y otros organismos en el Golfo de México y Bahía de Chetumal. ...	49
Anexo 2. Número de registro del museo, sexo, edad y concentración de metales (µg/g) en tejido óseo de <i>Trichechus manatus</i> en Bahía de Chetumal, Tabasco y Campeche, México.....	51
Anexo 3. Promedio (±DE) de la concentración de metales (µg/g) en diferentes tipos de hueso de mamíferos acuáticos alrededor del mundo.....	52
Anexo 4. Correlatograma de las concentraciones de metales en tejido óseo de <i>Trichechus manatus</i> del Golfo de México y Caribe Mexicano.....	53
Anexo 5. Correlación de Pearson y Spearman de las concentraciones de metales en tejido óseo de <i>Trichechus m. manatus</i> en la región del Golfo de México y Caribe Mexicano.....	54
Anexo 6. Glosario.....	55
Anexo 7. Permiso de la Colección de Mamíferos Marinos de ECOSUR con Clave de registro DF-CC-277-13.....	57
Anexo 8. Normas Editoriales de la revista Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology	59

Capítulo I. Introducción

Las poblaciones de manatíes (*Trichechus manatus*) en sus diferentes áreas de distribución son afectadas por fenómenos estocásticos, enfermedades, depredación, así como por causas antropogénicas asociadas a la destrucción de su hábitat, caza, pesca incidental y contaminación (O'Shea, *et al.*, 1985). La industria, quema de combustibles fósiles, producción de energía eléctrica, pinturas, plásticos y agropecuaria, entre otras actividades, son las principales fuentes antropogénicas de metales en el ambiente (Bradl, 2005).

Los estudios sobre contaminación en mamíferos marinos se debe a la inquietud por los daños que pueden causar a las diferentes especies dentro de este grupo (O'Hara y O'Shea, 2005). Los daños que causa la exposición a tóxicos son diversos, algunos de ellos son: la atrofia del timo, pancitopenia, daño en la medula ósea, inmunosupresión, entre otras patologías (ver Anexo 6). Estos daños aumentan la susceptibilidad a agentes infecciosos, y en consecuencia, aumentan también el riesgo de muerte, incluso de muertes masivas (Reijnders, 1986; Mössner y Ballschmiter, 1997; Moller, 2003).

En mamíferos marinos, los metales no esenciales de mayor importancia por su alta toxicidad son el Cadmio (Cd), Plomo (Pb) y Mercurio (Hg). Otros metales considerados esenciales, como el Aluminio (Al), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Selenio (Se), Níquel (Ni) y Zinc (Zn) pueden causar daños, y por lo tanto, se convierten en amenazas a la salud de la fauna silvestre (Das, *et al.*, 2003; Moller, 2003; Florea y Büsselberg, 2006).

La manera en la que las sustancias tóxicas afectan la salud y se concentran en los tejidos depende de la exposición del animal, pero también se ve modificada por la talla, edad, sexo, localización geográfica, rutas de entrada, especificidad de tejidos y estrés (Das, *et al.*, 2003). Incluso, la salud puede afectarse por la relación entre los metales (esenciales y no esenciales) pues algunos son agonistas y otros antagonistas, esto influye en la adsorción y desorción, consecuentemente en la concentración de los mismos. Por ejemplo, la deficiencia de Zn puede aumentar la adsorción de Pb, la alta concentración de Pb en el organismo puede generar cambios en la hematopoyesis y en la fragilidad de los glóbulos rojos, favoreciendo la anemia (Thompson, 2012). Por esta razón, es necesario conocer la relación entre los metales esenciales y no esenciales.

Particularmente, en los sirenios aún son pocos los trabajos documentados que ofrecen un conocimiento de los niveles basales de metales en animales de vida libre y cautiverio. No se conocen los límites de tolerancia en los que un tóxico puede causar daños a los tejidos o a la salud en sirenios. El estudio de Stavros, *et al.* (2008) aporta niveles basales en sangre de manatíes de Florida (*T. m. latirostris*), y el estudio de Takeuchi (2012) ofrece intervalos de referencia clínica de metales en sangre entera. Algunos valores fueron expresados en partículas por millón (ppm) en peso húmedo: Cr (0-0.1), Cu (0.4-1.1), Pb (0-0.3) y Zn (7.3-16.9) (ver Takeuchi, 2012).

Por sus hábitos herbívoros y sus dos modos generales de alimentación (excavación y ramoneo), descritos por Marsh, *et al.* (2011), el manatí mantiene contacto directo con la vegetación y el sedimento de los cuerpos de agua que habita. Al ser completamente herbívoro, su principal patrón de exposición a contaminantes es a través de la ingestión de alimento. Su dieta se basa en más de 60 especies de plantas acuáticas y pastos,

que acumulan tóxicos del sedimento en sitios contaminados (O'Hara y O'Shea, 2005; Reep y Bonde, 2006; Marsh, *et al.*, 2011). Dada esta relación, se puede evaluar la presencia de contaminantes en el medio acuático a través del manatí como especie centinela (Bonde, *et al.*, 2004; Bossart, 2011).

La vigilancia de regiones importantes para los mamíferos marinos, como el Golfo de México, en las que existe un alto riesgo de liberación y derrames de petróleo, debe ser una prioridad para el estudio de los impactos de la contaminación ambiental en estos organismos (O'Hara y O'Shea, 2005). Asimismo la Bahía de Chetumal, ubicada en la costa sureste de México, ha sido identificada como un área de alto riesgo en el Sistema Arrecifal Mesoamericano y para su biodiversidad por la contaminación proveniente de la zona terrestre y por las corrientes marinas del sur (Kramer y Kramer, 2002).

Metales en las regiones de Campeche, Tabasco y Bahía de Chetumal

El Golfo de México es una zona que se encuentra afectada por actividades antropogénicas, como la industria petrolera, que es fuente de metales no esenciales, entre los que destacan el Cd, Ni y Pb (Vazquez y Sharma, 2004). En Laguna de Términos y otras regiones de los estados de Campeche y Tabasco, se han reportado concentraciones de metales, tanto esenciales (Cu, Fe, Mn, Ni y Zn) como no esenciales (Cd y Pb), en agua (Páez-Osuna, *et al.*, 1987), sedimentos (Rosales Hoz, *et al.*, 1994), peces (Vázquez, *et al.*, 2001; Benítez, *et al.*, 2012), ostiones (Vázquez-Botello, *et al.*, 2004) y en cocodrilos (*Crocodylus moreletii*) (Trillanes-Flores, 2013) (Anexo 1).

Asimismo, en la Bahía de Chetumal, y a pesar de no tener actividad de la industria petrolera, se han encontrado concentraciones de Pb en mejillones y sedimento (Díaz-López, *et al.*, 2006), mientras que en el Río Hondo, su principal tributario, se han detectado As, Cd y Pb (Buenfil-Rojas y Flores-Cuevas, 2007) (Ver Anexo 1). Cisneros, *et al.* (2011) sugieren que la fuente de metales no esenciales son los fertilizantes utilizados en los ingenios azucareros. Aunque en la Bahía de Chetumal no está confirmado, se considera que una de las fuentes de estos metales son el uso agrícola de fungicidas (Álvarez-Legorreta, 2009). Las descargas difusas ocasionadas por la lluvia en tierras urbanas y agrícolas, por medio de las escorrentías, introducen contaminantes a los cuerpos de agua (Euán-Ávila, *et al.*, 2002), asimismo, las descargas de efluentes domésticas se suman al origen de estos metales (Páez-Osuna, *et al.*, 2005).

Ahora, con el actual cambio de la política energética de México, se espera un intenso incremento de la actividad petrolera en las costas y cuencas hidrológicas del Sureste de México (SENER, 2013), por lo que estos datos sobre contaminación en manatí servirán de línea base para futuros trabajos comparativos, pues este incremento podría elevar la disponibilidad de metales en el ambiente.

Los estudios sobre la presencia y concentración de metales en manatíes (*T. m. manatus*) en México son escasos, de hecho, solo existe un estudio en el que se reportan concentraciones de metales pesados en sangre y hueso de manatí de la Bahía de Chetumal (Rojas-Mingüer y Morales-Vela, 2002). En ese estudio, se reporta una cantidad inusual de Pb (128 µg/g) como la más alta en mamíferos acuáticos (O'Shea, 2003).

En mamíferos acuáticos, la concentración de metales se ha medido en diversos tejidos, como sangre, músculo y diferentes tipos de órganos, según la facilidad de muestreo. Un problema en México es que los cuerpos de cadáveres de manatíes se descomponen rápidamente por el clima tropical, lo que dificulta enormemente la obtención de distintos tejidos blandos frescos. Es por esto que la colecta de tejido óseo toma relevancia ya que es reservorio de muchas sustancias y tiene la capacidad de reflejar la concentración de estas a lo largo de los años (Triffitt, 1985), en comparación con la sangre (Hu, *et al.*, 2007).

En este contexto, para evaluar la concentración de algunos metales (esenciales y no esenciales) en dos regiones de alta importancia para esta especie en México, se decidió usar la colección ósea de manatíes de la Bahía de Chetumal depositadas en el Museo de Zoología de ECOSUR y de muestras colectadas en Tabasco y Campeche. Lo anterior con el propósito de atender la prioridad de mejorar el entendimiento que tenemos sobre la exposición a contaminantes de los mamíferos acuáticos (O'Hara y O'Shea, 2005).

1.1 Preguntas de investigación

1. ¿Existen diferencias entre las concentraciones de metales en el tejido óseo de los manatíes de la Bahía de Chetumal y los de cuerpos de aguas continentales de Tabasco y Campeche?
2. ¿Las concentraciones de metales encontradas en el tejido óseo pueden sugerir riesgo para la salud del manatí en México?

3. ¿Existen concentraciones de Pb inusualmente altas en la Bahía de Chetumal, similares a la reportada de 128 µg/g en un estudio previo?

1.2 Objetivos

General

Determinar la concentración de As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni y Zn en el tejido óseo del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en dos regiones de importancia para México: Bahía de Chetumal y cuerpos de aguas continentales de Campeche y Tabasco.

Particulares

1. Identificar si existen diferencias en la concentración de metales esenciales y no esenciales entre regiones.
2. Examinar si las concentraciones encontradas pueden sugerir riesgo para la salud del manatí.
3. Confirmar o rechazar la presencia de altas concentraciones de Pb documentadas para la Bahía de Chetumal.
4. Explorar la relación entre la concentración de metales en el tejido óseo.
5. Identificar si existen diferencias en la concentración de metales esenciales y no esenciales entre sexos.

1.3 Hipótesis

1. Debido al incremento de la explotación petrolera en el Golfo de México durante las últimas décadas (Vázquez et al., 1999), se espera registrar mayor concentración de metales no esenciales en el tejido óseo de manatí procedente de la región de Tabasco y Campeche que de la Bahía de Chetumal.

2. Se espera encontrar diferencias en la concentración de metales esenciales y no esenciales en machos adultos que en hembras adultas, ya que de acuerdo con Honda, *et al.* (1986), puede existir eliminación e intercambio de metales esenciales y no esenciales debido a las diferencias fisiológicas entre sexos, como la lactancia o gestación.

Capítulo II. Resultados

2.1 Tamaño de muestra obtenido

El total de muestras de tejido óseo acumuladas fue 33, con la siguiente representación: Bahía de Chetumal ($n=22$), Tabasco ($n=7$), Campeche ($n=4$). La distribución por sexos de las 33 muestras fue: Hembras ($n=8$), Machos ($n=18$), no definidos ($n=7$), por categoría de edad: Adultos ($n=17$), Crías ($n=12$), no definidos ($n=4$) y finalmente la distribución de hembras y machos de clase adulta fue: Hembras ($n=4$), Machos ($n=10$). Es importante mencionar que en algunos esqueletos los datos sobre el sexo o la categoría de edad no fueron definidos durante la necropsia por el avanzado estado de descomposición del animal. Las muestras pertenecen a esqueletos de animales varados desde 1990 hasta 2013.

2.2 Metales esenciales y no esenciales y diferencias de las concentraciones entre regiones

Se detectaron seis metales en todas las muestras: Cd, Cr, Cu, Pb, Ni y Zn (Cuadro 1). Se realizó lectura de Hg y Se en 10 muestras al azar encontrando sólo trazas de los elementos, por lo cual no se continuó con la lectura. La información completa de las 33 muestras en las que se incluye edad y sexo junto con los valores promedio y desviación estándar de las concentraciones se muestra en el Anexo 2.

Cuadro 1. Promedio (\pm DE) de las concentraciones de metales ($\mu\text{g/g}$ en peso húmedo) en 33 muestras de tejido óseo de manatíes procedentes de la Bahía de Chetumal, de Tabasco y Campeche, México.

Sitio	<i>n</i>	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn
Bahía de Chetumal	22	3.93 \pm 0.47	6.78 \pm 1.94	3.67 \pm 0.72	11.22 \pm 3.15	10.19 \pm 8.37	90.55 \pm 22.95
Tabasco	7	4.22 \pm 0.29	9.44 \pm 0.89	4.90 \pm 0.65	13.67 \pm 2.71	9.98 \pm 0.98	117.17 \pm 13.90
Campeche	4	3.92 \pm 0.50	8.43 \pm 1.33	3.88 \pm 0.29	14.54 \pm 1.77	9.32 \pm 0.87	102.60 \pm 27.19
Promedio General	33	3.99 \pm 0.44	7.55 \pm 2.02	3.96 \pm 0.83	12.15 \pm 3.18	10.4 \pm 6.81	97.66 \pm 24.11

El As se encontró en 11 de las 33 muestras, de las cuales 9 pertenecen a Bahía de Chetumal (una de ellas con una concentración inusualmente alta de 229 $\mu\text{g/g}$), una pertenece a Tabasco y una más a Campeche. Debido al bajo número de muestras en las que se detectó As, este metal no fue considerado para comparar las diferencias entre sexos, pero si la diferencia entre edades y la correlación con los demás metales. Los valores promedio de As a nivel región se presentan en la Cuadro 2. Cabe aclarar que el valor inusualmente alto de As no se consideró en el análisis estadístico de los datos.

El promedio de las concentraciones de los distintos elementos tuvo valores ligeramente mayores en Tabasco que en Campeche, excepto para Pb (Cuadro 1), aunque sólo se observaron diferencias significativas para el Cu ($t=2.794$, $df=9$, $p=0.0209$). Dada esta homogeneidad general entre sitios y al bajo número de muestra disponibles para Campeche, se decidió continuar el análisis estadístico sobre dos grupos regionales de estudio, Caribe mexicano (Bahía de Chetumal) y Golfo de México (Tabasco y Campeche) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio (\pm DE) y rango de valores mínimos y máximos de las concentraciones de metales ($\mu\text{g/g}$) en peso húmedo, en tejido óseo de manatí (*T. m. manatus*) de las regiones del Caribe mexicano y Golfo de México.

Región	n	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn	As
Caribe mexicano	22	3.93 \pm 0.46	6.78 \pm 1.93	3.67 \pm 0.72	11.22 \pm 3.15	10.19 \pm 8.36	90.55 \pm 22.95	28.16 \pm 26.48 *(n=8)
		(3.18-4.89)	(3.13-10.75)	(2.38-4.89)	(6.01-17.66)	(4.73-46.52)	(44.04-130.2)	(8.48-88.93)
Golfo de México	11	4.10 \pm 0.37	9.07 \pm 1.12	4.53 \pm 0.75	13.99 \pm 2.42	9.74 \pm 1.15	111.9 \pm 20.51	12.46 \pm 2.15 *(n=2)
		(3.53-4.61)	(6.85-11.19)	(3.47-6.31)	(8.76-16.45)	(7.91-11.79)	(77.41-140.7)	(10.94-13.99)
Promedio General	33	3.99 \pm 0.44	7.54 \pm 2.01	3.95 \pm 0.83	12.15 \pm 3.18	10.04 \pm 6.81	97.66 \pm 24.11	25.02 \pm 24.28 *(n=10)
		(3.18-4.89)	(3.13-11.19)	(2.38-6.31)	(6.01-17.66)	(4.73-46.52)	(44.04-140.7)	(8.48-88.93)

* (n) equivale al número de muestras en el que fue encontrado el arsénico.

El rango de valores mínimos y máximos aparece en ()

Al realizar la comparación de las concentraciones de metales entre regiones, se observaron diferencias significativas para Cr ($t=3.617$, $df=31$, $p=0.001$), Cu ($t=3.174$, $df=31$, $p=0.003$), Pb ($t=2.546$, $df=31$, $p=0.016$) y Zn ($t=2.602$, $df=31$, $p=0.014$) (Fig. 2). Para el Golfo de México, se presentaron las concentraciones más altas, excepto para Ni (Cuadro 2).

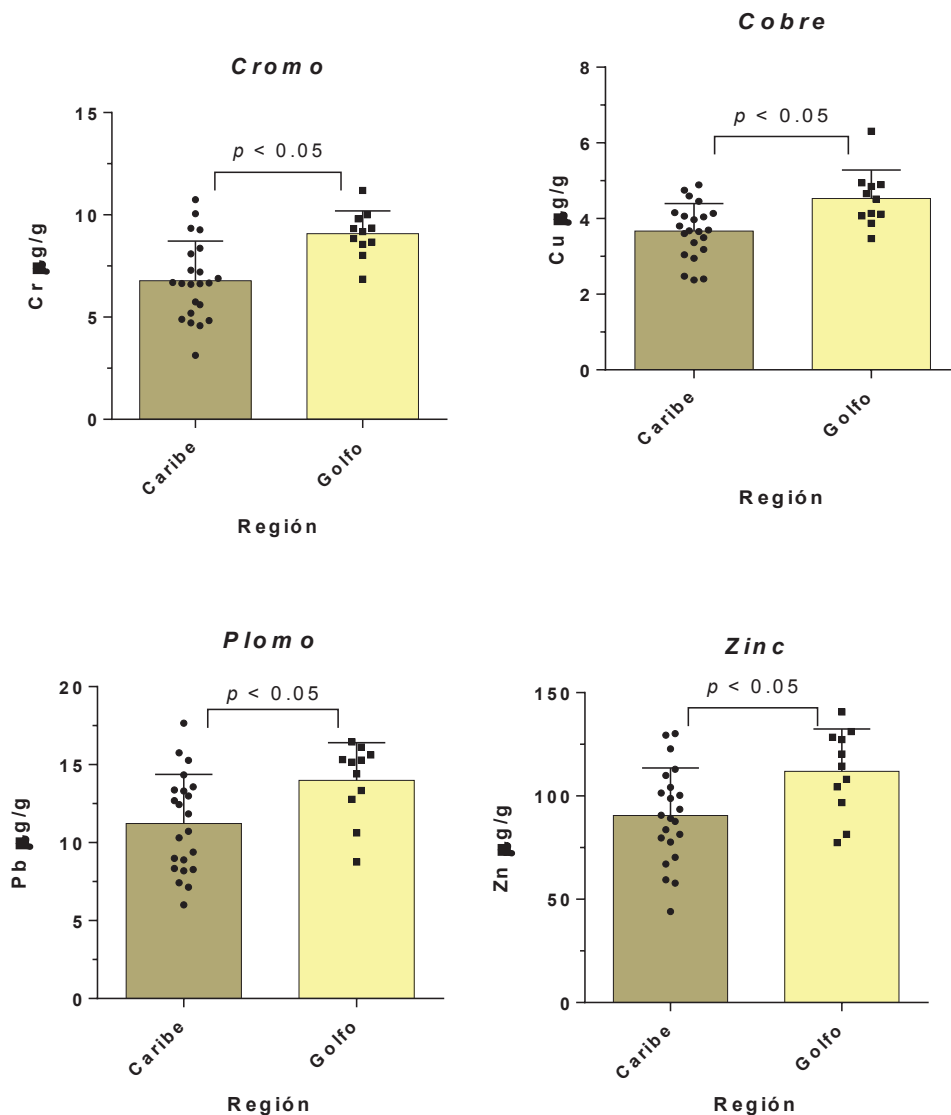


Fig.2 Concentración de metales con diferencia significativa en tejido óseo de *T. manatus* entre las regiones del Caribe mexicano y Golfo de México.

2.3 Diferencias entre sexos y clases de edad

No se encontraron diferencias en las concentraciones de metales al comparar entre sexos. Sin embargo, al comparar las concentraciones entre clases de edad (cría vs. adulto), se pudieron observar diferencias significativas para Pb ($t=2.822$, $df=27$, $p=0.004$) (Fig. 3). El promedio ($\pm DE$) de las concentraciones de Pb en adultos fue mayor (13.50 ± 2.69) comparado con el de las crías (10.37 ± 3.3).

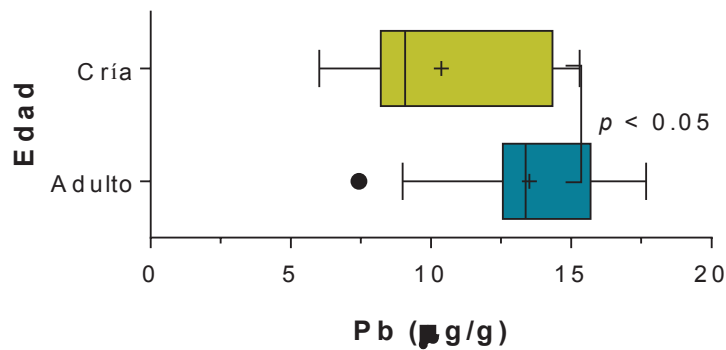


Fig. 3 Diferencias entre edades de las concentraciones de Plomo en tejido óseo de *Trichechus manatus manatus* del Golfo de México y Caribe mexicano.

2.4 Corroboración de concentraciones altas inusuales de Pb en un organismo de la Bahía de Chetumal

Puesto que se encontró reportada una inusual concentración de Pb ($128 \mu\text{g/g}$) en el trabajo previo de Rojas-Mingüer y Morales-Vela (2002), la cual es citada como la concentración más alta inusual en mamíferos acuáticos (O'Shea, 2003), analizamos el cráneo del espécimen en cuestión (No. de registro del Museo MM014) en diferentes huesos: mandíbula inferior y superior, nasal y temporal (Cuadro 3) con el fin de

reafirmar la existencia de tan elevada concentración. El promedio (\pm DE) de la concentración de Pb en el cráneo fue $9.20 \pm 5.37 \mu\text{g/g}$. Cabe mencionar que en la colección ósea sólo se cuenta con el cráneo de este esqueleto y no se tiene ningún otro hueso del animal.

Cuadro 3. Corroboración de las concentraciones de Pb ($\mu\text{g/g}$) en diferentes huesos del cráneo del organismo MM014.

Hueso	Pb	Referencia
Narinas	11.27	Presente estudio
Temporal	3.94	
Mandíbula superior	5.83	
Mandíbula inferior	15.76	
Promedio	9.20	
Desv. Est.	5.37	
Narinas	128	Rojas-Mingüer y Morales-Vela (2002)

2.5 Correlaciones entre las concentraciones de los metales

Dado que algunos metales son agonistas o antagonistas de otros, se realizaron correlaciones de las concentraciones entre los metales (Anexo 4), seis metales presentaron correlaciones positivas y significativas ($p < 0.05$). El Arsénico fue el único que no mostró correlación con ningún metal. Las correlaciones más altas se mostraron en Cd-Zn ($r=0.73$), Cd-Ni ($r=0.67$), Cr-Cu ($r=0.82$), Cr-Pb ($r=0.75$), Cr-Ni ($r=0.75$), Zn-Cu ($r=0.76$) y Zn-Pb ($r=0.77$).

También se observó que las correlaciones entre metales no se comportaron de la misma manera en las dos regiones; para la región del Golfo de México las correlaciones más altas fueron: Cr-Cu ($r=0.83$), Cd-Zn ($r=0.70$), Cr-Ni ($r=0.67$), Ni-Cu ($r=0.66$) y Ni-Zn ($r=0.50$), mientras que para la región del Caribe mexicano las correlaciones más altas se presentaron en los siguientes pares de metales: Zn-Cu ($r=0.85$), Zn-Cr ($r=0.83$), Zn-Pb ($r=0.81$), Pb-Cu ($r=0.80$), Pb-Cr ($r=0.80$), Cu-Cr ($r=0.77$), Cd-Cu ($r=0.75$), Zn-Cd ($r=0.74$) y Cd-Cr ($r=0.74$) (Anexo 5).

Metals in bone tissue of manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay, Mexico*

*Manuscrito enviado a la revista Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology
(Ver normas editoriales en Anexo 8)

Metals in bone tissue of manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay, Mexico

A.G. Romero-Calderón¹, B. Morales-Vela^{1*}, R. Rosiles-Martínez², L.D. Olivera-Gómez³, A. Delgado-Estrella⁴

¹*El Colegio de la Frontera Sur. Av. Centenario Km 5.5, C.P. 77014, Chetumal, Quintana Roo, México*

²*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, D.F., México*

³*División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Km. 0.5 carretera Villahermosa-Cárdenas, C.P. 86039, Villahermosa, Tabasco, México*

⁴*Universidad Autónoma del Carmen, Calle 56 4, Benito Juárez, 24180 Ciudad del Carmen, Campeche*

*Corresponding author: bmorales@ecosur.mx, +52(983)8350440 ext. 4334

Abstract

*The concentrations of seven metals (As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni and Zn) were analyzed in thirty-three bone tissue samples of manatees (*Trichechus manatus manatus*) found dead in the lagoons and rivers of the Gulf of Mexico and Chetumal Bay. The metal concentrations detected in the manatee bones were higher than most of the concentrations reported for bones in other marine mammals from around the world. The concentrations of Cr, Cu, Pb and Zn were significantly different between the sites, with greater levels found in the Gulf of Mexico group than in the Mexican Caribbean group ($p < 0.05$). The Pb concentrations differed significantly between adults and calves. Correlations were calculated between the concentrations of the metals, and high, positive relationships were shown. Future studies are necessary to establish whether the high metal concentrations represent a risk to the health of the species.*

Keywords: manatee, metals, pollution, bone

The manatee (*Trichechus manatus*) is an endangered species affected by diverse contaminants of human origin, such as herbicides and oil. This pollution is recognized as an acute and chronic threat to sirenians and their habitats (Marsh et al. 2011). Mexico has an important manatee population distributed principally in Chetumal Bay off southern Quintana Roo. This population is shared with Belize (Morales and Olivera, 1997; Morales et al. 2000; Castelblanco-Martínez et al. 2013) and the rivers and lagoon systems of the states of Tabasco and Campeche, which border the Gulf of Mexico (SEMARNART/CONANP 2010) (Figure 1).

These Chetumal Bay and Gulf of Mexico regions have long been exposed to contaminants associated with the oil industry in Tabasco and Campeche and with agricultural activities, such as sugar cane production, in southern Quintana Roo and northern Belize. Oil production is the principal industry in Mexico, with extensive activity in Veracruz, Tabasco

41 and Campeche states. This production could be increased in the coming years because of
42 recent energy reforms (SENER 2013). For this reason, we examined the metal
43 concentrations in manatee bones from these two regions, which are home to the largest
44 populations of manatees in Mexico.

45 The metal concentrations in marine mammals are measured in different tissues based on the
46 ease of access for sampling, with stranding events often providing an opportunity for bone
47 sampling (Lavery et al. 2008). Compact bone is a reservoir for many substances (Triffitt,
48 1985). In particular, the cortical bone can reflect the concentration of certain metals
49 accumulated over many years, unlike soft tissues such as blood, which reflect recent
50 exposures (Hue et al. 2007).

51 The manatee is a sentinel species that can provide information regarding the amount of
52 pollution in its habitat (Belanger and Wittnich 2008); thus, the evaluation of metal
53 concentrations in manatee bones is important. Rojas-Mingüer and Morales-Vela (2002)
54 reported a high concentration of lead (Pb) (128 µg/g) in animals from Chetumal Bay, but
55 this value was designated an unusually high concentration for marine mammals (O'Shea
56 2003). The aims of the present study were to determine the concentrations of metals in
57 manatee bone tissue from the Chetumal Bay region of Mexico and the states of Tabasco
58 and Campeche along the Gulf of Mexico, to compare these concentrations between the two
59 regions and to review the extreme value of Pb previously reported for Chetumal Bay.

60 Materials and methods

61 Sampling and study area

62 Thirty-three bone tissue samples were collected for this study: twenty-two from the marine
63 mammals collection at the Zoological Museum of ECOSUR-Chetumal (ECOSUR-CH-
64 MM), which were acquired from strandings in Chetumal Bay, seven in Tabasco and four in
65 Campeche. These samples were all from manatee strandings occurring from 1990 to 2013.
66 To further investigate the unusually high Pb value reported in the literature, we tested
67 several samples from the same museum specimen (MM014-ECOSUR-CH-MM) used in
68 the literature report.



69

70 Figure 1. Map showing the study area in regions of the Mexican Caribbean (Chetumal Bay,
71 Quintana Roo) and along the Gulf of Mexico (Tabasco and Campeche).

72 Approximately 2 g of cortical bone was obtained from the shaft of the humerus or radius
73 using a disc saw with a continuous-rim diamond blade. After each sample was cut, the disc
74 was cleaned with cleaning solution (Extran®, Merck; EM Science, Gibbstown, NJ) and
75 distilled water to avoid sample contamination. Each sample was placed in a plastic bag at
76 room temperature and analyzed in the toxicology laboratory of the Faculty of Veterinary
77 Medicine at the National Autonomous University of Mexico (Universidad Nacional
78 Autónoma de México (UNAM)).

79 80 Laboratory analysis

81 The samples were prepared following the procedures for metal determinations by wet
82 digestion (Helrich 1990). Each sample was weighed on an analytical balance to standardize
83 the weight (0.5 g), placed in a glass tube with 2.5 ml of pure concentrated nitric acid
84 (HNO₃), allowed to hydrolyze and then filtered with paper before being diluted with
85 deionized water to 14 ml. An atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer, model
86 Analyst 3110 and 100) was used with an air-acetylene flame and hydride generation.
87 Calibration was performed using standards for each element. The concentrations of the
88 solutions for the calibration curves were 0.2, 0.5, 1, 2, 5 and 10 ppm. Seven metals, namely,
89 arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr), copper (Cu), nickel (Ni), Pb and zinc (Zn),
90 were analyzed by examining the wavelength of each element. The spectral bandwidth and
91 specific lamp that were used were chosen according to the standard conditions for the
92 individual determinations (Perkin-Elmer, Inc. 1994). Blank replicates, calibration curves
93 and reference material from the National Institute of Standards and Technology (NIST)
94 were used to verify the accuracy of the procedure. The estimated final concentration of
95 each element was calculated through multiplying the absorbance by the volume of the
96 diluted sample and then dividing by the sample weight; the concentration is reported in
97 micrograms per gram (µg/g) wet weight of sample.

98 99 Data analysis

100 Tests for data normality (Shapiro-Wilks) and the homogeneity of variances (Brown-
101 Forsythe) were performed. When the assumption of variance homogeneity was rejected, the
102 data were logarithmically transformed. If the homogeneity assumption was still rejected,
103 we used the nonparametric Mann-Whitney test. Student's *t*-test was used to analyze
104 differences between the regions and between the sexes and ages of the animals sampled.
105 Moreover, Pearson correlation coefficients were calculated between the metal
106 concentrations to detect relationships among the seven metals. The test results were
107 considered significant at $p < 0.05$. Statistical analyzes were performed using GraphPad
108 Prism Version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

109 110 Results

111 Thirty-three samples of bone tissue were analyzed: 22 from the Mexican Caribbean
112 (Chetumal Bay) and 11 from the Gulf of Mexico (7 and 4 from the states of Tabasco and
113 Campeche, respectively). Seven samples were from females, 18 were from males, and 8
114 were from animals of undetermined sex. Seventeen were from adults, 12 were from calves,
115 and 4 were from animals of undetermined maturity. Two nonessential metals, Cd and Pb,
116 and 4 essential metals, Cr, Cu, Ni and Zn, were detected in all the samples. Arsenic was

117 detected only in ten samples: 8 from the Mexican Caribbean and two from the Gulf of
 118 Mexico.

119 *Concentrations in relation to regions.* Except for Ni and As, the mean concentration of the
 120 metals was higher in the samples from the Gulf of Mexico region than in those from the
 121 Mexican Caribbean (Table 1). Significant differences in the metal concentrations were
 122 observed between the regions for Cr ($t=3.617$, $df=31$, $p=0.001$), Cu ($t=3.174$, $df=31$,
 123 $p=0.003$), Pb ($t=2.546$, $df=31$, $p=0.016$) and Zn ($t=2.602$, $df=31$, $p=0.014$) (Table 1).

124 **Table 1. Mean metal concentration \pm standard deviation in the bone tissue of**
 125 **manatees from the Mexican Caribbean and Gulf of Mexico regions, with the range in**
 126 **parentheses. The values are expressed as $\mu\text{g/g}$ wet weight of bone.**

Metal	Mexican Caribbean	Gulf of Mexico
Cd	3.93 \pm 0.46 (3.18-4.89)	4.10 \pm 0.37 (3.53-4.61)
Cr*	6.78 \pm 1.93 (3.13-10.75)	9.07 \pm 1.12 (6.85-11.19)
Cu*	3.67 \pm 0.72 (2.38-4.89)	4.53 \pm 0.75 (3.47-6.31)
Pb*	11.22 \pm 3.15 (6.01-17.66)	13.99 \pm 2.42 (8.76-16.45)
Ni	10.19 \pm 8.36 (4.73-46.52)	9.74 \pm 1.15 (7.91-11.79)
Zn*	90.55 \pm 22.95 (44.04-130.2)	111.9 \pm 20.51 (77.41-140.7)
As	28.16 \pm 26.48 (8.48-88.93)	12.46 \pm 2.15 (10.94-13.99)

*Indicates a significant difference between regions.

127

128

129 We did not find higher Pb concentrations than those reported in Table 1 in the multiple
 130 samples taken from specimen MM014, for which the mean value was 9.20 \pm 5.37 (range
 131 3.94 to 15.76) $\mu\text{g/g}$.

132 *Concentrations in relation to sex and age.* No significant differences were observed
 133 between the sexes. The mean concentration of Pb was higher in adults (13.50 \pm 0.6496) than
 134 in calves (10.37 \pm 0.9526), with a significant difference between the ages ($t=2.822$, $df=27$,
 135 $p=0.004$).

136 *Correlations between metal concentrations.* The correlations between the metal
 137 concentrations were all significant ($p<0.05$) and positive. Higher coefficients were
 138 observed between Cr and Cu ($r=0.82$), Cr and Pb ($r=0.75$), Cr and Ni ($r=0.75$), Zn and Cu
 139 ($r=0.76$), Zn and Pb ($r=0.77$), Cd and Zn ($r=0.73$) and Cd and Ni ($r=0.67$). The correlations
 140 between the metals differed between the two regions; in the Gulf of Mexico, higher
 141 coefficients were observed for Cr, Cd and Ni, whereas in the Mexican Caribbean, higher
 142 coefficients were found for Zn, Pb, Cu and Cd.

143

144 Discussion

145 The metal concentrations in the manatee bone tissues were generally higher than those in
146 the distinct bone types of other aquatic mammalian species from around the world (Table
147 2).

148 We also found differences in the metal concentrations between the two regions. The Cr, Cu,
149 Zn and Pb concentrations were higher in the group from the Gulf of Mexico than in that
150 from Chetumal Bay. The use and production of fertilizers and pesticides, domestic effluents
151 and oil production in the gulf region (Páez-Osuna 2005) could be the main sources of these
152 metals. Earlier studies have also shown elevated concentrations of Pb in fish, shrimp and
153 crocodiles from the Gulf of Mexico (Vázquez et al. 2001, Trillanes-Flores et al. 2014).

154 Additionally, significant differences were found in the Pb concentrations between the age
155 classes, with higher concentrations in the adults than in the calves, most likely attributable
156 to the longer duration of exposure in adults. Similar results were reported by Honda et al.
157 (1986), who showed that the Pb concentration increased with age in dolphins.

158 The metal concentrations for all the pairs were positively correlated. It is known that certain
159 essential metals function in the absorption of nonessential metals and that this interaction
160 could have health consequences. The significant correlation between metal concentrations
161 in the present study does not necessarily demonstrate that nonessential metal accumulation
162 in bone tissue can affect essential element homeostasis. However, it is well documented
163 that the negative interaction between Cd and Zn can cause nephrotoxicity and that the Pb-
164 Zn interaction can affect behavior when Pb is higher than Zn. A Zn deficiency enhances Pb
165 absorption, and Pb increases Zn excretion, which can lead to metabolic changes in an
166 organism (D'Souza et al. 2003). This interaction is significant because Zn plays an
167 important role in growth, skeletal development, wound healing, reproduction, immune
168 system function and other functions, such as gene transcription, in manatees (Takeuchi
169 2012).

170 The differences between the regions regarding the correlations between the metal
171 concentrations may be attributable to dietary differences between the regions. In Tabasco,
172 *Echinochloa polystachya* was reported to be an important component of the local manatee
173 diet (Ponce-García 2013). This grass has the capacity to absorb and accumulate Cr, Cd, Ni
174 and other metals (Barajas-Aceves et al. 2014). By contrast, in the Mexican Caribbean,
175 *Rhizophora mangle* was reported to be a component of the local manatee diet
176 (Castelblanco-Martínez et al. 2009). This plant has the capacity to absorb and accumulate
177 Zn, Pb, Cu and Cd in its roots and leaves (Naranjo-Sánchez & Troncoso-Olivo 2008).

178 In general, the metal concentrations in our study were high compared with those detected in
179 other marine mammals worldwide (Table 2). However, our metal concentrations were low
180 compared with the maximum tolerable levels of minerals for domestic animals reported by
181 the National Research Council (1980) but higher than the baseline levels of certain metals
182 proposed by Takeuchi (2012). Given the second comparison, the concentrations that we
183 detected could represent a hazard to the manatees in both regions studied.

184 However, the level at which a mineral element causes an adverse effect is uncertain and
185 depends on many factors, such as the route of exposure and the bioavailability of the
186 compound. In addition, the toxicities and baseline levels of tolerance to heavy metals are
187 not yet well documented in sirenians. Pb is an element that accumulates in the body
188 significantly with age, which could represent a hazard, but the Pb concentrations found in
189 our study were not unusually high (Table 2).

190 **Table 2. Mean metal concentration \pm standard deviation in bone tissue from different**
 191 **marine mammalian species from around the world. The values are expressed as $\mu\text{g/g}$**
 192 **wet weight of bone.**
 193

Species	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn	Reference
<i>Trichechus manatus</i> Mexican Caribbean Gulf of México	3.93 \pm 0.46 4.10 \pm 0.37	6.78 \pm 1.93 9.07 \pm 1.12	3.67 \pm 0.72 4.53 \pm 0.75	11.22 \pm 3.15 13.99 \pm 2.42	10.19 \pm 8.36 9.74 \pm 1.15	90.55 \pm 22.95 111.9 \pm 20.51	Present study
<i>Trichechus manatus</i>	4 \pm 0.59	3.2 \pm 0.29	3.08 \pm 1.31	41 \pm 3.36	13 \pm 1.34	192 \pm 37.41	Rojas-Mingüer and Morales-Vela (2002)
<i>Phocoenoides dalli</i>	0.116 \pm 0.16		2.24 \pm 1.81	0.09 \pm 0.08	0.14 \pm 0.11	258 \pm 53.74	Fujise et al. (1988)
<i>Callorhinus ursinus</i>	0.08 \pm 0.04			1.61 \pm 2.24	1.10 \pm 0.27	108.38 \pm 12.9	Goldblatt and Anthony (1983)
<i>Stenella coeruleoalba</i>	0.11 \pm 0.06		0.47 \pm 0.05	0.44 \pm 0.21	0.12 \pm 0.04	354.75 \pm 48.88	Honda et al. (1986)
<i>Tursiops aduncus</i> <i>Tursiops truncatus</i>	0.047 \pm 0.081			2.78 \pm 3.07 0.85 \pm 0.19			Lavery et al. (2008)
<i>Delphinus delphis</i> <i>Zalophus californianus</i>	2.85 \pm 0.48		3.70 \pm 0.26	1.03 \pm 0.55 27.79 \pm 1.45	35.73 \pm 6.45	59.11 \pm 12.24	Szteren and Aurióles-Gamboa (2013)
<i>Phoca sibirica</i>		0.295 \pm 0.06			0.215 \pm 0.06	130 \pm 28.28	Watanabe et al. (1996)
<i>Leptonychotes weddellii</i>	0.02 \pm 0.003			0.12 \pm 0.11	0.08 \pm 0.05	101.30 \pm 34.36	Yamamoto et al. (1987)

194

195 **Conclusions**

196 This study shows that the bone tissue of manatees from the Gulf of México contains higher
 197 metal concentrations than the tissue of manatees from Chetumal Bay, most likely because
 198 of chronic exposure to pollutants derived from oil production. With the new energy reforms
 199 announced by the Mexican government in 2014, the activity of the oil and gas industries
 200 could increase in the coming years. If the manatee population in the Gulf of Mexico region
 201 continues to be exposed to high levels of oil contamination, the risks of damage to the
 202 health of the population could increase.

203 High Pb values were detected in the samples from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay,
 204 but no excessively high Pb concentrations were detected in the samples from Chetumal

205 Bay, including in one specimen that was previously reported to harbor excessively high
206 amounts of Pb.

207 The correlations between the metal concentrations demonstrated interactions between
208 nonessential and essential metals but not their homeostasis; thus, more specific studies with
209 greater sample sizes will be necessary to address the issue of homeostasis. The examination
210 of live manatees for signs of toxicosis and to assess their general state of health as well as
211 the use of other tissue types and organs to estimate the relationship between metal
212 concentrations in the bone, blood, kidney and liver would be valuable for establishing the
213 risk of metal toxicity in this species. The present study does not establish the consequences
214 of these toxic metals for manatee health.

215 Additionally, it is necessary to study the degree of metal tolerance in manatees to better
216 manage and conserve the species, as Takeuchi (2012) proposed. Other important essential
217 metals, such as Ca and Fe, should be studied in complementary analyses and the results
218 reported in the future.

219 In the present study, certain data concerning the specimens analyzed were not known
220 because the necropsy sheets were incomplete; thus, is important to acquire complete
221 documentation of each stranding following standardized necropsy procedures.

222

223 Acknowledgments

224 This study was supported by scholarship no. 355408 granted by CONACYT-México. We
225 thank the Collection of Marine Mammals of ECOSUR-Chetumal; the Universidad
226 Autónoma del Carmen (UNACAR); the Región Naval 3 of Ciudad del Carmen, Campeche;
227 and the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) for the bone samples. Dr. José
228 Rogelio Cedeño Vázquez deserves thanks for all his comments and help with the
229 manuscript. We also thank Nicolás Martínez for the sampling help provided by ECOSUR-
230 Chetumal, the Toxicology Laboratory of the Universidad Nacional Autónoma de México
231 for help with the laboratory analyses and Daniel Díaz Espinosa de los Monteros for his help
232 with the statistical analyses and the GraphPad Prism software. Special thanks are due to
233 Carlos Trillanes-Flores for his immeasurable support.

234

235 References

236 Barajas-Aceves M, Camarillo-Ravelo D, Rodríguez-Vázquez, R (2014) Mobility and
237 Translocation of Heavy Metals from Mine Tailings in Three Plant Species after
238 Amendment with Compost and Biosurfactant. *Soil and Sediment Contam: An Int J*, just
239 accepted

240 Belanger MP, Wittnich C (2008) Contaminant Levels in Sirenians and Recommendations
241 For Future Research and Conservation Strategies. *J Marine Anim and Their Ecol*, 1(1):1-8

242 Castelblanco-Martínez DN, Morales-Vela B, Hernández-Arana HA, Padilla-Saldivar J
243 (2009) Diet of the manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Chetumal Bay, Mexico. *Lat*
244 *Am J Aquat Mamm*, 7(1-2):39-46

245 Castelblanco-Martínez DN, Padilla-Saldivar J, Hernández-Arana HA et al (2013)
246 Movement patterns of Antillean manatees in Chetumal Bay (Mexico) and coastal Belize: A
247 challenge for regional conservation. *Mar Mamm Sci*, 29(2):E166-E182

248 D'Souza HS, Menezes G, Venkatesh, T (2003) Role of essential trace minerals on the
249 absorption of heavy metals with special reference to lead. *Indian J Clin Biochem*,
250 18(2):154-160

251 Fujise Y, Honda K, Tatsukawa R, Mishima S (1988) Tissue distribution of heavy metals in
252 Dall's porpoise in the northwestern Pacific. *Mar Pollut Bull*, 19(5):226-230

253 Goldblatt CJ, Anthony RG (1983) Heavy metals in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*)
254 from the Pribilof Islands, Alaska. *J Environ Qual*, 12(4):478-482

255 Helrich K (1990) *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Association of Official Analytical
256 Chemists, Inc., Airlington, VA, USA

257 Honda K, Fujise Y, Tatsukawa R, Itano K, Miyazaki N (1986) Age-related accumulation of
258 heavy metals in bone of the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*. *Mar Environ Res*,
259 20(3):143-160

260 Hu H, Shih R, Rothenberg S, Schwartz BS (2007) The epidemiology of lead toxicity in
261 adults: measuring dose and consideration of other methodological issues. *Environ Health*
262 *Perspec*, 115(3): 455

263 Lavery TJ, Butterfield N, Kemper CM, et al (2008) Metals and selenium in the liver and
264 bone of three dolphin species from South Australia, 1988–2004. *Sci. Total Environ*,
265 390(1):77-85

266 Marsh H, O'Shea TJ, Reynolds III JE (2011) *Ecology and conservation of the Sirenia:*
267 *dugongs and manatees (No. 18)*. Cambridge University Press, UK.

268 Morales-Vela B, Olivera-Gómez, LD (1997) Distribución del Manatí (*Trichechus*
269 *manatus*) en la costa norte y centro-norte del estado de Quintana Roo, México. *Anales del*
270 *Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México Serie Zoología*, 68:153–
271 167

272 Morales-Vela B, Olivera-Gómez LD, Reynolds III JE, Rathbun GB (2000) Distribution and
273 habitat use by manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Belize and Chetumal Bay,
274 Mexico. *Biological Conservation*, 95:67–75

275 Naranjo-Sánchez YA, Troncoso-Olivo W (2008) Contenidos de cadmio, cobre, zinc y
276 plomo en órganos de *Rhizophora mangle* de la Ciénega Grande de Santa Marta, Caribe
277 Colombiano. *Bol. Investig. Marinas y Costeras – INVEMAR* 37(2): 107-129

278 National Research Council (1980) *Mineral tolerance of domestic animals*, 1st edn. National
279 Academy of Sciences, Washington

280 O'Shea TJ (2003) Toxicology of sirenians. In Vos T, Bossart JV, Forunier GF, O'Shea M,
281 (eds). *Toxicology of Marine Mammals*. Taylor and Francis Publishers, Washington D.C.,
282 pp 270–287

283 Páez-Osuna F (2005) Fuentes de Metales en la Zona Costera Marina. In: Botello A V,
284 Rendón-Von Osten J, Gold-Bouchot G, Agraz- Hernández C (eds) *Golf. México Contam. E*
285 *Impacto Ambient. Diagnóstico y Tendencias*, 2nd ed. Univ. Autón. De Campeche, Univ.
286 Nal. Autón. De México, Instituto Nacional de Ecología., Campeche, pp 329–342

287 PerkinElmer, Inc (1994) *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry*. Shelton,
288 CT

289 Ponce-García G (2013) Determinación de la composición botánica en heces de manatí
290 (*Trichechus manatus manatus*) en la Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco.
291 Dissertation. Universidad Nacional Autónoma de México

292 Rojas Mingüer A, Morales Vela B (2002) Metales en hueso y sangre de manatíes de
293 (*Trichechus manatus manatus*) de la Bahía de Chetumal, Quintana Roo, México. In:
294 Rosado-May FJ, Romero-Mayo R, De Jesús Navarrete A (Eds) *Contribuciones de la*

295 ciencia al manejo costero integrado de la Bahía de Chetumal y su área de influencia.
296 Universidad de Quintana Roo, Chetumal, Q. Roo, México, pp. 133-142
297 SEMARNAT/CONANP (2010) Programa de Acción para la Conservación de la Especie:
298 Manatí (*Trichechus manatus manatus*). México, D.F.
299 SENER (2013) Prospectiva de Petróleo y Petrolíferos 2013-2027
300 [http://sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2013/Prospectiva_de_Petroleo_y_Petroliferos_2013-](http://sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2013/Prospectiva_de_Petroleo_y_Petroliferos_2013-2027.pdf)
301 [2027.pdf](http://sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2013/Prospectiva_de_Petroleo_y_Petroliferos_2013-2027.pdf). Accessed 13 October 2014
302 Szteren D, Auriolles-Gamboa D (2013) Trace elements in bone of *Zalophus californianus*
303 from the Gulf of California: a comparative assessment of potentially polluted areas. *Cienc*
304 *Mar* 39(3): 303-315
305 Triffitt JT (1985) Receptor molecules, coprecipitation and ion exchange process in the
306 deposition of metal ions in bone. In: Priest ND (ed) *Metals in Bone Radiation Protection*.
307 *Proceedings of a EU LEP symposium on the deposition, retention and effects of radioactive*
308 *and stable metals in bone and marrow tissues*. MTP Press Limited, Lancaster, UK
309 Trillanes CE, Pérez-Jiménez JC, Rosiles-Marínez R, González-Jáuregui M (2014) Metals
310 in the Caudal Scutes of Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from the Southern Gulf
311 of Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*, DOI 10.1007/s00128-014-1349-8
312 Takeuchi NY (2012) Trace metal concentrations and the physiological role of zinc in the
313 West Indian manatee (*Trichechus manatus*). Dissertation. University of Florida
314 Vazquez F.G., Sharma V.K., Mendoza Q.A., Hernandez, R (2001) Metals in fish and
315 shrimp of the Campeche sound, Gulf of Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*, 67:756–
316 762
317 Yamamoto Y, Honda K, Hidaka H, Tatsukawa R (1987) Tissue distribution of heavy
318 metals in Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*). *Mar Pollut Bull*, 18(4), 164-169
319 Watanabe I, Ichihashi H, Tanabe S, Amano M, Miyazaki N, Petrov E A, Tatsukawa R
320 (1996) Trace element accumulation in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal.
321 *Environ Pollut*, 94(2), 169-179

Capítulo III. Discusión

3.1 Presencia y diferencias de la concentración de metales entre regiones

El presente estudio reporta la concentración de metales en tejido óseo de *Trichechus manatus manatus* en dos regiones de México. La presencia de los metales detectados en el tejido óseo de los manatíes se debe a que en las regiones de estudio existen actividades antropogénicas, como la producción de petróleo en el Golfo de México. Esta industria es una de las principales fuentes de metales en el ambiente, entre los que destaca el Cd, Pb y Ni (Vázquez y Sharma, 2004), y otros metales cuya fuente principal son los combustibles fósiles, como el As, Cr, Cu y Zn (Bradl, 2005). En el Golfo de México, otra importante fuente de suministro de metales son las efluentes industriales y domésticas que aportan Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, y Zn (Páez-Ozuna, 2005).

Para la Bahía de Chetumal se han reportado diferentes fuentes antropogénicas generadoras de metales; las actividades agrícolas de cultivo de caña cercanas a la bahía son probable fuente de Cd, Cu, Hg y Zn; las descargas de aguas residuales vertidas directamente sobre el Río Hondo (principal tributario de la Bahía), así como también desechos de agroquímicos provenientes de la industria azucarera son otras fuentes de metales (Cisneros *et al.*, 2011) y pueden ser la causa de la presencia y concentración de estos en el tejido óseo del manatí.

Aunque no está confirmado para la Bahía de Chetumal que los desechos de pesticidas, aguas residuales, y fertilizantes utilizados en la industria azucarera y otras actividades agrícolas sean la fuente principal de metales como Cu, Cr y Ni, estas actividades mencionadas sí suelen ser fuentes importantes de estos metales, razón por la cual se incluyen aquí como una de las probables causas de la presencia de estos metales en el

tejido óseo de los manatíes. Hasta el momento, no existe actividad petrolera en el estado de Quintana Roo.

Evidentemente, la actividad petrolera en la región del Golfo de México con su alta producción, apunta a ser la causa principal de la mayor concentración de metales en el tejido de los manatíes del Golfo que del Caribe. Se sabe que la principal fuente del Pb es la quema de combustibles fósiles (Bradl, 2005), como ocurre en el área del Golfo de México. También en región se han encontrado grandes cantidades de Pb, que puede ser fácilmente absorbido por diversos organismos (Villanueva-Estrada, 2000).

El obtener concentraciones significativas mayores de Cr, Cu, Pb y Zn en los tejidos de manatíes del Golfo de México que del Caribe, permite confirmar nuestra hipótesis que plantea mayores concentraciones de metales en las muestras de manatíes procedentes de la región del Golfo de México.

3.2 Diferencia de la concentración de metales entre sexos

En mamíferos acuáticos se han encontrado diferencias en la concentración de metales en diferentes tejidos entre sexos, debido a los distintos procesos fisiológicos asociados a la reproducción, como la gestación y lactancia, en la que existe una transferencia de metales de las hembras a las crías (Honda *et al.*, 1986, Wagemann *et al.*, 1988). Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias entre sexos en las concentraciones de ninguno de los metales, lo que rechaza nuestra segunda hipótesis. Una posible causa por la cual no se detectaron diferencias entre sexos fue el tamaño de la muestra final obtenida de hembras y machos de clase adulta ($n=4$ y $n=10$, respectivamente), que resultó pequeña para marcar alguna diferencia entre sexos.

También la clase de edad en la que se agrupan a los animales adultos representa edades muy amplias, congregando hembras de diferentes edades y por supuesto de distintos momentos reproductivos. Esto exige tener una muestra muy grande de hembras adultas o tener muestras específicas de hembras gestantes, ambos casos muy difíciles de obtener con manatíes de vida libre.

3.3 Diferencia de la concentración de metales entre clases de edad

El promedio de las concentraciones de Pb fue mayor en adultos que en crías, esto podría deberse al tiempo y grado de exposición a los contaminantes, pues los manatíes adultos han estado mayor tiempo de vida expuestos, a diferencia de las crías. La exposición a metales se ve incrementada por la ingestión de alimento (plantas) que acumulan diferentes niveles de contaminantes. El Pb tiende a tener mayores concentraciones en macrófitas sumergidas (Pattee y Pain, 2003) y se conoce que el manatí incluye principalmente en su dieta algas macrófitas como *Batophora spp.*, y *Chara spp.* (Castelblanco-Martínez, *et al.*, 2013), esto puede aumentar la exposición y acumulación de Pb, además, este metal tiende a concentrarse en mayor cantidad en sedimentos de grano fino (Sekabira, *et al.*, 2013). En la Bahía de Chetumal es abundante el sedimento de grano fino principalmente en el margen costero central (Sánchez, *et al.*, 2008).

El manatí por la morfología de su cráneo y la deflexión del rostro tiene la posibilidad de alimentarse no solo de las hojas de las plantas acuáticas que consume, si no también, de la mayor parte de la planta mediante el modo de excavación durante la alimentación

(Aragones, *et al.*, 2012), esto le permite mantener mayor contacto con el sedimento, incluso podría ingerirlo y consecuentemente aumentar la exposición a metales. En contraste, las crías se alimentan principalmente de la leche de las madres. En las crías de mamíferos marinos, metales como el Pb y Ni se transfieren con mayor facilidad a través de la lactación que mediante la vía placentaria, y se ha demostrado que estos metales aumentan su concentración conforme el estadio de edad del animal (Honda, *et al.*, 1986).

3.4 Concentraciones inusuales de Pb en tejido óseo de un organismo de la Bahía de Chetumal

En el caso específico de la alta concentración de Pb (128 µg/g) encontrada por Rojas-Mingüer y Morales-Vela (2002) en hueso de un manatí procedente de la Bahía de Chetumal, esta no fue corroborada en dicho estudio. Esta concentración de Pb es señalada como la inusualmente más alta reportada para cualquier mamífero marino (O'Shea, 2003). Esta observación mantuvo posteriormente la preocupación de que hubiera existido un error durante el proceso de extracción y análisis. Por lo que se retomó en esta tesis. El cráneo analizado previamente por Rojas Mingüer y Morales Vela (2002) con número de catálogo de colección MM014 (antes MO266) fue ahora particularmente evaluado, incluyendo en los análisis distintos tipos de huesos del cráneo (hueso temporal, nasal, mandíbula inferior y mandíbula superior). Las concentraciones promedio de Pb (\pm DE) obtenidas para este cráneo fueron 9.20 ± 5.37 µg/g, sin detectarse ninguna concentración inusual. Pero es importante señalar que en general en este estudio los valores promedio de las concentraciones de Pb registradas

son altas ($12.15 \pm 3.18 \mu\text{g/g}$) comparadas con algunos otros mamíferos acuáticos (Anexo 3).

La vida media del Pb en el hueso es de 10 a 30 años (D'Souza, *et al.* 2003; Hu, *et al.* 2007). El animal al que pertenece la muestra se encontró muerto hace 24 años y su primer análisis ocurrió hace 12 años, por lo que cabe esperar que sus niveles de concentración hayan disminuido ahora. Sin eliminar la probabilidad de que esa inusual lectura sea resultado de un error por contaminación de la muestra, sí es posible esperar que la menor concentración encontrada ahora se deba a una pérdida del plomo con el transcurso de los años. Basado en nuestros resultados, es necesario tomar con cautela este valor inusualmente alto informado anteriormente.

3.5 Niveles, correlación de concentraciones de metales y la implicación de riesgo para el manatí

El promedio de las concentraciones de metales se observa predominantemente alto al compararlo con lo publicado para tejido óseo de diversas especies de mamíferos acuáticos en el mundo (Anexo 3). Es importante mencionar que las concentraciones promedio encontradas en este estudio tienden a ser altas al igual que las reportadas por Rojas-Mingüer y Morales-Vela (2002), con excepción de las altas concentraciones de Pb y Ni que documentan esos autores.

Las concentraciones de Zn fueron altas, sin embargo no son tan elevadas comparadas con otros mamíferos marinos. El Zn es un metal esencial que se encuentra relacionado con diversos procesos fisiológicos como el crecimiento y la reproducción, también es conocido que este elemento es necesario en la cicatrización y en la síntesis de colágeno en el tejido óseo (Puls, 1988). Se ha documentado incluso que juega un rol

importante en la transcripción genética y que en manatíes de vida libre y en cautiverio se han encontrado niveles elevados de Zn sin encontrar signos clínicos de intoxicación (Takeuchi, 2012).

En un estudio sobre metales en el *Dugong dugong* (Denton, *et al.*, 1980) se sugiere que son necesarios elevados niveles de Zn en sirenios y que su acumulación puede ser parte de un proceso fisiológico normal. La absorción y acumulación del Zn no solo depende de la ingestión a través de la dieta, sino de otros factores como la talla del animal y de la interacción con otros metales como el Cu, que inhibe la absorción del Zn, incluso una deficiencia de Zn aumenta la absorción de Cr (Underwood, 1977). En el presente estudio se pudo observar una elevada correlación del Zn con Cu, Cd y Pb (Anexo 4).

Es importante mencionar que las correlaciones entre los metales no se comportaron de la misma manera en las dos regiones, en la región del Golfo de México se observó que los metales que presentaron alta correlación fueron el Cr, Cd y Ni, mientras que en la región del Caribe mexicano las correlaciones más altas ocurrieron con el Zn, Pb, Cu y Cd (Anexo 5).

La divergencia entre las correlaciones según la región puede deberse a que las especies de vegetación en la dieta de los manatíes es distinta, en Tabasco se reportó *Echinochloa polystachya* con la mayor ocurrencia en heces (Ponce-García, 2013), se conoce que este pasto tiene capacidad de absorber y acumular Cr, Cd y Ni entre otros metales en sus raíces y hojas (Pastor-Rojas *et al.*, 2009; Barajas-Aceves *et al.*, 2014). En contraste, en la Bahía de Chetumal y sitios cercanos se identificó en heces *Rhizophora mangle* como parte de la dieta del manatí (Castelblanco-Martínez, *et al.*, 2009; Flores-Cascante, *et al.*, 2013) esta especie vegetal tiene la capacidad de

acumular Zn, Pb, Cu y Cd en las raíces absorbentes, hojas, tallo y raíces aéreas (Naranjo-Sánchez y Troncoso-Olivo, 2008).

En general, se pudieron observar correlaciones positivas entre todos los metales (excepto el As, que no mostró correlación con ninguno); sin embargo, no se puede conocer si existe destoxificación de estos elementos o una homeostasis entre los metales no esenciales y esenciales. La correlación positiva hallada, solo sugiere que si el manatí sigue expuesto a estos metales con cronicidad puede causar riesgo a la salud, ya que la interacción de algunos metales puede generar daños. Está bien documentado que en ganado bovino y en humanos, por ejemplo, la interacción negativa entre Zn-Cd puede causar nefrotoxicidad y que la interacción negativa Zn-Pb puede causar efectos sobre el comportamiento, en ambos casos por la menor concentración de Zn y aumento de la concentración del metal no esencial (D'Souza, *et al.*, 2003; Hooser, 2012).

Para conocer los daños en la salud del manatí, es necesario conocer los niveles máximos tolerables de metales y estos aún no se conocen para la especie. Dada esta falta de conocimiento y para tener un marco de referencia, usamos los niveles de tolerancia para los animales domésticos reportados por el National Research Council (1980), observando que las concentraciones encontradas no son elevadas. Pero al compararlos con los niveles de referencia clínica de algunos metales propuestos por Takeuchi (2012) para el manatí, las concentraciones encontradas en este estudio son altas y esto podría sugerir clínicamente riesgo para la especie.

3.6 Otros hallazgos relevantes

Un importante hallazgo en este estudio fue la presencia de As en el tejido óseo de los manatíes, puede deberse a que los pesticidas utilizados en la agroindustria desarrollada cerca de la Bahía de Chetumal son una fuente potencial de este metal. En el Río Hondo se ha registrado elevada concentración de As ($53 \mu\text{g/l}$) en columna de agua (Buenfil-Rojas y Flores-Cuevas, 2007), superior a los límites permisibles para agua dulce por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos.

Otra fuente probable, a la cual puede atribuirse la presencia de As en las muestras, es la industria pecuaria. El As se utiliza principalmente en la producción intensiva de cerdos y aves, también la combustión de petróleo es otra fuente importante (Agrawal, *et al.*, 2011), estas actividades podrían ser la causa de la presencia de As en algunas muestras pertenecientes al Golfo de México, al haber una alta producción de aves, cerdos y petróleo en la región.

Cabe destacar que en la Bahía de Chetumal no hay registro de As en tejidos de organismos, este es el primer reporte. Particularmente para el manatí es el segundo reporte de As, la concentración encontrada en este estudio $25.02 \pm 24.28 \mu\text{g/g}$ es mayor a la reportada por Siegal-Willot, *et al.* (2013) en sangre entera ($0.493 \pm 0.25 \text{ ppm}$) y suero ($0.017 \pm 0.02 \text{ ppm}$).

La falta de estudios y reportes de As no permite conocer las implicaciones que tiene sobre la salud del manatí, aunque es bien conocido en mamíferos domésticos que puede causar severos daños neurológicos, digestivos y respiratorios, con signos clínicos como ataxia, disnea (en casos crónicos), diarrea, hematuria, eritema (Anexo 6) y en casos extremos de intoxicación causa la muerte (Garland, 2012), por lo tanto es necesario realizar posteriores estudios prestando fina atención en este elemento.

Capítulo IV. Conclusiones

1. Se confirma la exposición y acumulación de metales no esenciales (Cd y Pb) y esenciales (As, Cr, Cu, Ni, y Zn) en tejido óseo de manatí antillano.
2. Los análisis estadísticos muestran que existen diferencias en las concentraciones de Cr, Cu, Pb y Zn en el tejido óseo de manatí provenientes de las costas del Golfo de México y del Caribe mexicano. Estas diferencias están relacionadas a la variación de fuentes de contaminación en las regiones de estudio, por una parte la industria petrolera destaca en la región del Golfo de México, mientras en el Caribe, los contaminantes están asociados a los agroquímicos.
3. No se encontraron concentraciones inusuales de Pb en la Bahía de Chetumal como la reportada por Rojas-Mingüer y Morales-Vela (2002). La inusual concentración reportada alude a un probable error o contaminación durante la extracción y análisis de la muestra (MM014) en dicho estudio. Otra causa de no encontrar la inusual concentración en el presente estudio, puede ser la probable disminución del Pb en la muestra de tejido óseo a través de los años hasta la actualidad.
4. Las concentraciones de Pb mostraron diferencias entre edades, probablemente debido al tiempo de exposición. Esto sugiere que la exposición a este elemento en su hábitat es crónica y puede ser un factor de riesgo a largo plazo para la salud de los animales de mayor edad y en etapas reproductivas.
5. Las concentraciones obtenidas no permiten conocer el efecto en la salud del manatí, pero sugieren probable riesgo al ser mayores a los niveles basales en sangre reportados.

6. Las correlaciones positivas encontradas entre las concentraciones de los metales no permiten conocer si existe homeostasis de estos, pero si pueden sugerir que algunas de ellas podrían causar daños a la salud si continúa la exposición que permite la acumulación de estos metales en el manatí. Otros metales como el Calcio (Ca) y Hierro (Fe) serán analizados posteriormente.

7. Es necesario realizar estudios con mayores consideraciones sobre el tamaño de muestra, análisis de otros órganos blanco de metales no esenciales como el riñón, hígado y tejidos como la sangre para poder conocer si existe alguna relación entre la concentración y los órganos, cambios en niveles y morfología de células sanguíneas, y de esta manera poder inferir sobre la salud de la población, así como cubrir la falta de información sobre los niveles basales y de tolerancia mineral de la especie, útil para su aplicación clínica, el manejo y conservación del manatí así como la comprensión de eventos de mortalidad.

8. Para poder obtener mayor número de muestras y tejidos también es necesario realizar el estudio en animales vivos y que el sistema de varamientos así como los procedimientos de necropsia estén bien organizados y sistematizados, con el fin de obtener la mayor cantidad de información útil posible para realizar otros estudios similares al presente y/o relacionados.

Aspectos éticos en la investigación

No se requirió la captura o manejo de organismos vivos. Todos los tejidos óseos provienen de animales varados y de los cuales fueron recuperados sus restos óseos para investigación posterior. No se generó ningún conflicto de interés durante la investigación. Las muestras de Quintana Roo provienen de la Colección de Mamíferos Marinos de ECOSUR con Clave de registro de SEMARNAT No. DF-CC-277-13 (Anexo 7).

Literatura Citada

- Aguilar-Ucán, C.A., Montalvo-Romero, C., Ramírez-Elias, M. A., Barrera, C.G., 2009. Metales pesados en sedimentos del arroyo “La Caleta” de Ciudad del Carmen, Campeche, México: Estudio preliminar. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5 (3), pp. 232-237.
- Agrawal, I., Sherameti, I., Varma, A., 2011. Detoxification of Heavy Metals: State of Art. En: I. Sherameti, A. Varma, eds. *Detoxification of Heavy Metals*, Soil Biology 30, Springer Verlag, Berlin.
- Álvarez-Legorreta T., 2009. Contaminación Acuática. En: J. Espinoza-Ávalos, G.A. Islebe, H. Hernández-Arana, eds. *El sistema ecológico de la bahía de Chetumal / Corozal: costa occidental del Mar Caribe*. ECOSUR. Chetumal, Quintana Roo, México. pp. 205-217.
- Aragones, L.V., Lawler, I., Marsh, H., Domning, D., Hodgson, A., 2012. The role of sirenians in aquatic ecosystems. *Sirenian Conservation: Issues and Strategies in Developing Countries*, En: E. Hines, J. Reynolds, A. Mignucci-Giannoni, L. Aragones and M. Marmontel (eds), Gainesville: University Press of Florida. pp. 4-11
- Barajas-Aceves, M., Camarillo-Ravelo, D., Rodríguez-Vázquez, R., 2014. Mobility and Translocation of Heavy Metals from Mine Tailings in Three Plant Species after Amendment with Compost and Biosurfactant. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, únicamente aceptado, p. 00-00.

Benítez, J.A., J. Vidal., T. Bricchieri-Colombi and Delgado-Estrella, A., 2012. Monitoring ecosystem health of the Terminos Lagoon region using heavy metals as environmental indicators. Pp. 349-358. En: C.A. Brebbia, T.S. Chon, eds. WIT Transactions on Ecology and The Environment, Vol. 162. WIT Press. WWW. Witpress.com, ISSN 1743-3541 (on-line).

Boden, E., 2005. *Black's veterinary dictionary*. 21 ed. London: A. & C. Black.

Bonde, R. K., Aguirre, A. A., Powell, J., 2004. Manatees as sentinels of marine ecosystem health: are they the 2000-pound canaries?. *EcoHealth*, 1(3), pp.255-262.

Botello, A.V., Rendón von Osten, J., Gold-Bouchot, G., Agraz-Hernández, H., 2005. Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología.

Bossart, G. D., 2011. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. *Veterinary Pathology Online*, 48(3), pp.676-690.

Bradl, H., 2005. Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation: Origin, Interaction and Remediation. Academic Press. (Vol. 6).

Buenfil-Rojas, M., Flores-Cuevas, N., 2007. Determinación de metales pesados (As, Cd, Hg y Pb) presentes en el Río Hondo, Quintana Roo. En: VI Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales, Memorias en extenso,

Ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México. Universidad Autónoma de Chihuahua, Academia Nacional de Ciencias Ambientales, pp.435–439.

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), pp.39-46.

Castelblanco-Martínez, D.N., Padilla-Saldivar, J., Hernández-Arana, H.A., Slone, D.H., Reid, J.P., Morales-Vela, B. 2013. Movement Patterns Of Antillean Manatees In Chetumal Bay (Mexico) And Coastal Belize: A Challenge For Regional Conservation. *Marine Mammal Science*, (29), pp.166-182.

Chavira-Mártinez, D., Briceño-González, J., Negroe, A., Pérez-Cetina, J., Sánchez, T., Hoil, R., 1992. Diagnóstico de la calidad del agua en la Bahía de Chetumal, Q. Roo. *Avacient* (3), pp.16-31.

Cisneros O, Rivas, A., Díaz, J., Castanedo V., 2011. Tratamiento de las aguas residuales del Ingenio Casasano en un humedal de flujo intermitente. IMTA-SEMARNAT, México.

Contreras, F., 1985. Las lagunas costeras mexicana. Centro de Ecodesarrollo/Secretaría de Pesca, México, D.F.

D'Souza, H. S., Menezes, G., Venkatesh, T., 2003. Role of essential trace minerals on the absorption of heavy metals with special reference to lead. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 18(2), pp.154-160.

- Das, K., Debacker, V., Pillet, S., Bouquegneau, J. M., 2003. Heavy metals in marine mammals. En: T. Vos, J.V. Bossart, G.F. Forunier, M. O'Shea, ed. *Toxicology of Marine Mammals*. Washington D.C.: Taylor and Francis Publishers, pp. 135–167.
- Day J., Díaz A., González G., Moreno-Casasola P., Yáñez Arancibia A., 2004. Diagnóstico Ambiental del Golfo de México. Resumen Ejecutivo. En: M. Caso, I. Pisanty, E. Ezcurra, eds. Diagnóstico Ambiental del Golfo de México (Vol. 1).
- Denton, G. R. W., Marsh, H., Heinsohn, G.E., Burdon-Jones, C., 1980. The unusual metal status of the Dugong (*Dugong dugon*). *Mar. Biol.* (57), pp.201–219.
- Díaz-López, C., Carrión-Jiménez, J. M., González-Bucio, J.L., 2006. Estudio de la contaminación por Hg, Pb, Cd y Zn en la bahía de Chetumal, Quintana Roo, México. *Rev. Soc. Quím. Perú*, Lima, 72(1).
- Dyce, K. M., Sack, W., Wensing, C., 1999. Anatomía Veterinaria. 2a. edición. *Ed. McGrawHill Interamericana*. México, D.F.
- Euán-Ávila J.I, Liceaga-Correa, M.A., Rodríguez-Sánchez, H., 2002. Caracterización de fuentes no puntuales de contaminación agrícola en el municipio de Othón P. Blanco en Quintana Roo y su potencial influencia en la Bahía de Chetumal. En: F.J. Rosado-May, R. Romero-Mayo, A De-Jesús-Navarrete, eds. Contribuciones de la ciencia al manejo costero integrado de la Bahía de Chetumal y su área de influencia. UQROO, Chetumal, Quintana Roo, México. pp. 197–204.
- Florea, A. M., Büsselberg, D., 2006. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals*, 19(4), pp.419-427.

- Flores-Cascante, L., Morales-Vela, B., Castelblanco-Martínez, N., Padilla-Saldívar, J., Auil, N., 2013. Elementos de la dieta del manatí *Trichechus manatus manatus* en tres sitios importantes para la especie en México y Belice. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, (5), pp.25-36.
- Fujise, Y., Honda, K., Tatsukawa, R., and Mishima, S., 1988. Tissue distribution of heavy metals in Dall's porpoise in the northwestern Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 19(5), pp. 226-230.
- García-Ríos, V., y Gold-Bouchot, G., 2003. Trace metals in sediments from Bahía de Chetumal, Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 70(6), pp.1228-1234.
- Garland, T., 2012. Arsenic. En: R.C. Gupta, ed. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. Academic press. pp. 499-502.
- Gobierno del Estado de Quintana Roo, 1997. Periódico Oficial del Gobierno del Estado de Quintana Roo, 24 de Octubre.
- Goldblatt, C. J., Anthony, R. G., 1983. Heavy metals in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) from the Pribilof Islands, Alaska. *Journal of environmental quality*, 12(4), pp.478-482.
- Helrich, K., 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Airlington, VA, USA. p.84.

- Honda, K., Fujise, Y., Tatsukawa, R., Itano, K., Miyazaki, N., 1986. Age-related accumulation of heavy metals in bone of the striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*. *Marine environmental research*, 20(3), pp.143-160.
- Hooser, S., 2012. Cadmium. En: R.C. Gupta, ed. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. Academic press. pp. 422-426.
- Hu, H., Shih, R., Rothenberg, S., Schwartz, B.S., 2007. The epidemiology of lead toxicity in adults: measuring dose and consideration of other methodologic issues. *Environmental health perspectives*, 115(3), pp.455.
- Kramer, P.A., Kramer, P.R., 2002. Ecoregional conservation planning for the Mesoamerican Caribbean Reef (MACR). M. McField, ed. Word Wildlife Found.
- Lavery, T.J., Butterfield, N., Kemper, C.M., Reid, R.J., Sanderson, K., 2008. Metals and selenium in the liver and bone of three dolphin species from South Australia, 1988–2004. *Science of the Total Environment*, 390(1), pp.77-85.
- Macías-Zamora, J.V., Villaescusa-Celaya, J.A., Munoz-Barbosa, A., Gold-Bouchot, G., 1999. Trace metals in sediment cores from the Campeche shelf, Gulf of Mexico. *Environmental Pollution*, 104(1), pp. 69-77
- Marsh, H., O'Shea, T.J., Reynolds III, J.E., 2011. *Ecology and conservation of the Sirenia: dugongs and manatees* (No. 18). Cambridge University Press.
- Moller, R.B., 2003. Pathology of marine mammals with special reference to infectious diseases. En J.G. Vos, G. Bossart, M, Fournier, T. O'Shea, eds. *Toxicology of marine mammals*, 3, pp.6-8.

- Mössner, S., Ballschmiter, K., 1997. Marine mammals as global pollution indicators for organochlorines. *Chemosphere*, 34(5), pp. 1285-1296.
- Naranjo-Sánchez, Y.A., Troncoso-Olivo, W., 2008. Contenidos de cadmio, cobre, zinc y plomo en órganos de *Rhizophora mangle* de la Ciénega Grande de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 37(2), pp.107-129.
- National Research Council, 1980. Mineral tolerance of domestic animals, 1st edn. National Academy of Sciences, Washington.
- O'Hara, T. M., O'Shea, T. J., 2005. Assessing impacts of environmental contaminants. Marine mammal research: conservation beyond crisis. En: J.E., Reynolds III, W.F., Perrin, R.R., Reeves, S., Montgomery, T.J., Ragen, eds. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, pp. 63-83.
- O'Shea, T. J., 2003. Toxicology of sirenians. En: *Toxicology of Marine Mammals*, T. Vos, J.V. Bossart, G.F. Forunier, M. O'Shea, eds. Washington D.C. Taylor and Francis Publishers, pp. 270–287.
- O'Shea, T.J., Beck, C. A., Bonde, R. K., Kochman, H. I., Odell, D.K., 1985. An analysis of manatee mortality patterns in Florida, 1976-81. *The Journal of wildlife management*. 49(1), pp.1-11.
- Paez-Osuna, F., Valdez-Lozano, D., Alexander, H., Fernández-Pérez, H., 1987. Níquel y plomo en las fracciones disuelta y particulada del sistema fluvio-lagunar de

Laguna de Términos, México. *Anales del Instituto de Ciencias Marinas y Limnología*. (14), pp.79-86.

Páez-Osuna, F., 2005. Fuentes de Metales en la Zona Costera Marina. En: A.V. Botello, J. Rendón-Von Osten, G. Gold-Bouchot, C. Agraz-Hernández, eds. Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental. Diagnóstico y Tendencias, 2nd ed. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. De México, Instituto Nacional de Ecología., Campeche, pp.329–342

Pastor-Rojas, R., Ríos, A. S., Sánchez, A. S., Pinedo, L. R., del Águila, S., Armas, P., Rengifo, R., 2009. Fitorremediación en el tratamiento de las aguas residuales con metales con especies del humedal natural de Pampa Chica-Iquitos. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Informe Técnico.

Pattee, O., Pain, D., 2003. Lead in the environment. En: D. Hoffmann, B. Rattner, G. Burton, J. Cairns, eds. Handbook of Ecotoxicology, 2nd ed. CRC Press, pp.374-399

Ponce-García, G., 2013. Determinación de la composición botánica en heces de manatí (*Trichechus manatus manatus*) en la Laguna de las Ilusiones, Villahermosa, Tabasco. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Puls, R., 1988. Mineral Levels in Animal Health: Diagnostic Data. Sherpa International, Clearbrook, British Columbia, Canada.

Reep, R., Bonde, R., 2006. The Florida manatee: Biology and Conservation. University Press of Florida. Florida, USA.

- Reijnders, P.J., 1986. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature*. 324 (6096), pp.456-457.
- Repetto M, Sanz P., 1995. Glosario de términos toxicológicos. IUPAC. Versión española ampliada. Sevilla: Asociación Española de Toxicología.
- Rojas-Mingüer, A., Morales-Vela, B., 2002. Metales en hueso y sangre de manatíes de (*Trichechus manatus manatus*) de la Bahía de Chetumal, Quintana Roo, México. En: F.J. Rosado-May, R. Romero Mayo, A. De Jesús Navarrete, eds. Contribuciones de la ciencia al manejo costero integrado de la Bahía de Chetumal y su área de influencia. Universidad de Quintana Roo, Chetumal, Q. Roo, México, pp.133-142.
- Rosales-Hoz, L., Carranza-Edwards, A., Santiago-Pérez, S., Méndez-Jaime, C., Doger-Badillo, R., 1994. Study of anthropogenically induced trace metals on the continental shelf in the southeastern part of the Gulf of Mexico. *Revista internacional de contaminación ambiental. Tlaxcala*, 10(1), pp.9-13.
- Sánchez, A., Álvarez-Legorreta, T., Sáenz-Morales, R., Ortiz-Hernández, M.C., López-Ortiz, B.E., Aguíñiga, S., 2008. Distribución de parámetros texturales de los sedimentos superficiales en la Bahía de Chetumal: Implicaciones en la inferencia de transporte. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 25(3), pp.523-532.
- Stavros H.C., Bonde R.K., Fair P.A., 2008. Concentrations of trace elements in blood and skin of Florida manatees (*Trichechus manatus latirostris*). *Marine Pollution Bulletin*. (56), pp.1221-1225.

- Sekabira, K., Oryem-Origa, H., Basamba, T.A., Mutumba, G., Kakudidi, E., 2012. Grain Size and Source Apportionment of Heavy Metals in Urban Stream Sediments. En: N. Balkis, ed. *Water Pollution*. Intech. Croacia, pp. 69-88.
- SEMARNAT, 1996. Contaminación química en la Bahía de Chetumal. Boletín Caribe. Delegación Quintana Roo. México.
- SENER, 2013. Prospectiva de Petróleo y Petrolíferos 2013-2027. [En línea] Disponible en:http://sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2013/Prospectiva_de_Petroleo_y_Petroliferos_2013-2027.pdf [Acceso: 13 de Octubre de 2014].
- Siegal-Willott, J.L., Harr, K.E., Hall, J.O., Hayek, L.A.C., Auil-Gomez, N., Powell, J.A., Heard, D., 2013. Blood mineral concentrations in manatees (*Trichechus manatus latirostris* and *Trichechus manatus manatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(2), pp.285-294.
- Takeuchi, N.Y., 2012. Trace metal concentrations and the physiological role of zinc in the West Indian manatee (*Trichechus manatus*). Doctorado. University of Florida.
- Thompson, J., 2012. Lead. En: R.C. Gupta, ed. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*. Academic press. pp. 438-441.
- Triffitt, J.T., 1985. Receptor molecules, coprecipitation and ion exchange process in the deposition of metal ions in bone. En: N.D. Priest, ed. *Metals in Bone Radiation Protection*. Proceedings of a EU LEP symposium on the deposition, retention and effects of radioactive and stable metals in bone and marrow tissues. EULEP

Symposium, 11–13 October 1984, Angers, France. MTP Press Limited, Lancaster, UK.

Trigo- Tavera, F.J., Valero-Elizondo, G., 2004. Patología Veterinaria. 4^a ed. México: UNAM.

Trillanes-Flores, C., 2013. Análisis de minerales no esenciales en escamas de *Crocodylus crocodylus moreletii* en Campeche México. Maestría. El Colegio de la Frontera Sur-ECOSUR, Campeche, México.

Underwood, E., 1977. Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, New York. pp.196–247.

Vázquez-Botello, A., Villanueva-Fragoso, S., Rosales-Hoz, L., 2004. Distribución y contaminación por metales en el Golfo. En: M., Caso, I., Pisanty, E., Ezcurra, eds. Diagnóstico ambiental del Golfo de México. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. pp.681-710.

Vázquez, G.F., Sharma, K.V., 2004. Major and trace elements in sediments of the Campeche Sound, South-east Gulf of México. Mar. Pollut. Bull., 48(1/2), pp.87-90.

Vázquez, G.F. Sharma, V. K., Magallanes, V. R., Marmolejo, A. J., 1999. Heavy metals in a coastal lagoon of the Gulf of Mexico. *Marine pollution bulletin*, 38(6), pp.479-485.

- Vázquez, G. F., Sharma, V. K., Mendoza, Q. A., Hernández, R., 2001. Metals in fish and shrimp of the Campeche Sound, Gulf of Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 67(5), pp.756-762.
- Vázquez, F., Sharma, V., Pérez-Cruz, L., 2002. Concentrations of elements and metals in sediments of the southeastern Gulf of Mexico. *Environmental Geology*, 42(1), pp.41-46.
- Villanueva-Estrada, R.E., 2000. Evaluación de Metales Pesados en el área de las Plataformas Petroleras de la Bahía de Campeche. Master Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mex
- Wagemann, R., Stewart, R.E.A., Lockhart, W.L., Stewart, B.E., Povoledo, M., 1988. Trace metals and methyl mercury: associations and transfer in harp seal (*Phoca groenlandica*) mothers and their pups. *Marine Mammal Science*, 4(4), pp.339-355.
- Wagemann, R., Muir, D.C.G., 1984. Concentrations of Heavy Metals and Organochlorines in Marine Mammals of Northern Waters: Overview and Evaluation Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences. (1279).
- Watanabe, I., Ichihashi, H., Tanabe, S., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E. A., Tatsukawa, R., 1996. Trace element accumulation in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal. *Environmental Pollution*, 94(2), pp.169-179.

Yamamoto, Y., Honda, K., Hidaka, H., Tatsukawa, R., 1987. Tissue distribution of heavy metals in Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*). *Marine pollution bulletin*, 18(4), pp.164-169.

Anexos

Anexo 1. Promedio de la concentración de metales ($\mu\text{g/g}$) encontrados en sedimento, agua, mejillones y otros organismos en el Golfo de México y Bahía de Chetumal.

Material Analizado	Metales							Referencia
	As	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn	
Sedimento			193		18			Rosales Hoz <i>et al.</i> (1994)
Sedimento	0.09	0.09	39.8	7.5	4.3	23	18.5	Macías-Zamora <i>et al.</i> (1999)
Agua fresca		0.016		0.01		0.027	0.025	
Agua en estuario		0.034		0.022		0.117	0.061	Vázquez <i>et al.</i> (1999)
Agua en laguna		0.048		0.035		0.225	0.057	
<i>Syacium gunteri</i>		1.22	95.2	3.48	2.57			Vázquez <i>et al.</i> (2001)
<i>Lutjanus analís</i>		<0.01	98.9	1.29	4.68			
Sedimento		3.45	74.5	9.4	107	71.3		Vázquez <i>et al.</i> (2002)
Columna de agua		0.001		0.047	0.023	0.028	0.057	García-Ríos y Gold Bouchot (2003)
<i>Crasostrea virginica</i>		5.33	4.17		4.59			Vázquez-Botello <i>et al.</i> (2004)

Sedimento	1.5	8.2							Aguilar-Ucán <i>et al.</i> (2009)
<i>Trichechus manatus manatus</i>	0.01	0.38	0.78	0.026			6.09		Benítez <i>et al.</i> (2012)
<i>Crocodylus moreletii</i>	0.264			25.8	14.75				Trillanes-Flores (2013)
Bahía de Chetumal									
Hueso de manatí	3.0-5.0	2.6-3.7	2-7.5	34-46	10.0-15.0		192		Rojas-Mingüer y Morales-Vela (2002)
Sedimento	0.05-1.00			0.17-5.63			85.48		Díaz-López <i>et al.</i> (2006)
Mejillones	0.2-0.7			0.3-3.20			28.25		Díaz-López <i>et al.</i> (op cit)
Columna de agua	53	5.78		0.4					Buenfil-Rojas y Flores-Cuevas (2007)

Anexo 2. Número de registro del museo, sexo, edad y concentración de metales ($\mu\text{g/g}$) en tejido óseo de *Trichechus manatus* en Bahía de Chetumal, Tabasco y Campeche, México.

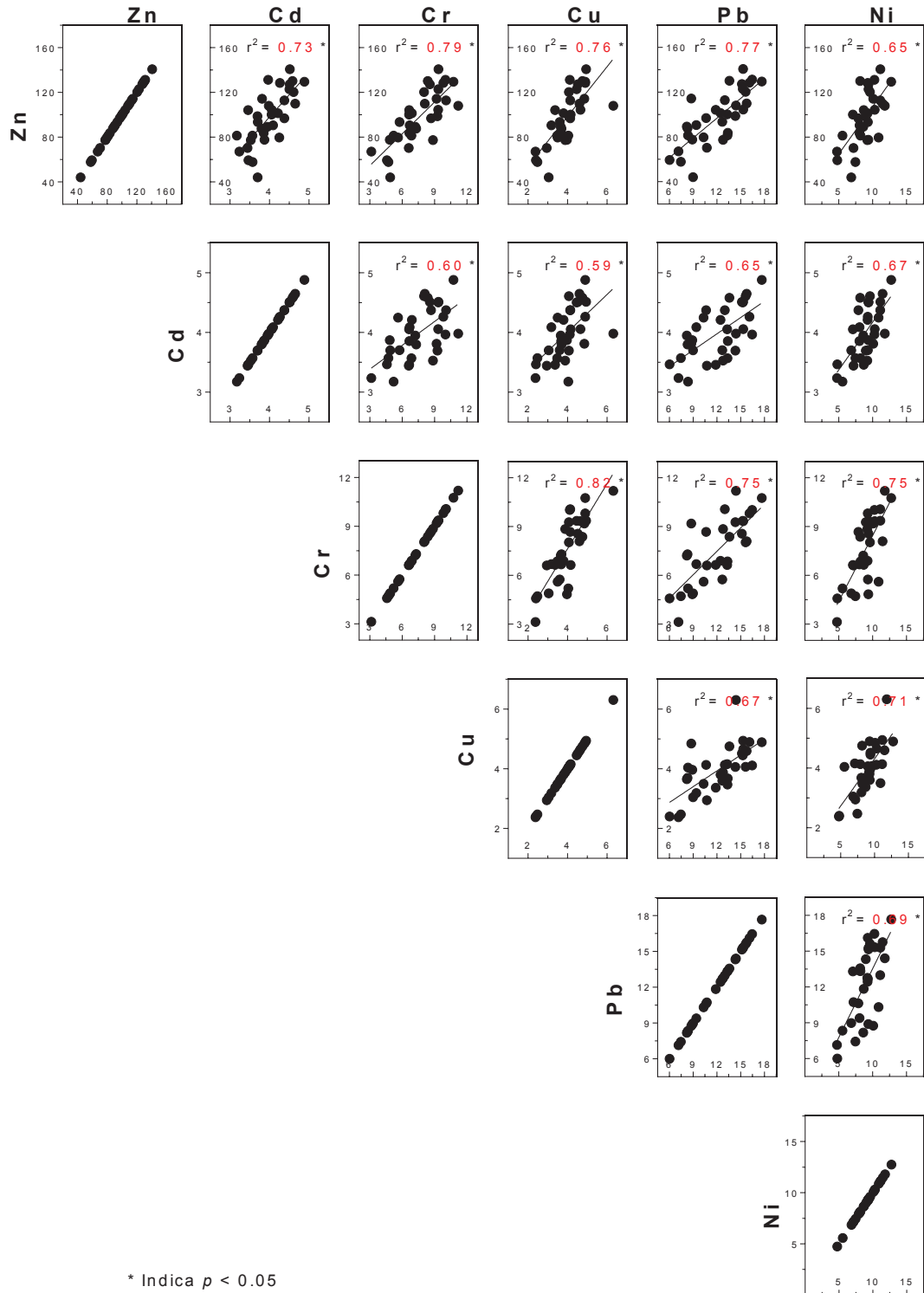
Sitio	No. De Registro (Museo)	Sexo	Edad	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn	As
Chetumal	MM026	I	I	4.053	6.631	4.156	13.300	7.095	100.261	22.439
Chetumal	MM030	H	Adulto	3.855	6.667	3.676	13.373	8.043	83.649	ND
Chetumal	MM036	M	Adulto	4.581	8.364	4.750	13.570	8.162	130.225	22.893
Chetumal	MM037	M	Cría	3.459	6.640	3.366	11.850	8.677	104.176	ND
Chetumal	MM039	I	I	3.871	4.837	3.970	8.893	9.369	77.707	40.008
Chetumal	MM040	I	I	4.248	5.611	3.497	10.316	10.868	79.666	17.680
Chetumal	MM044	M	Cría	3.236	3.130	2.377	7.142	4.732	67.097	8.479
Chetumal	MM049	M	Adulto	4.881	10.749	4.891	17.664	12.737	129.468	88.928
Chetumal	MM054	M	Adulto	3.701	4.888	3.046	8.986	6.848	44.037	ND
Chetumal	MM062	H	Cría	3.176	5.196	4.040	8.338	5.560	81.450	ND
Chetumal	MM064	I	I	3.697	9.268	4.064	14.335	8.998	98.772	ND
Chetumal	MM065	M	Adulto	4.212	6.892	3.800	12.442	9.255	101.404	299.566
Chetumal	MM067	M	Cría	3.948	7.209	3.655	8.187	8.625	89.246	ND
Chetumal	MM068	M	Cría	4.090	6.691	3.185	9.395	8.073	90.644	ND
Chetumal	MM069	M	Cría	4.505	9.343	4.455	15.271	9.385	122.833	9.065
Chetumal	MM072	H	Cría	3.465	4.577	2.401	6.010	4.778	59.432	ND
Chetumal	MM073	M	Cría	3.798	7.290	3.696	8.279	46.521	87.628	ND
Chetumal	MM079	M	Cría	3.444	6.611	2.948	10.726	7.180	70.357	ND
Chetumal	MM077	M	Adulto	3.570	4.715	2.473	7.430	7.449	57.801	ND
Chetumal	MM086	H	Adulto	3.703	5.749	3.603	12.684	9.288	93.524	ND
Chetumal	MM014	I	Adulto	4.649	8.095	4.598	15.761	11.473	109.922	ND
Chetumal	MM079	H	Adulto	4.374	10.060	4.134	12.989	11.117	112.885	ND
PROMEDIO DESV. EST.				3.933	6.782	3.672	11.225	10.192	90.554	28.16
EST.				0.470	1.937	0.723	3.155	8.366	22.955	26.48
Tabasco		M	Adulto	4.374	8.669	4.134	10.628	7.905	96.862	ND
Tabasco		M	Adulto	3.981	11.192	6.310	14.408	11.788	108.070	ND
Tabasco		I	Adulto	4.265	9.809	4.896	16.118	9.273	128.448	ND
Tabasco		M	Cría	4.513	9.359	4.942	15.298	11.135	140.697	ND
Tabasco		H	Cría	4.510	8.559	4.519	15.157	9.391	127.276	13.987
Tabasco		H	Cría	3.812	9.184	4.849	8.757	10.076	114.396	ND
Tabasco		H	Adulto	4.055	9.328	4.656	15.328	10.308	104.464	ND
PROMEDIO DESV. EST.				4.216	9.443	4.901	13.670	9.982	117.173	
EST.				0.273	0.881	0.681	2.815	1.283	15.531	
Campeche		M	Adulto	3.528	8.844	3.878	12.767	9.206	77.414	10.940
Campeche		M	Adulto	3.569	6.850	3.473	13.337	8.196	81.418	ND
Campeche		M	Adulto	4.608	8.024	4.068	15.622	9.601	120.367	ND
Campeche		I	Adulto	3.967	10.012	4.114	16.453	10.265	131.220	ND
PROMEDIO DESV. EST.				3.918	8.432	3.883	14.545	9.317	102.605	
EST.				0.501	1.334	0.292	1.772	0.866	27.189	

*ND= No se detectó; H= Hembra; M= Macho; I= Indefinido.

Anexo 3. Promedio (\pm DE) de la concentración de metales ($\mu\text{g/g}$) en diferentes tipos de hueso de mamíferos acuáticos alrededor del mundo.

Especie	Cd	Cr	Cu	Pb	Ni	Zn	Referencia
<i>T. m. manatus</i>							
Caribe mexicano	3.93 \pm 0.46	6.78 \pm 1.93	3.67 \pm 0.7 2	11.22 \pm 3.15	10.19 \pm 8.36	90.55 \pm 22.95	Present study
Golfo de México	4.10 \pm 0.37	9.07 \pm 1.12	4.53 \pm 0.7 5	13.99 \pm 2.42	9.74 \pm 1.15	111.9 \pm 20.51	
<i>T. m. manatus</i>	4 \pm 0.59	3.2 \pm 0.29	3.08 \pm 1.3 1	41 \pm 3.36	13 \pm 1.34	192 \pm 37.41	Rojas-Minguer y Morales-Vela, (2002)
<i>Phocoenoides dalli</i>	0.116 \pm 0.16		2.24 \pm 1.8 1	0.09 \pm 0.08	0.14 \pm 0.11	258 \pm 53.74	Fujise, et al., (1988)
<i>Callorhinus ursinus</i>	0.08 \pm 0.04			1.61 \pm 2.24	1.10 \pm 0.27	108.38 \pm 12.9	Goldblatt y Anthony (1983)
<i>S. coeruleoalba</i>	0.11 \pm 0.06		0.47 \pm 0.0 5	0.44 \pm 0.21	0.12 \pm 0.04	354.75 \pm 48.88	Honda, et al., (1986)
<i>Tursiops aduncus</i>	0.047 \pm 0.081			2.78 \pm 3.07			Lavery, et al., (2008)
<i>Tursiops truncatus</i>				0.85 \pm 0.19			Lavery, et al., (2008)
<i>Delphinus delphis</i>				1.03 \pm 0.55			Lavery, et al, (2008)
<i>Zalophus californianus</i>	2.85 \pm 0.48		3.70 \pm 0.2 6	27.79 \pm 1.45	35.73 \pm 6.45	59.11 \pm 12.24	Szteren y Auriolles-Gambo, (2013)
<i>Phoca sibirica</i>		0.295 \pm 0.0 6			0.215 \pm 0.06	130 \pm 28.28	Watanabe, et al., (1996)
<i>L. weddellii</i>	0.02 \pm 0.003			0.12 \pm 0.11	0.08 \pm 0.05	101.30 \pm 34.36	Yamamoto, et al. (1987)

Anexo 4. Correlatograma de las concentraciones de metales en tejido óseo de *Trichechus manatus* del Golfo de México y Caribe Mexicano.



Anexo 5. Correlación de Pearson y Spearman de las concentraciones de metales en tejido óseo de *Trichechus m. manatus* en la región del Golfo de México y Caribe Mexicano.

	Cd	Cu	Cr	Ni*	Pb	Zn
Cd		0.75	0.74	0.67	0.72	0.74
Cu	0.20		0.77	0.57	0.80	0.85
Cr	0.07	0.83		0.67	0.80	0.83
Ni*	0.18	0.66	0.67		0.50	0.58
Pb	0.37	0.09	0.21	0.35		0.81
Zn	0.70	0.39	0.41	0.50	0.48	

*Correlación de Spearman

Los valores en negritas corresponden a la región del Caribe Mexicano.

Anexo 6. Glosario

Los términos a continuación descritos fueron tomados de Repetto y Sanz (1995); Trigo-Tavera y Valero-Elizondo (2004) y Boden (2005).

Anemia es la disminución del hematocrito, hemoglobina y eritrocitos.

Ataxia significa la pérdida del poder de gobernar movimientos, aunque la potencia necesaria para estos movimientos es todavía presente. La ataxia es un signo que puede ser observado en condiciones diversas; por ejemplo, la rabia, debilidad o cansancio; encefalitis; meningitis; envenenamiento; un tumor cerebral.

Atrofia la disminución en el tamaño de la célula madura por una pérdida de sustancias celulares se conoce como atrofia. Ésta representa una forma de respuesta adaptativa y cuando afecta un número de células, todo el tejido u órgano disminuye de tamaño y función. Además de la reducción en el volumen celular, otra causa de atrofia celular, tisular u orgánica es la muerte celular programada (apoptosis) de un número importante de células, que ocurre durante la desaparición programada de tejido embrionario o linfoides como el timo, en la vida posnatal. Puede ser patológica o fisiológica y también puede ser reversible.

Discrasia Se refiere a cualquier desequilibrio en los componentes de la sangre, este término se utiliza para referirse a cualquier patología de la sangre.

Disnea Respiración dificultosa y entrecortada.

Eritema es un enrojecimiento de la superficie de la piel, en donde los vasos sanguíneos se congestionan de sangre.

Timo situado en la parte anterior de la cavidad torácica, esta glándula alcanza su tamaño más grande durante la vida temprana y mengua a partir de entonces gradualmente. El timo tiene un papel en la inmunidad ya que produce las células T. El fracaso de su función puede resultar en la enfermedad auto-inmune.

Medula ósea La sustancia suave que está encerrada dentro de las cavidades de los huesos. La medula amarilla debe su color a la gran cantidad de grasa contenida en ella, mientras que la médula roja es una estructura altamente celular. La formación de las células rojas de la sangre (eritrocitos) tiene lugar en la médula ósea, como también la de las plaquetas sanguíneas (trombocitos). La medula ósea es también la fuente de los linfocitos (Células B), monocitos, y leucocitos. Los **daños a la medula ósea** pueden ser distintos y se refieren a cualquier trastorno que pueda afectar a las células y la función que ésta produce.

Hematopoyesis es el proceso de la formación de células sanguíneas en las que se incluyen eritrocitos, leucocitos, y plaquetas en la médula ósea.

Hematuria La hematuria es la condición en la cual la sangre se encuentra en la orina.

Inmunosupresión Supresión de la respuesta inmune, dando lugar a mayor susceptibilidad de un animal a patógenos.

Pancitopenia La reducción en el número de glóbulos rojos, células blancas y plaquetas en la sangre; por lo general debido a una discrasia de médula ósea.

Anexo 7. Permiso de la Colección de Mamíferos Marinos de ECOSUR con Clave de registro DF-CC-277-13


SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE
OFICIO No. SGPÁ/DGVS/ 13
CIUDAD DE MÉXICO. 02393
26 MAR 2013

Handwritten notes: #, DGVS, Q. Roo, etc.

COLEGIO DE LA FRONTERA SUR (ECOSUR-CHETUMAL),
JOSÉ BENJAMÍN MORALES VELA
AV. DEL CENTENARIO KM. 5.5,
COL. PACTO OBRERO,
C.P. 77014, CHETUMAL, QUINTANA ROO,
TELÉFONO: (983) 835 04 40
E-MAIL: bmorales@ecosur.mx
PRESENTE:

Con fundamento en lo dispuesto en los artículos 27º tercer párrafo de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos; 26º y 32º Bis fracción I, III y XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, 19º fracción XXV y 32º fracción VI del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de noviembre de 2012; en relación con los artículos 79º, 80º, 82º, 86º y 87º de la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente; párrafo segundo del artículo 1º y artículo 79º de la Ley General de Vida Silvestre y artículos 12º y 131º del Reglamento de la referida Ley, se le otorga el registro No. DF-CC-277-13 para la colección denominada "Colección de Mamíferos Marinos-ECOSUR".

Asimismo, hago de su conocimiento que anualmente deberá actualizar el inventario, anexando al mismo las constancias foliadas del eventual movimiento de material biológico y/o copias simples de fichas de depósito, con la finalidad de que todos los ejemplares de vida silvestre que se incorporen a la colección cuenten con la documentación que ampare su legal procedencia, de conformidad con lo establecido en los Artículos 51º y 98º de la Ley General de Vida Silvestre y 53º, 126º y 131º del Reglamento de la misma.

Sobre el particular, encontrará anexo el documento de registro, solicitándole que sea exhibido en un lugar visible, en la ubicación de la colección de referencia, a fin de mostrarse a las autoridades competentes que así lo requieran.

Aprovecho para hacer de su conocimiento que deberá abstenerse de recibir o coleccionar ejemplares, partes o derivados que no cuenten con la documentación de legal procedencia para incrementar el acervo de la colección.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE,
EL DIRECTOR GENERAL DE VIDA SILVESTRE,

MVZ. JORGE MAXSABEDIAN DE LA ROQUETTE
ANEXO 1. REGISTRO DE LA COLECCIÓN CIENTÍFICA DF-CC-277-13
ANEXO 2. INVENTARIO DE LA COLECCIÓN CIENTÍFICA DF-CC-277-13


Copias al reverso /

1

SECRETARÍA DE AMBIENTE, ENERGÍA Y CLIMA
SEMARNAT
ESTADO DE QUINTANA ROO



C.c.p. Joel González Moreno - Dirección General de Inspección de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros - vida_silvestre@profepa.gob.mx
Raul Omar González Castilla - Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Quintana Roo - raul.gonzalez@semarnat.gob.mx
Noemi Ludvina Merchaca Castañeros - Delegada Federal de la PROFEPA en el Estado de Quintana Roo - noemiludvina@profepa.gob.mx
José Juan Martínez Rosario - Jefe del Departamento de Análisis para Licencias y Registros Interactivos - jose.martinez@semarnat.gob.mx
C:\Espaldado\ana\COLECCIONES CIENTIFICAS\registros\memoros_ecotur_277.docx

09/10-0370/02/13

BBN REGUJ/16/10/13

Anexo 8. Normas Editoriales de la revista Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

[Disponible en:

http://www.springer.com/environment/pollution+and+remediation/journal/128?detailsPage=pltc_i_1846722]

General

Articles suitable for inclusion in Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology should be short in length. Manuscripts must be in good, idiomatic English and must not exceed 8 single spaced pages, including figures, tables, and references. In the transmittal/cover letter, authors are required to recommend the names of at least two manuscript reviewers not affiliated with the authors' institutions. In addition, please provide rationale (e.g. expertise in a relevant area covered in manuscript) for selecting each of your recommended reviewers. Manuscripts without a transmittal letter and reviewer recommendations will be returned. Authors must describe the novelty or significance of their study and provide reason(s) for suitability for publication in BECT. Submitted manuscripts must include page and line numbers. Additionally, tables and figures must be inserted within the text or they will be returned. Finally, it is required that you only provide the following headings only, without any subheadings: Abstract, Keywords, Introduction, Methods and Materials, Results and Discussion, Acknowledgments and References).

We are striving to be a journal that provides rapid review and publication. Our current turnaround time for papers that are accepted for publication is approximately 4 months from the time your paper is submitted until it is accepted for publication.

Before proceeding to the "Manuscript Submission" tab, please take the time to read the Aims and Scope of BECT to ensure that your subject matter and content meet the outlined requirements.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 100 to 150 words

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Use a normal, 12-point Times New Roman for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

[Word template \(zip, 154 kB\)](#)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Genus and species names should be in italics.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)

Bold for vectors, tensors, and matrices.

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer

publishes in:

[Edanz English editing for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Edanz English editing for scientists

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” before the References when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

[here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the

ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.