TESIS DEFENDIDA POR

Norma Alejandra Larios Toledo

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director del Comité

Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez
Miembro del Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Miembro del Comité

Dr. Oscar Sosa Nishizaki
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador del programa de posgrado en Acuicultura

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

22 de *Marzo* de 2011

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN ACUICULTURA

EFECTO DE LA TEMPERATURA DE ACLIMATACIÓN Y DEL TAMAÑO DEL ALIMENTO EN EL METABOLISMO, EL CORTISOL Y EN LOS TEJIDOS HEPÁTICO Y RENAL DE LA SARDINA DE LA CORRIENTE DE CALIFORNIA ***Sardinops caeruleus***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Norma Alejandra Larios Toledo

Ensenada, Baja California, México, Marzo de 2011.

RESUMEN de la tesis de **Norma Alejandra Larios Toledo,** presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Marzo, 2011.

Efecto de la temperatura de aclimatación y del tamaño del alimento en el metabolismo, el cortisol y en los tejidos hepático y renal de la sardina de la corriente de California Sardinops caeruleus

Resumen aprobado por:

_____

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de Tesis

La sardina de la corriente de California *Sardinops caeruleus,* es un pez pelágico de importancia ecológica y pesquera, que se distribuye en las costas del Pacífico, desde Alaska hasta Baja California, México, incluyendo el Golfo de California. Se ha postulado la separación de esta especie en tres grupos que se relacionan con la temperatura del mar.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de tres temperaturas de aclimatación (15, 18 y 23 °C) y del tamaño del alimento (<500 y 1000-1180 µm) sobre la tasa de consumo de oxígeno de rutina, la acción dinámica específica asociada a la captura de alimento (SDAm) y a los procesos bioquímicos asociados (SDAb) y sobre algunos indicadores de estrés (cortisol en el plasma y alteracion de los tejidos hepático y renal). La muestra de sardinas juveniles (longitud total de 140±25 mm y un peso promedio 25±2.9 g) se obtuvieron de la pesca comercial en el mes de Junio en el Puerto de Ensenada. Las mediciones del consumo de oxígeno se hicieron en una cámara respirométrica de 160 l, con el método de respirometría intermitente. La mayor mortalidad se cuantificó a 23 °C y coincidió con el menor incremento en longitud y peso. El mejor crecimiento se observó a 18 °C con la dieta pulverizada. El SDAb fue mayor a 18 y 23 °C con la dieta particulada y pulverizada respectivamente. Se observó una relación inversa entre el SDAm y la temperatura de aclimatación. Los daños histológicos en el hígado de las sardinas tuvieron una relación directa con el incremento en la temperatura y fueron mayores en las sardinas aclimatadas a 23 °C y alimentadas con la dieta pulverizada, a 18 y 23 °C se observó una menor densidad de hepatocitos y una disminución en su diámetro celular. En las sardinas aclimatadas a 23 °C se observó un incremento en el número de los centros melanomacrófagos, en el espacio intraglomerular. La concentración de cortisol disminuye en una relacion inversa con la temperatura para los dos tamaños de partícula. Los contenidos calóricos del músculo blanco y del hígado fueron similares a las 3 temperaturas y con los dos tamaños de partícula.

Palabras Clave: *Sardinops caeruleus*, cortisol, estrés térmico, histología de riñón e hígado

ABSTRACT of the thesis presented by **Norma Alejandra Larios Toledo** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Aquaculture. Ensenada, Baja California, México Marzo, 2011.

ACCLIMATION TEMPERATURE AND FOOD SIZE ON THE METABOLISM, CORTISOL AND THE LIVER AND KIDNEY TISSUES OF THE CALIFORNIA CURRENT SARDINE *Sardinops caeruleus*

The sardine *Sardinops caeruleus* of the California current is an ecological and fisheries important pelagic fish which is distributed in the Pacific coast from Alaska to Baja California, Mexico, including the Gulf of California. It has been postulated that this species is separated by sea temperature in three different groups. This study aimed to determine the effect of three acclimation temperatures (15, 18 and 23 ° C) and food size (<500 and 1000-1180 μm) on the routine oxygen consumption rate, specific dynamic action associated with food capture (SDAm), the nutrients biochemical processes (SDAb), and some stress indicators (plasma cortisol and liver and kidney tissue alterations). The juvenile sardines (total length of 140 ± 25 mm and a mean weight of 25 ± 2.9 g) were obtained from commercial fishing in the month of June at the Ensenada harbor. The oxygen consumption measurements were made in a 160 l respirometric chamber using an intermittent respirometry method. The highest mortality was detected at 23 °C, and was related to the smallest increase in length and weight. The best growth rate was observed at 18 °C with the powdered diet. The higher SDAb was obtained at 18 and 23 °C, with the particulate and powdered diet, respectively. The SDAm showed an inverse relation with increasing acclimation temperature. A direct relation between histological damage in sardine live and increasing temperature was detected in sardines acclimated at 23 °C and fed with powdered diet. At acclimation temperatures of 18 and 23 °C, lower hepatocyte density and a decrease in cell diameter was observed. The sardines acclimated to 23 °C showed an increase in the number and area of melanomacrophage centers, and an increase in intraglomerular space. An inverse relation between plasma cortisol concentration and temperature at both particle sizes was detected. The white muscle and liver caloric content were similar at the three temperatures and the two food particle sizes.

Keywords: *Sardinops caeruleus*, cortisol, heat stress, liver and kidney histology

Dedicatorias

A Dios por haberme dado todo lo que he necesitado para cumplir una meta más en mi vida, mi familia y sobre todo a mi hijo.

A mis padres por ser los pilares en mi vida, por darme la fuerza necesaria para continuar, por ser mi apoyo y ayudarme en todo lo que hago, por ayudarme a levantarme cuando he caído, por haberme inculcado los valores y enseñanzas suficientes para volar más alto de lo que hubiera imaginado. Jamás podré pagarles por todo lo que me han dado y son los mejores padres que pude tener.

A mis hermanos por haberme apoyado siempre en todo lo que he emprendido en mi vida, por ser mis cómplices, mejores amigos y con quienes he tenido miles de aventuras y sueños. Una meta más a su lado, esto también es por y para ustedes hermanitos.

A TI MI AMADO HIJO, que sin ti no hubiera podido cumplir este sueño, gracias por hacer de mi vida una vida plena y haberme hecho la mujer más feliz del mundo, con nuevos sueños y retos, juntos venceremos cualquier obstáculo, le doy gracias a Dios cada día de mi vida por haberme dado la dicha de ser madre. Gracias IAN por llegar a mi vida.

A ti amiga Argelia, por haberme apoyado cuando más lo necesite, por estar ahí en los buenos y malos momentos, por haberme brindado tu ayuda y abrirme las puertas de tu casa, pero sobre todo gracias por tu amistad, espero algún día poder pagarte lo mucho que has hecho por mí, siempre podrás contar conmigo y sé que siempre contaré contigo, GRACIAS POR TODO AMIGA.

Víctor, gracias por estar siempre a mi lado, por apoyarme siempre aún a la distancia, por escucharme y estar siempre para mí.

A mis amigas Monse, Angy, Favi, Eda, porque aún en la distancia siempre están ahí para mí.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mis estudios, ya que sin dicho apoyo no hubiera sido posible la realización de éste trabajo.

Esta tesis fue financiada por el proyecto SEMARNAT-CONACYT No. 23658 "LA ECOFISIOLOGIA DE LOS PECES PELAGICOS DE IMPORTANCIA ECONOMICA, UNA HERRAMIENTA PARA PREDECIR LOS EFECTOS DEL CAMBIO CLIMATICO".

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por darme la oportunidad de superarme y por el apoyo brindado durante toda mi estancia.

Mi especial agradecimiento al Dr. Benjamín Barón Sevilla, por la paciencia que me tuvo a cada paso, por no dejarme desistir, por apoyarme hasta el final y por la confianza que me brindo en todo momento, Gracias!!!.

A mi comité de tesis por todos los conejos y aportes brindados durante la realización de este trabajo, Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, Dra. Mónica Hernández Ramírez y al Dr. Oscar Sosa Nishizaki.

Al Dr. Manuel Segovia Quintero por todo el apoyo que me brindo, por su sincera amistad, por todos los consejos, por escucharme cuando lo necesité y por ayudarme en los malos momentos y celebrar los buenos. Muchas Gracias!!!

Al técnico Francisco Valenzuela por su apoyo en la realización de las figuras de mi sistema experimental.

Al técnico José Espinoza por la ayuda en la realización del sistema experimental.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentaría por la ayuda brindada en la realización de las laminas histológicas

A la M. en C. Marisol Simón Díaz por su apoyo en la realización de este proyecto y por su sincera amistad.

A las secretarias del departamento de Acuicultura, Bibiana, Adriana y Cecilia por su amabilidad y apoyo, y en especial a Varuni por su amistad, consejos y escucharme cuando lo necesite, gracias!!!.

A la Dirección de Servicios Escolares: Dolores Sarracino, Ivonne Best, Norma A. Fuentes y Citlali Romero por el apoyo constante.

A mis compañeros de generación y a la banda ACUI por cada uno de los excelentes momentos que compartimos, mi familia durante la maestría (Luz, Brenda, Gloria, Mata, Chio).

A Jesús, Orlando, Fernando y Yosef por todos los buenos momentos que compartimos, porque hicieron más amena mi estancia en Ensenada y por brindarme su amistad y confianza.

A todas aquellas personas que de una o de otra forma llegaron a mi vida, ya sea por conocidos, por la biblioteca, por todos los buenos momentos que compartimos, gracias.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.	**i**
Resumen ingles.	**ii**
Dedicatorias.	**iii**
Agradecimientos.	**iv**
Contenido.	**vi**
Lista de Figuras.	**viii**
Lista de Tablas.	**xiv**
Capítulo I. INTRODUCCIÓN.	
I. 1. La pesquería de la Sardina en el Pacífico nororiental.	**1**
I. 2. Distribución geográfica.	**4**
I. 3. Biología.	**5**
I. 4. Estructura poblacional de la sardina en el Pacífico nororiental.	**6**
I. 5. El efecto de la temperatura en la fisiología de la sardina.	**9**
I. 6. El estrés y el Síndrome General de Adaptación.	**13**
Capítulo II. ANTECEDENTES.	**21**
Capítulo III. HIPOTESIS.	**27**
Capítulo IV. OBJETIVOS.	
III. 1. Objetivo General.	**28**
III. 2. Objetivos particulares.	**28**
Capítulo V. METODOLOGÍA.	**29**
V. 1. Medición del consumo de oxígeno.	**33**

CONTENIDO (continuación)

	Página
V. 1. 1. Consumo de oxígeno de rutina	33
V .1. 2. Acción Dinámica Específica (SDA).	35
V. 2. Cortisol.	36
V.2. 1. Muestreo de sangre y preparación del plasma.	36
V. 2. 2. Extracción de cortisol.	37
V. 2. 3. Análisis de cortisol.	37
V. 3. Histología	40
V.3. 1. Análisis histológico del páncreas e hígado.	40
V. 3. 2. Cuantificación del contenido calórico de los tejidos.	41
V. 3. 3. Análisis Estadístico.	43
Capítulo VI. RESULTADOS.	44
VI. 1. Sobrevivencia y crecimiento.	44
VI. 2. Consumo de Oxígeno.	47
VI. 3. Histología de hígado y riñón.	56
VI. 4. Análisis calórico del hígado y del músculo.	67
VI. 5. Cortisol.	72
Capítulo VII. DISCUSIÓN	74
Capítulo VIII. CONCLUSIONES.	84
Capítulo IX. RECOMENDACIONES.	86
Capítulo X. LITERATURA CITADA.	87

LISTA DE FIGURAS

Figura		**Página**
1	Distribución de las especies del género *Sardinops*: África del Sur (*ocellatus*) (rectángulo negro), Australia (*neopilchardus*) (rectángulo verde), Chile (*sagax*) (rectángulo anaranjado), California (*caeruleus*) (rectángulo azul) y Japón (*melanostictus*) (rectángulo café).	2
2	Intervalo de distribución de la sardina en el Pacífico nororiental. Las líneas horizontales muestran la zona ocupada cuando la población se encuentra en un nivel bajo de abundancia; el área punteada indica la distribución cuando la biomasa es alta.	4
3	Distribución de las tres sub-poblaciones de sardina en las diferentes épocas del año. Subpoblación fría (C), subpoblación templada (T) y subpoblación cálida (W).	8
4	Sistema de aclimatación para la sardina de la corriente de California Sardinops caeruleus. Entrada de aire (EA), entrada de agua (Ea), chiller (C), tanque de compensación (TC), motobomba (Mb), bomba de calor (BC) y tubo de nivel (TN).	32
5	Respirómetro intermitente para medir el consumo de oxígeno de la sardina de la corriente de California *Sardinops caeruleus*. Dispositivo electrónico para el control automatizado de la medición del consumo de oxígeno (Sm), electrodo de medición de oxígeno (E), tapa de acrílico de la cámara (Tac), salida de agua de lavado (Saa), entrada del electrodo del oxígeno (Eo), entrada de agua (Etb), tanque de compensación (Tc), motobomba (Mb), salida de agua (Sab), estanque para recambio de agua y control de temperatura (Tb), entrada de agua para lavado (Eta), cámara metabólica (Ta), manguera de recirculación de agua de la cámara metabólica (Mra), motobomba sumergible 1 (Mbs1) y motobomba sumergible dos (Mbs2).	34

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
6	Curva estándar para cuantificar la concentración de cortisol en el plasma de la sardina de la Corriente de California con la prueba de inmunoabsorbancia ELISA, (NEOGEN, 402710). Porcentaje de ligación (%B/B_0).	39
7	Longitud total (cm) de las sardinas aclimatadas a tres temperaturas y alimentadas con dos tamaños de partícula (<500 y 1000-1180 µm).	46
8	Peso (g) de las sardinas de la Corriente de California *Sardinops caeruleus*, aclimatadas a las tres temperaturas y alimentadas con dos tamaños de partícula (<500 y 1000-1180 µm).	47
9	Tasa de consumo de oxígeno VO_2 (mg O_2 kg^{-1} h^{-1}) para la sardina de la Corriente de California en una cámara respirométrica de 160 l siguiendo el método de respirometría intermitente. El consumo de oxígeno se midió en grupos de cinco sardinas. Cada ciclo corresponde a tres periodos, uno de lavado de la cámara, otro de espera y otro más de medición del consumo de oxígeno. MRd=metabolismo de rutina disurno; MRn=Metabolismo de rutina nocturno; SDAm= Acción dinámica específica por actividad mecánica; SDAb=acción dinámica específica por actividad bioquímica.	48
10	Tasas de consumo de oxígeno de rutina VO_2 (mg O_2 kg^{-1} h^{-1}) durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), durante la actividad relacionada con la captura de alimento (SDAm) y la acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta comercial particulada.	50

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
11	Tasas de consumo de oxígeno de rutina (media±desviación estándar) durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a 15 °C y alimentada con una dieta comercial particulada y pulverizada respectivamente	52
12	Tasas de consumo de oxígeno de rutina (media±desviación estándar) durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a 18 °C y alimentada con una dieta comercial particulada y pulverizada respectivamente.	53
13	Tasas de consumo de oxígeno de rutina (media±desviación estándar) durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a 23 °C y alimentada con una dieta comercial particulada y pulverizada respectivamente.	54
14	Tasas de consumo de oxígeno de rutina durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta comercial pulverizada.	55
15	Densidad de hepatocitos en cortes histológicos del hígado de la sardina de la Corriente de California aclimatada a tres temperaturas y alimentada con dos dietas de diferente tamaño de partícula. Un cuadrante corresponde a una superficie de 0.0276 mm^2.	57

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
16	Corte transversal del hígado de la sardina de la Corriente de California, Sardinops caeruleus, aclimatada a 15 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A) Sardinas alimentadas con la dieta pulverizada, 400x B) Sardinas alimentadas con la dieta particulada, 400x. Cordones hepáticos (CH), células sanguíneas (CS), sinusodes (S).	58
17	Corte transversal del hígado de la sardina de la Corriente de California, Sardinops caeruleus, aclimatada a 15 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A) Sardinas alimentadas con la dieta pulverizada, 1000x B) Sardinas alimentadas con la dieta particulada, 1000x. Cordones hepáticos (CH), células sanguíneas (CS), sinusodes (S).	59
18	Corte transversal del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 18 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A) Sardinas alimentadas con la dieta pulverizada, 400x B) Sardinas alimentadas con la dieta particulada, 400x. hepatocitos (H), células sanguíneas (CS), sinusodes (S).	60
19	Corte transversal del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 18 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A) Sardinas alimentadas con la dieta pulverizada, 1000x B) Sardinas alimentadas con la dieta particulada, 1000x. hepatocitos (H), células sanguíneas (CS), sinusodes (S).	61
20	Corte transversal de hígado de *Sardinops caeruleus,* aclimatada a 23 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A y B) Sardinas alimentadas con una dieta pulverizada y particulada respectivamente, 400x. Disminución de hepatocitos (H); células sanguíneas (CS); aumento del diámetro de los sinusoides (S)	62

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
21	Corte transversal de hígado de Sardinops caeruleus, aclimatada a 23 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A y B) Sardinas alimentadas con una dieta en polvo y particulada respectivamente, 1000x. Disminución de hepatocitos (H); células sanguíneas (CS); aumento del diámetro de los sinusoides (S).	63
22	Corte transversal de riñón de sardina de la Corriente de California *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 15 °C (condición normal del tejido), donde se observan las distintas organizaciones del riñón. A) centros melanomacrófagos (CM), túbulos renales (TR). Las observaciones se hicieron a 400x. B) cápsula de Bowman (CB), espacio intraglomerular normal (EI), glomérulo de Malpighi (GM), Tinción con hematoxilina-eosina. Las observaciones se hicieron a 1000x.	68
23	Corte transversal de riñón de la sardina de la Corriente de California *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 18 °C. A) Se observa el incremento en el espacio intralomerular. B) Túbulos renales, incremento en el número de centros melanomacrófagos. Glomérulo (GM), espacio intraglomerular (EI), cápsula de Bowman (CB), túbulo renal (TR), centros melanomacrófagos (CM). Tinción con hematoxilina-eosina. Las observaciones se hicieron a 400x.	69
24	Corte transversal de riñón de la sardina de la Corriente de California *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 23 °C. A) Corpúsculos renales donde se observa el aumento del espacio intraglomerular. Las observaciones se hicieron a 1000x. B) Túbulos renales, incremento del número de centros melanomacrófagos. Túbulos renales (TR), Glomérulo (GM), espacio intraglomerular (EI), cápsula de Bowman (CB), centros melanomacrófagos (CM). Tinción con hematoxilina-eosina. Las observaciones se hicieron a 400x.	70

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		**Página**
25	Concentraciones de cortisol en plasma de las sardinas de la Corriente de California *Sardinops caeruleus* aclimatadas a tres temperaturas y alimentadas con dos tamaños de partícula	73

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Descripción del alimento para trucha, Iniciación Alevin II, El Pedregal Silver Cup, utilizado para alimentar a las sardinas *Sardinops caeruleus.*	30
II	Concentraciones de cortisol de la curva estándar para la prueba de inmunoabsorbancia ELISA, NEOGEN®, #402710.	38
III	Protocolo de deshidratación e inclusión para los tejidos hepático y renal de la sardina del Pacífico, *Sardinops caeuruleus*.	41
IV	Porcentaje de sobrevivencia de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax*, aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta de dos tamaños de partícula (N_i= 15; N_T= 270).	45
V	Tasa de consumo de oxígeno VO_2 (mg O_2 kg^{-1} h^{-1}) de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, en diferentes estados metabólicos, aclimatada a tres temperaturas y alimentada con dos tamaños de partícula (<500 y 1000-1180µm). MRd=metabolismo de rutina disurno; Mrn=Metabolismo de rutina nocturno; SDAm= Acción dinámica específica por actividad mecánica; SDAb=acción dinámica específica por actividad bioquímica.	49
VI	Densidad de hepatocitos cuantificada en los cortes histológicos del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta de dos tamaños de partícula. La unidad de superficie analizada fue 0.0276 mm^2 (400x).	64

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
VII	Densidad de hepatocitos cuantificada en los cortes histológicos del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta de dos tamaños de partícula. La unidad de superficie analizada fue 0.0123 mm^2 (1000x).	65
VIII	Medidas del diámetro celular (µm) de los hepatocitos de la sardina *Sardinops caeruleus,* aclimatada a tres temperaturas y alimentadas con dos dietas de diferente tamaño de partícula.	65
IX	Medidas del diámetro nuclear (µm) de los hepatocitos de la sardina *Sardinops caeruleus,* aclimatada a tres temperaturas y alimentadas con dos dietas de diferente tamaño de partícula.	66
X	Clasificación de las alteraciones en el tejido renal de la Sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus* aclimatada a 15, 18 y 23 °C. Glomérulo (GM), Cápsula de Bowman (CB).	71
XI	Promedios del contenido calórico (cal/g) (media±desviación estándar) de hígado (H) y músculo blanco (MB) de sardinas, *Sardinops caeruleus*, aclimatadas a tres temperaturas y con dos tamaños de alimento.	71
XII	Concentraciones de cortisol en el plasma (media±desviación estándar) de las sardinas de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus,* aclimatadas a tres temperaturas y alimentadas con dos tamaños de partícula.	72

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

I.1 La pesquería de la Sardina en el Pacífico nororiental.

La sardina (genero *Sardinops*) es una especie pelágica de importancia ecológica y pesquera a nivel mundial, su contribución a las capturas en muchas áreas de los océanos es muy importante (Figura 1), particularmente en el límite oriental de las corrientes oceánicas, (Sistemas de corrientes de Benguela, California, Canarias y Humboldt), también en la Bahía de Vizcaya y en los mares de Australia y Japón (Lingen *et al*. 2006).

Whitehead (1985) considera que las diferencias publicadas entre las cinco especies de *Sardinops*, no son significativas, excepto tal vez en el caso de la sardina Australiana, por lo que prefiere reconocer cinco subespecies de *Sardinops sagax*. Estudios de electroforesis de proteínas no mostraron diferencias genéticas entre *S. caeruleus, S. neopilchardus, S. melanostictus* y *S. ocellatus* (Svetovidov, 1952). En este sentido, es posible que las grandes barreras geográficas que separan a las diferentes especies, impidan el intercambio de material genético.

Los fuertes cambios de distribución geográfica y abundancia de los peces pelágicos menores como las sardinas, anchovetas, macarelas y arenques, entre otros, han marcado la pauta en el desarrollo de sus pesquerías. En México las principales especies son la sardina del Pacífico (*Sardinops caeruleus*), sardina crinuda o arenque de hebra (*Opisthonema libertate*), macarela (*Scomber*

japonicus), sardina japonesa (*Etrumeus teres*), anchoveta norteña (*Engraulis mordax*), sardina bocona (*Cetengraulis mysticetus*) y sardina piña (*Oligoplites refulgens*) (INAPESCA, 2001).

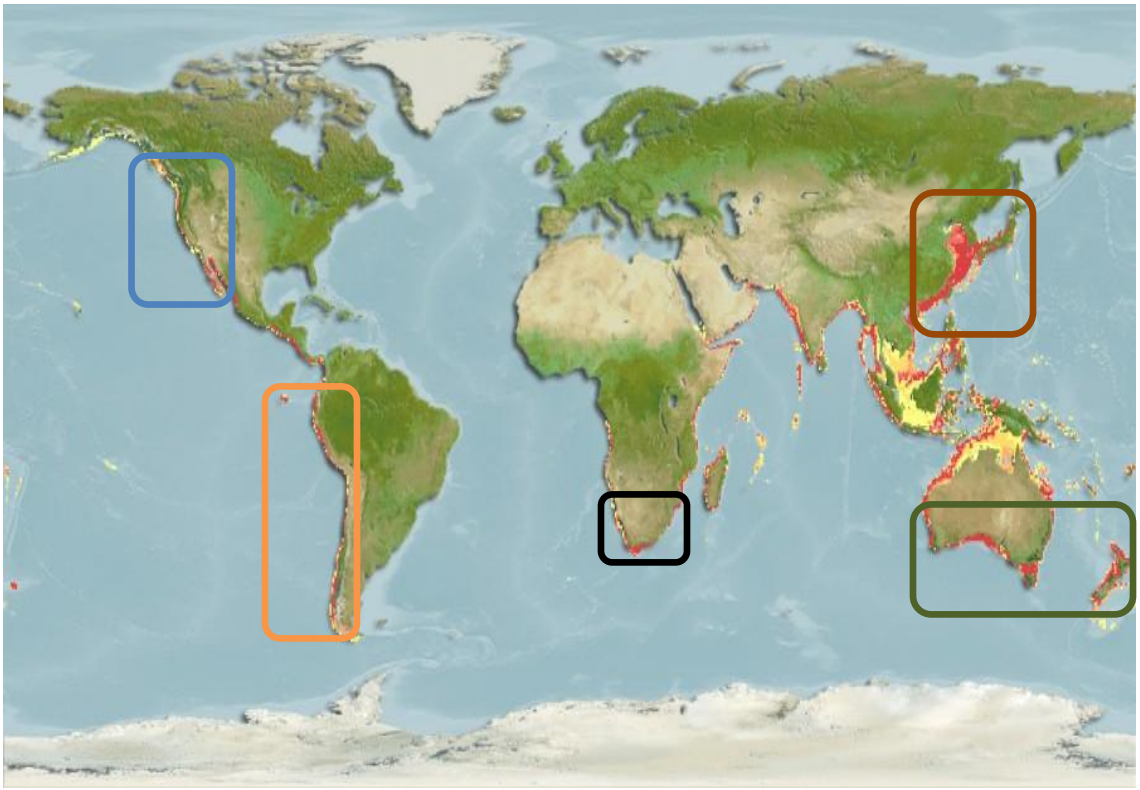


Figura 1. Distribución de las especies del género *Sardinops*: África del Sur (*ocellatus*) (rectángulo negro), Australia (*neopilchardus*) (rectángulo verde), Chile (*sagax*) (rectángulo anaranjado), California (*caeruleus*) (rectángulo azul) y Japón (*melanostictus*) (rectángulo café). (http://www.fishbase.org, versión 11/2010).

A principios del siglo XX se detectó un incremento en la biomasa de las poblaciones de sardina en la costa noroccidental de México y al oeste de los Estados Unidos. Esto propició el desarrollo de la importante pesquería de sardina en California, con capturas cercanas a las 100,000 t en la década de los años veinte. En Ensenada, B. C., la proporción por pesca se centra en cuatro especies:

sardina del Pacífico (80%), macarela (11%), anchoveta norteña (8%) y charrito (*Trachurus symmetricus)* (1%) (García y Sánchez, 1997). La captura de sardina inició en 1929 y se extendió a Isla Cedros en los años cuarenta y a la Bahía Magdalena en los cincuenta (Cisneros-Mata *et al*., 1995). En 1950 comenzó la pesca de anchoveta, dado el bajo nivel de captura de sardina en California (Chávez *et al*., 1979). En las costas de California (EEUU) y Baja California (México), la biomasa de sardina se incrementó en los años ochenta (Wolf, 1992). En 1992 se encontraron sardinas de hasta siete años de edad en las costas de Canadá (Hargreaves *et al*., 1994), lo cual indicó que la población de *Sardinops caeruleus* se estaba recuperando.

En las costas de California, las capturas recientes de la sardina del Pacífico tuvieron variaciones moderadas entre 1995 y 2003, con un promedio de 46,233 t (Smith *et al*, 2005). Las capturas recientes de sardina en Ensenada, B.C., ascienden a 600,000 t y en la Bahía Magdalena se han capturado hasta 47,500 t en el 2002 (INAPESCA, 2006).

México se encuentra entre los 20 primeros países del mundo por el volumen de su producción pesquera (1.5% de las capturas mundiales), lo que representa una fuente importante de divisas para el país (SAGARPA, 2001). A nivel nacional, las pesquerías de pelágicos menores aportan alrededor de un 40% de las capturas totales, de las cuales, la mayor parte provienen del noroeste de México, principalmente del Golfo de California (Lluch-Belda *et al*., 1986).

La población norte de la sardina de la Corriente de California inició una recuperación prolongada desde su casi extinción en la década de los años 70 y actualmente soporta una pesquería de más de 100.000 toneladas. También se han recolonizado la parte norte de Oregón y la isla de Vancouver, donde había estado comercialmente extinta por más de 50 años (Hargreaves *et al*. 1994).

I. 2. Distribución geográfica

La sardina del Pacífico habita desde Alaska hasta el Golfo de California y durante la estación fría del año su distribución se extiende hasta Mazatlán, Sinaloa (Hammann y Cisneros-Mata, 1989; Lluch-Belda *et al*., 1995). Lluch-Belda (1986) ha propuesto que la sardina, tiene dos centros de distribución en las costas de México: en el Golfo de California, alrededor de las grandes islas; y al oeste de la península de Baja California, en Punta Eugenia. Su distribución geográfica depende en gran medida del tamaño de la población y de su comportamiento migratorio (Figura 2), lo que determinó un patrón de cambios extremos e inesperados en la década de los años 90 (DFO, 2004).

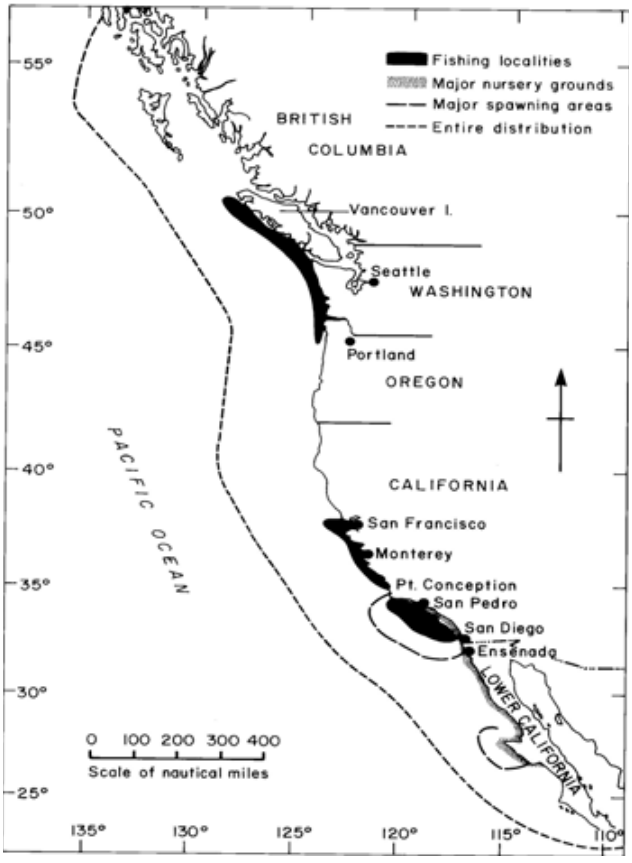


Figura 2. Distribución de la sardina del Pacífico, donde se indican sus principales áreas de desove, de crianza y de pesca (Tomado de DFO, 2004)

I. 3. Biología

Las sardinas son pequeños peces plateados que alcanzan un tamaño de hasta 38 cm de longitud, algunas de sus características morfológicas son tener una sola aleta dorsal que se localiza sobre el centro del cuerpo, una aleta caudal bifurcada, una quilla de largas escamas espinosas en el vientre y manchas esparcidas en los costados (Schweigert, 2002). Las sardinas se alimentan de zooplancton y fitoplancton, y capturan en forma selectiva presas más grandes (COSEWIC, 2002). Su tiempo de vida bajo condiciones normales es de 12 a 13 años, pero algunas viven de 20 a 25 años. Se pueden reproducir desde el primer año de edad, desovan durante el invierno y en menor grado durante la primavera. En el área de Ensenada, B.C., los desoves se registran de enero a marzo y en junio-julio (Lluch-Belda *et al*., 1995), cuando la temperatura del agua es de 14 a 16˚C. Los huevos son pelágicos (Arenas, 1996) y las larvas se encuentran en mayor abundancia cuando la temperatura del agua es de 13 a 16˚ C (Lluch-Belda *et al*. 1991; Lo *et al*. 1994).

Las sardinas habitan en ambientes costeros, son pelágicas y viajan en cardúmenes de hasta cientos de miles de millones de individuos. El gran número de peces en los cardúmenes y sus movimientos rápidos y coordinados, son una adaptación contra los depredadores. Tienen hábitos migratorios y pueden viajar distancias de más de 1000 km en el transcurso de un año entre sus áreas de alimentación y de desove (Hart, 1973).

En el estudio de la relación entre el crecimiento individual y la abundancia de la población de la sardina del Pacífico *S. caeruleus* en Isla de Cedros, Baja California, México, se pudo observar que la sardina del Pacífico de la generación de 1980 mostró un mayor crecimiento durante los primeros seis meses, en comparación con las generaciones posteriores, esto sugiere que las diferencias en el crecimiento durante su primer año de vida puede ser producto del tamaño de la

población, debido a que el consumo de alimento por individuo es menor cuando la población es muy grande, comparativamente, cuando la población es pequeña la cantidad de alimento disponible para cada individuo es mayor. Una explicación alternativa para este patrón de crecimiento podría encontrarse en el régimen anual de la temperatura superficial del mar (TSM), régimen que está relacionado con la presencia del fenómeno El Niño. Durante el periodo 1982-83 esta región estuvo afectada por este fenómeno oceanográfico, lo que ocasionó un incremento en la temperatura La sardina del Pacífico en la costa occidental de Baja California presenta desplazamientos estacionales asociados a la TSM. Los desplazamientos son más intensos (distancia y duración) cuando se presentan condiciones anómalas, como las asociadas al evento El Niño. Este comportamiento pudo haber permitido a las sardinas evadir las condiciones de menor productividad durante 1983 desplazándose hacia el norte (Quiñónez-Velázquez *et al,* 2002).

I. 4. Estructura poblacional de la sardina en el Pacífico nororiental

Estudios recientes sugieren tres poblaciones de la sardina del Pacífico a lo largo de la costa oeste de América del Norte: en el Golfo de California; en el Pacífico frente a la península de Baja California; y en el norte, desde las costas de Baja California hasta Alaska. Smith (2005) argumentó que es importante conocer la distribución y movimiento migratorio de la sardina para establecer principios de manejo de la pesquería, para reducir el riesgo de sobrepesca y evitar un desastre ecológico. (Murphy, 1966, Smith, 2005).

Félix-Uraga *et al*. (1996) describieron los movimientos migratorios de la sardina del Pacífico a lo largo de la costa occidental de Baja California y propusieron la existencia de tres grupos en esta región, además señalaron que en Bahía Magdalena están presentes dos grupos de sardina, una en invierno y otra en verano. A partir del análisis de las capturas registradas durante el periodo de

1981-2002 en Bahía Magdalena, Isla Cedros, Ensenada, México y en San Pedro, USA, Félix-Uraga *et al*. (2004), confirmaron la existencia de los tres grupos de sardinas, divididos por barreras térmicas. El grupo de aguas cálidas, adaptado a temperaturas que oscilan entre 22-27 °C, se captura en Bahía Magdalena, de julio a diciembre. El grupo de aguas frías se distribuye en temperaturas de 13 a 17 °C entre San Pedro y Ensenada, en primavera y verano; en tanto que el grupo de aguas templadas, con temperaturas de 17 a 22 °C se mueve a lo largo de la costa occidental de Baja California y al sur de California durante el año. Con estos resultados, Félix-Uraga *et al*. (2004), propusieron un modelo de distribución y migración con respecto a las diferentes estaciones del año (Figura 3). El movimiento hacia el sur de los tres grupos se inicia en el invierno, con la intensificación del flujo de la corriente de California, en la primavera, todos los grupos alcanzan su distribución austral. En el verano, el movimiento grupal hacia el norte comienza con el surgimiento del flujo de la contracorriente ecuatorial. En otoño, todos los grupos alcanzan su distribución boreal.

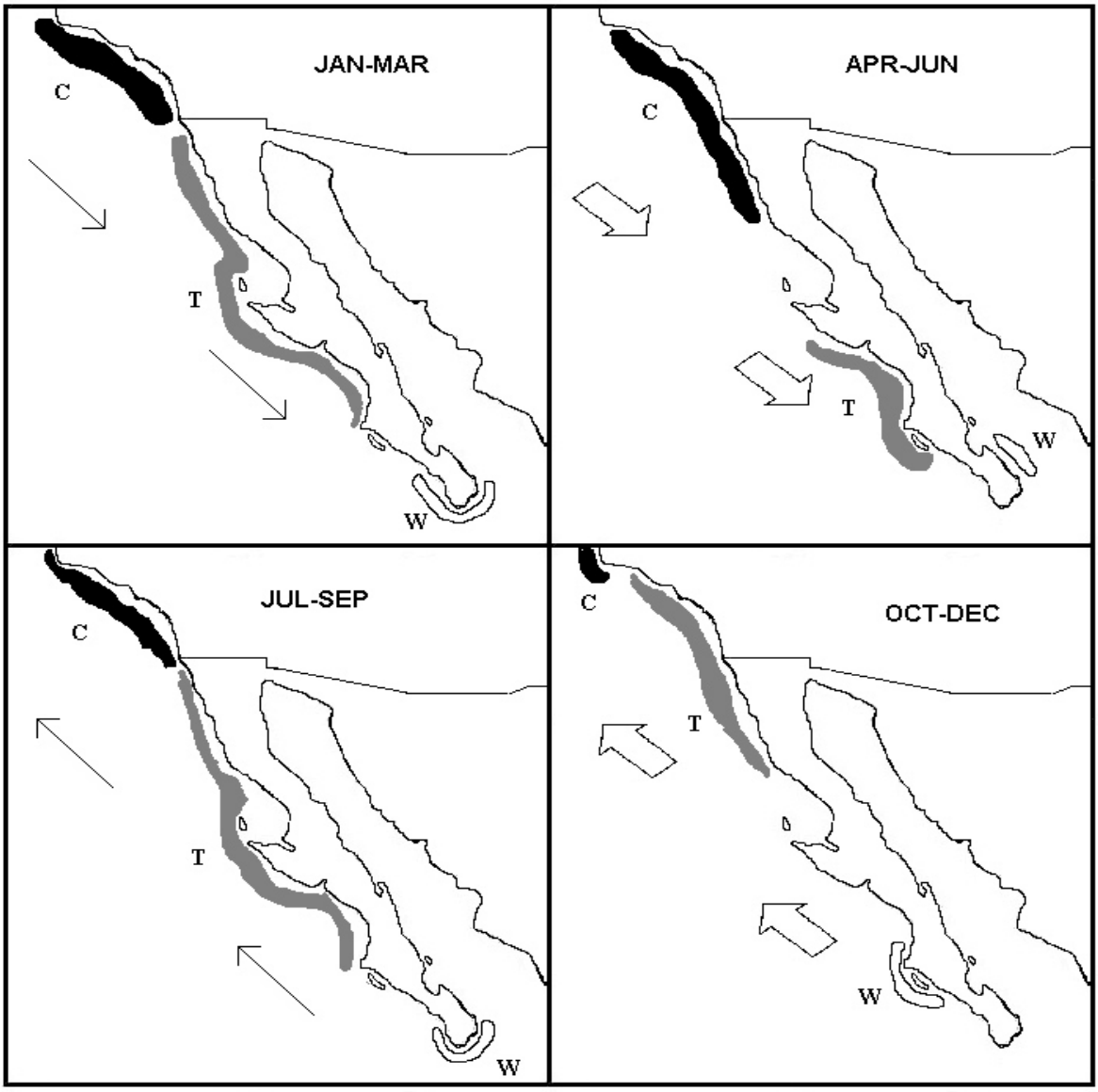


Figura 3. Distribución de las tres sub-poblaciones de sardina en las diferentes épocas del año. Subpoblación fría (C), subpoblación templada (T) y subpoblación cálida (W) (Tomado de Félix-Uraga *et al*., 2004).

I. 5. El efecto de la temperatura en la fisiología de la sardina

La temperatura ambiental afecta la fisiología de los organismos marinos en sus diferentes niveles de organización, desde procesos bioquímicos como los relacionados con el metabolismo, hasta procesos que requieren de un alto nivel de organización como la conducta, es en este sentido que la distribución geográfica de la sardina está íntimamente asociada con el gradiente de temperatura latitudinal (Levinton, 1982).

La tolerancia al cambio de temperatura de las sardinas adultas es amplia. Parrish et al. (1989), estimaron que el intervalo de tolerancia es de 7 a 28 °C (DFO, 2004). En el Pacífico, frente a las costas de Baja California, una combinación de alta temperatura y escasez de alimento durante el verano pueden promover una migración anual de las poblaciones de sardinas adultas hacia el norte, donde pueden encontrar condiciones de temperatura y alimentación favorables (COSEWIC, 2002). La medición de los requerimientos alimenticio de la sardina pueden servir de base para estimar el impacto de la expansión de la población cuando se relaciona con la productividad del zooplancton y los competidores tróficos, como sucede con la anchoveta norteña *Engraulis mordax* (Lasker, 1970; MacCall, 1979). Lasker (1970) estimó los requerimientos anuales de alimento de la sardina del Pacífico a partir de mediciones metabólicas, pero sus cálculos resultaron ser tres veces más grandes que la producción probable de zooplancton en la región. Es posible que esta sobreestimación del consumo de alimento de la población se debiera también a una sobreestimación del metabolismo de la sardina, ya que la tasa metabólica derivada de las mediciones del consumo de oxígeno de un solo pez, introducido en una pequeña cámara respirométrica, puede ser elevado si los peces se estresan por el aislamiento o la manipulación (Brett, 1973; Boggs and Kitchell, 1991). En este sentido, la ausencia del estímulo relacionado con la conducta gregaria propia de los grandes cardúmenes podría alterar las tasas metabólicas (Lasker, 1970).

Los ambientes acuáticos exhiben enormes variaciones en la temperatura, salinidad, acidez y en la presencia de sustancias tóxicas, que pueden ser tanto de origen natural como artificial (Nitritos, sulfuro de hidrógeno, aluminio) y que pueden influir en la fisiología de los peces (Cliff y Jensen, 1993).

Debido a la función del oxígeno en los procesos aeróbicos de producción celular de energía, éste se ha utilizado como estimador del metabolismo. Se emplean diferentes métodos para medir el consumo de oxígeno, cerrados, abiertos e intermitentes (Steffensen, 1989). Para cuantificar el consumo de oxígeno con el método de respirometría cerrado, los peces se colocan en una cámara que se puede cerrar en forma hermética, se mide la concentración de oxígeno en dos momentos consecutivos y la diferencia en la concentración se relaciona con el volumen de agua, con la masa del organismo y se expresa en mg o ml de oxígeno consumido por unidad de tiempo (Beamish y Trippel 1990). Con el método de respirometría abierto, los organismos se colocan en la cámara con una tasa de flujo de agua conocido, se mide la concentración de O_2 en la entrada y la salida de la cámara, la diferencia en la concentración se relaciona con el volumen de agua que fluye por la cámara por unidad de tiempo y con la masa del organismo (Grodzinski *et al*, 1975; Steffensen, 1989). Un sistema intermitente consiste en una combinación de los dos métodos anteriores en dos etapas consecutivas que se repiten de manera cíclica, de tal forma que se pueden efectuar un número indeterminado de mediciones. Durante la primera etapa de cada ciclo la cámara permanece cerrada por un periodo preestablecido (método cerrado, una disminución mínima de la concentración asegura una condición normóxica), en la segunda etapa del ciclo, la cámara se abre y se restituye la concentración inicial de oxígeno, este proceso se repite tantas veces como sea necesario (Steffensen, 1989).

Los costes metabólicos se pueden evaluar considerando las diferentes estrategias de alimentación y los niveles de actividad. En este sentido, Beamish en 1984,

describió tres tipos de nado: a) *sostenido*, para velocidades que se mantienen por periodos prolongados de hasta 200 min, sin resultar en fatiga muscular, la energía es movilizada a través de procesos aeróbicos; b) *prolongado*, de más corta duración que el sostenido (15 s hasta 200 min), depende en mayor o menor medida de procesos anaeróbicos o aeróbicos y termina en fatiga; y c) *explosivo*, son las velocidades más altas que los peces pueden soportar y solo lo pueden hacer por periodos cortos de 15 a 20 s. En la sardina, la forma y la velocidad del nado están relacionadas con el tipo y tamaño de alimento, y es afectada por la temperatura y por la distribución y abundancia del alimento (Lingen, 1994). La velocidad de nado de la sardina también es afectada por la presencia de depredadores.

Dependiendo del tipo de nado, el consumo de oxígeno también variará, siendo el más costoso energéticamente el que se relaciona con la alimentación y el escape de los depredadores. Brett y Groves (1979) distinguieron tres tipos de metabolismo: a) *estándar*, en el cual se hace el mínimo gasto de energía para mantener las funciones vitales del organismo, este estado metabólico se mide en condiciones de reposo (sin ningún efecto farmacológico de anestésicos), en un organismo adulto, en condiciones normóxicas y normotérmicas y en estado postprandial; b) *rutina*, en el cual los peces se encuentran en un estado relajado, en el que nadan espontáneamente sin presión, es decir, en ausencia de depredadores y sin alimentación; y c) *activo*, producto de diferentes niveles de actividad, relacionados con la captura de alimento, durante los procesos migratorios o para escapar de sus depredadores. La actividad del nado explosivo incrementa el consumo de oxígeno de 2 a 3 veces en relación con la tasa de rutina o la activa registrada a velocidad de crucero (Lasker, 1970).

La sardina del Pacífico no tiene una verdadera tasa de consumo de oxígeno estándar, debido a que la sardina mantiene su aleta caudal en constante movimiento y raramente descansa, en contraste con otros clupeidos, por ejemplo

la anchoveta, la cual pasa mucho tiempo deslizándose en la corriente, después de haberse desplazado con la aleta caudal (Lasker, 1970).

Del gasto total de la energía asociada con la alimentación, una fracción se dedica a la transformación bioquímica de los nutrientes absorbidos, la mayor inversión de esta aparente pérdida exotérmica viene de la desaminación de las proteínas, sobre todo en el hígado. La magnitud del incremento del calor generado es afectada por la calidad nutricional de los alimentos y se incrementa en relación directa con el contenido de proteínas (Brett y Groves, 1979). Al incremento en la tasa metabólica, como resultado de los procesos digestivos, de la desaminación de las proteínas de la dieta, de la absorción, transporte y depósito de los nutrientes se le conoce como acción dinámica específica aparente o SDA por sus siglas en Inglés (Beamish, 1974). Una forma de cuantificar la SDA es midiendo el consumo de oxígeno en condiciones de ayuno y comparándolo con el consumo de oxígeno registrado durante y después de la ingestión de alimento.

Logerwell (2001), evaluó la tasa metabólica de la sardina del Pacífico a partir de la perdida de energía durante el ayuno, a una temperatura de 17.5 ˚C y a una velocidad de nado de rutina de 0.5 longitudes del cuerpo/s en 0.09±0.024 ml $O_2 \cdot g^{-1} h^{-1}$. En otros clupeidos, como la sardina de la corriente de Benguela, la tasa fue de 0.128 ml $O_2 \cdot g^{-1} h^{-1}$ a una velocidad de nado de 0.8 veces la longitud del cuerpo/s y a 16 ˚C (Lingen, 1995). La tasa para la sardina del Pacífico fue de 0.24±0.133 ml $O_2 \cdot g^{-1} h^{-1}$, a una velocidad de 1-2 veces la longitud de cuerpo/s y a una temperatura de 16.5-22 ˚C (Lasker, 1970). Estas tasas ilustran el efecto de la velocidad de nado sobre la tasa metabólica bajo condiciones de temperatura similares para dos sardinas de dos sistemas de corrientes marinas similares.

I. 6. El estrés y el Síndrome General de Adaptación

Es importante conocer el efecto de la temperatura sobre la sardina, no sólo en términos del comportamiento térmico, sino también por sus efectos fisiológicos. Los efectos agudos y crónicos de la temperatura se pueden evaluar por medio de diversas respuestas, incluyendo los parámetros sanguíneos, ya que algunas alteraciones bioquímicas en distintos órganos y tejidos se reflejan en la composición hormonal, enzimática, iónica y de otros compuestos constituyentes de la sangre (Mártinez-Porchas *et al*. 2009).

A los factores químicos y físicos que modifican el estado homeostático del organismo y que contribuyen con la enfermedad o muerte del individuo se les conoce como estresores. A los cambios que se producen como respuesta a los estresores ambientales se les conoce como el Síndrome de Adaptación General (GAS, en inglés). El GAS tiene distintas etapas según la duración del estímulo estresor: *a) Reacción de alarma inicial:* la primera reacción del animal, es intentar huir o enfrentar el peligro, lo cual activa un amplio espectro de funciones fisiológicas: *1.* Activación motora, ritmo cardiaco, flujo sanguíneo hacia los órganos más activos: cerebro corazón y músculos esqueléticos. *2.* Flujo sanguíneo hacia las branquias y estímulo de la captación de oxígeno. *3.* Aumento de la tasa metabólica basal e intermedia; *b) Fase de resistencia:* si continúa el estrés, el animal trata de adaptarse a la nueva situación y los niveles de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) volverían a valores normales y se libera el cortisol.; y *c) Fase de agotamiento*, se mantiene la situación de estrés y los niveles de cortisol durante un largo período y la activación del metabolismo interfiere con los demás procesos fisiológicos y pueden llegar a ser letales para el animal (Barandica y Tort, 2008), hasta ocasionarle la muerte o en casos menos severos puede afectar el crecimiento, predisponerlo a enfermedades o imposibilitar su resistencia a nuevas condiciones de estrés (Flores, 2002).

Los factores estresantes son detectados por los órganos sensoriales externos o internos del organismo, que a su vez transmiten la información al hipotálamo, el centro integrador del cerebro (Jobling, 1994). Este proceso de integración es una respuesta no específica del organismo a cualquier demanda (Mártinez-Porchas *et al*., 2010). El rápido cambio en la fisiología del organismo es la respuesta primaria al estrés y sirve para aumentar la capacidad de reacción de un individuo ante situaciones críticas, para preparar “la huída de o la lucha con” otros organismos. Por medio de estos cambios, se estimula la vía neural eferente, la cual corre en el sistema nervioso simpático desde el hipotálamo hasta el tejido cromafín en la porción anterior del riñón de los peces (pronefros), esta estimulación directa conduce a la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Los niveles de catecolaminas en el plasma se pueden incrementar por más de un orden de magnitud en unos pocos minutos y este estado puede permanecer por varias horas. Su liberación en el torrente sanguíneo, las conduce por todo el cuerpo, con lo cual se inician una serie de reacciones secundarias en diferentes órganos y sistemas, como el sistema cardiovascular, alterando la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre y su flujo a través de las branquias e incrementando la permeabilidad del epitelio branquial (Jobling, 1994).

Si la exposición a los factores estresores continúa, los niveles de ACTH en el plasma pueden elevarse en pocos minutos seguido por un incremento en la concentración de cortisol en la sangre (Jobling, 1994). El factor liberador de corticotropina (CRF por sus siglas en inglés) se transporta del hipotálamo a la pituitaria y estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropica (ACTH). Los corticotropos son una capa de células en la interfase entre la adenohipófisis y la neurohipófisis en la glándula pituitaria. La ACTH se libera en la sangre y viaja hasta las células interrenales, donde estimula la producción y liberación de las hormonas corticoesteroides (mineralcorticoides MCs como la aldosterona y glucocorticoides GCs como el cortisol). Los corticosteroides son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis y los eventos relacionados con el estrés y en la

regulación de diferentes funciones fisiológicas (a través de dos clases de receptores de corticoesteroides, CR y GR, en inglés), como el mecanismo de transporte de iones en las branquias y el riñón, la regulación del balance hidromineral, el metabolismo de carbohidratos y proteínas (Barandica y Tort, 2008).

En la mayoría de las especies de peces teleósteos, el cortisol es la principal hormona corticoesteroide, aunque otros corticoesteroides como corticosterona, 11-deoxycoticosterona y 11-deoxycortisol, también se producen en el tejido interrenal. La liberación del cortisol es controlada por un sistema de retroalimentación, altos niveles de cortisol en la circulación tienen un efecto negativo en la producción y liberación de ACTH por la pituitaria. El cortisol también puede tener una acción de retroalimentación sobre el hipotálamo, y así influir en la liberación del neuropéptido CRF y por lo tanto en la producción de cortisol (Jobling, 1994). Los neuropeptidos son pequeñas secuencias de aminoácidos cuya función está indirecta o directamente regulada por la actividad sináptica. Además, pueden funcionar como neurotransmisores (Li y Kim, 2008).

En la respuesta de estrés secundario se generan cambios metabólicos, entre los que se encuentran la hiperglucemia, hiperlacticemia, disminución de las reservas de glucógeno en el tejido, lipólisis e inhibición de la síntesis de proteínas. Esto puede deberse a un aumento en el catabolismo de la proteína muscular y a alteraciones en los niveles plasmáticos de aminoácidos, ácidos grasos libres y colesterol. Las catecolaminas causan un aumento inicial en los niveles de glucosa en el plasma, mediante la movilización de las reservas de glucógeno del hígado (glicogenólisis), mientras que los corticoesteroides pueden contribuir al mantenimiento de la hiperglicemia mediante la estimulación de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos. Además de mantener la hiperglucemia, el aumento de la síntesis de glucosa a partir de los aminoácidos podría, a largo plazo, conducir también a la restauración de los niveles de glucógeno del hígado (Jobling, 1994).

Las respuestas secundarias al estrés han evolucionado como mecanismos adaptativos que permiten al organismo satisfacer el aumento en las demandas de energía impuesta por la exposición a estresores ambientales. Los cambios bioquímicos y fisiológicos persisten por unas horas o días, después de la exposición aguda a factores de estrés, por lo tanto no causa un efecto grave para el animal. En contraste, la exposición crónica a factores de estrés puede inducir un número de cambios patológicos y puede afectar negativamente el éxito reproductivo, disminuir las tasas de crecimiento y la resistencia a las enfermedades. Estos efectos se conocen como respuesta terciaria al estrés (Jobling, 1994).

La exposición crónica de los peces a diferentes factores de estrés ambiental puede causar hipertrófia en el tejido interrenal (Silva y Martínez, 2006) y el incremento en la susceptibilidad a una amplia gama de patógenos, como virus, bacterias, hongos y protozoarios. Este aumento en la susceptibilidad de los organismos a las enfermedades puede ser simulado por la administración de dosis fisiológicas de corticoesteroides en los peces. La estrecha asociación entre los niveles circulantes de corticoesteroides y la susceptibilidad a enfermedades parece estar mediada a través de los efectos del cortisol sobre el sistema inmune, los altos niveles plasmáticos de cortisol (10-15 $ngml^{-1}$ en diferentes especies de salmónidos) por periodos prolongados se traducen en la inmunosupresión en diferentes especies de peces (Jobling, 1994).

En los tejidos como la piel, el hígado, las branquias, el riñón y el esqueleto de los peces, se han podido caracterizar las respuestas histopatológicas ocasionadas por los agentes estresores. La piel es un órgano expuesto muy susceptible y su respuesta más característica es la producción y secreción de mucus (Hernández, 2006).

La exposición a estresores subletales puede inducir cambios histológicos en diferentes órganos y tejidos, por lo que su estudio puede ser un método rápido para detectar los efectos de los estresores, específicamente los crónicos. En los teleósteos, el riñón, junto con las branquias y el intestino, son responsables de la excreción y el mantenimiento de la homeostasis de los fluidos del cuerpo (Silva y Martínez, 2006).

Las lesiones desarrolladas en el riñón pueden generar necrosis del tejido hematopoyético o desplazamiento del riñón por proliferación de lesiones como neoplasmas o formación de granulomas (Hernández, 2006). El riñón se compone de tres tejidos: hematopoyético, que es el formador de sangre en teleósteos, endocrino y el excretor, que está compuesto de nefronas que se encarga de la filtración del plasma, pueden poseer glomérulo (a excepción de los peces aglomerulares y túbulos (a excepción de las lampreas) (Eckert, 1998). En la sección anterior del riñón, que se deriva del pronefros, se encuentra el tejido endocrino, que está compuesto por el tejido cromafin (productor de catecolaminas) e interrenal (productor de corticosteroides, v.g. cortisol), por lo que es fundamental en la respuesta de estrés (Silva y Martínez, 2006).

Una de las principales funciones del hígado es la síntesis de lípidos y carbohidratos y además está involucrado en las respuestas de defensa contra sustancias tóxicas, ya que ahí se metabolizan las toxinas que ingresan al cuerpo. Las alteraciones en la estructura del hígado pueden ser indicadores que revelan la exposición del organismo a estresores ambientales, reflejados en el núcleo y en el citoplasma de los hepatocitos (Hernández, 2006).

El hígado en los peces teleósteos tiene más de dos lóbulos hepáticos y dos conductos que comunican con el conducto cístico que a su vez termina en la vesícula biliar (Lagler *et al*., 1984). Este órgano está vascularizado por la vena porta y la arteria hepática, que ingresan al hígado y se ramifican en pequeños

vasos o sinusoides donde se realiza el intercambio de sustancias entre la sangre y los hepatocitos. Los hepatocitos están arreglados en forma de túbulos o cordones y tienen un núcleo con cantidades variables de heterocromatina en la periferia o dispersa y un nucléolo prominente, que constituyen el 80 % de las células del hígado y llevan a cabo muchas de sus funciones (Hernández, 2006).

En el hígado, el riñón y el bazo de los peces se encuentran los centros melanomacrófagos (CMMs), que son agregados de macrófagos. Se pueden desarrollar en asociación con lesiones inflamatorias crónicas en otras partes del cuerpo, como en los ovarios (atresia ovárica). Usualmente contienen tres tipos de pigmentos, melanina (se encuentra con frecuencia), pigmentos lipogénicos, como lipofuscina (es la más abundante) y los ceroides, y la hemosiderina (se puede encontrar en cantidades considerables bajo ciertas condiciones como la anemia hemolítica) (Agius y Roberts, 2003).

Muchos estudios sugieren que la función general de estos centros es la destrucción, desintoxicación o reciclaje de material endógeno y exógeno. Estos CMMs están unidos y aumentan su volumen en peces de edades mayores o en estado de caquexia, después de la fagocitosis de restos celulares, gránulos de haemosiderina y residuos de lipofuscina, así como gotas de lípidos, agregados de proteínas básicas y mucopolisacárido neutral. El estrés puede inducir cambios celulares en los tejidos de los peces, los principales efectos incluyen aumento de los macrófagos y una mayor degradación de los glóbulos rojos (Agius y Roberts, 2003).

El origen y naturaleza de estos pigmentos es diferente, es probable que su función varíe también. La melanina se produce en los melanocitos, que son melanóforos inmaduros. Los melanomacrófagos no pueden sintetizar melanina. Agius y Agbede (2003) sugieren que los gránulos de melanina entre los centros macrófagos derivan de la fagocitosis de los melanosomas que normalmente ocurre en las

células que contienen melanina. Las melaninas son complejos de polímeros que pueden absorber y neutralizar radicales libres, cationes y otros agentes potencialmente tóxicos, derivados de la degradación del material celular fagocitado. La lipofuscina o ceroide, resulta de la polimerización oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados. Estos pigmentos se pueden acumular en peces como resultado de las deficiencias en la dieta. Los peces con alto contenido de ácidos grasos insaturados y bajos niveles de vitamina E en el tejido, son propensos a la formación de lipofuscina y su deposición también se observa en peces con una amplia variedad de condiciones patológicas incluyendo deficiencias nutricionales, enfermedades bacterianas virales y trastornos causados por la exposición a agentes tóxicos. La hemosiderina es un pigmento café, granular, relativamente insoluble, compuesto de hierro férrico y una proteína y se deriva del catabolismo de la hemoglobina de los eritrocitos y por lo tanto de un producto intermedio metabólico que se produce durante el reciclado de componentes para la eritropoyesis. Hay dos posibles mecanismos por los cuales aumenta el contenido de la hemosiderina férrica: i) aumento del catabolismo de los eritrocitos dañados y ii) aumento en la retención del hierro en los CMMs como mecanismo de protección. Algunas de las funciones de estos centros son el almacenamiento de fosfolípidos derivados de membranas celulares y del hierro resultante de la eritrofagocitosis, la deposición de patógenos resistentes, como las esporas bacterianas y parasitarias y el procesamiento de antígenos en la respuesta inmune (Agius y Roberts, 2003).

Los animales adquieren una variedad y cantidad adecuada de sustancias nutritivas con la captura, ingestión y digestión del alimento. Los nutrientes son sustancias que sirven como fuentes de energía para el metabolismo, en el crecimiento, reparación de tejidos y producción de gametos. También se incluyen entre los nutrientes los elementos traza esencial como es el zinc, yodo y otros metales. Las necesidades nutricionales varían de acuerdo a la especie, a las diferencias fenotípicas como la talla, la actividad, la edad, el sexo y al estado

reproductivo. El balance nutricional se genera cuando el animal adquiere del alimento todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y para el mantenimiento de las funciones metabólicas. Los requerimientos nutricionales incluyen 1) una fuente de energía suficiente para llevar a cabo todos los procesos del cuerpo, 2) proteínas y aminoácidos para mantener un balance de nitrógeno positivo, 3) agua y minerales para compensar su pérdida o su incorporación a los tejidos del cuerpo, y 4) aminoácidos, lípidos y vitaminas esenciales (que no se sintetizan en el cuerpo) (Eckert, 1998).

Capítulo II

ANTECEDENTES

En la sardina, la forma y velocidad del nado tienen una relación con el tipo y tamaño de alimento, asociado al efecto la temperatura, que también repercute en la distribución de las especies de las cuales se alimenta la sardina. Es posible comparar los costes metabólicos asociados a las diferentes estrategias de alimentación. Dependiendo del tipo de nado, el consumo de oxígeno variará, siendo el más costoso energéticamente el que se relaciona con la alimentación y el escape de depredadores.

Lingen (1994) evaluó el efecto del tamaño y la concentración de las partículas de alimento en la conducta de alimentación de sardinas adultas *Sardinops sagax* de la corriente de Benguela. Este autor observó que la forma de alimentación, ya sea por filtración o por captura (bite en inglés), depende de la concentración y del tamaño de la partícula, asociado con el coste energético de cada modo de alimentación. En sus experimentos, Lingen suministró tres clases de tamaño de zooplancton de: grande (>900 µm; 1545±311 µm), mediano (>500 µm; 1152±252 µm) y chico (>200 µm; 873±143 µm) en diferentes concentraciones y observó que cuando los peces son grandes y las presas son pequeñas y están presentes en altas concentraciones y la intensidad de la luz es baja, el modo de alimentación es por filtración. Cuando el pez es pequeño y las presas son grandes pero se presentan en bajas concentraciones y hay suficiente luz, el modo de alimentación es por captura de partículas.

Debido a la importancia de la temperatura en la conducta y el metabolismo de la sardina, Lingen (1995) midió la tasa de consumo de oxígeno de sardinas adultas, *Sardinops sagax*, en relación a la temperatura, en condiciones de nado voluntario durante el proceso de alimentación y encontró que el consumo de oxígeno variaba de acuerdo el tamaño del alimento y la velocidad de nado; en efecto, el consumo de oxígeno fue mayor cuando las sardinas se alimentaban de partículas grandes (1.75,4.76, 5.44 y 11.68 mm) que cuando lo hacían de partículas pequeñas por filtración (partículas de 0.01, 0.02, 0.51, 0.057, 0.058, 0.88, 1.23 y 3.9 mm) y estas diferencias dependían de la velocidad de nado, que era mayor cuando las sardinas se alimentaban de partículas grandes. También encontró que el aumento en la temperatura producía un incremento en la respiración y en la velocidad de nado.

La resistencia térmica de un organismo se puede conocer al exponerlo a incrementos sucesivos de temperatura y observar una secuencia de respuestas de comportamiento, hasta identificar el valor térmico del comportamiento que caracteriza a la temperatura crítica máxima (TCMax), que se define como la media aritmética de los puntos térmicos en los que la actividad locomotora se desorganiza y el organismo pierde la capacidad de escapar de la condición que lo llevará rápidamente a la muerte, al incrementar la temperatura del agua 1 °C/min. Una forma de evaluar el efecto letal de la temperatura es estudiando la temperatura letal incipiente superior (TLIS), la cual limita la zona de tolerancia donde el 50% de los organismos de una población o de la muestra mueren cuando son expuestos de 48 a 96 h a una temperatura. Las respuestas de comportamiento termorregulador se utilizan como herramientas para conocer las condiciones ambientales en las que un organismo puede llevar a cabo sus funciones fisiológicas óptimamente, para establecer sus límites térmicos y como indicador de estrés y adaptación (Hernández, 2006).

El aumento de la temperatura ambiental puede ocasiona que los organismos se encuentren en su límite de tolerancia, lo cual produce estrés, daño o hasta la

muerte, aún cuando la variación térmica sea menor puede influir en la capacidad fisiológica, perturbando el crecimiento, la reproducción y las interacciones sociales (Hernández, 2006). Una forma de medir el estrés es evaluando los niveles de metabolitos y hormonas en la sangre. Los indicadores utilizados con más frecuencia son el cortisol, glucosa, enzimas aminotransferasas y la concentración de eritrocitos (Martínez-Porchas *et al*, 2009).

Barton *et al* (1987) alimentaron a la trucha *Salmo gairdneri* con cortisol y observaron el efecto a largo plazo en el crecimiento, condiciones fisiológicas y la respuesta al estrés. Los peces alimentados con una dieta rica en cortisol durante 10 semanas, mostraron un aumento en la concentración de cortisol en el plasma, sin embargo, al transcurrir las horas, esta concentración disminuyó. El crecimiento en los peces alimentados con cortisol fue menor en comparación con los que fueron estresados diariamente y los organismos control, libres de estrés.

Lankford *et al* (2005) midieron la amplitud del campo metabólico y la velocidad del nado crítico en el esturión verde *Acipenser medirostris,* expuesto a una condición de estrés crónico. Observaron que la concentración de cortisol se incrementó en respuesta al estímulo estresor durante los 21 días que duró su experimento y al mismo tiempo se redujeron la amplitud del campo metabólico y las reservas de glucógeno en el hígado. Esta reducción en las reservas de energía del esturión fue el resultado de un incremento en la tasa metabólica de mantenimiento.

Las respuestas a los efectos estresores de la temperatura son similares en los peces de agua dulce, Correa *et al* (2004) evaluaron los efectos de la temperatura (24, 27 y 30 °C) en el crecimiento y producción de cortisol como respuesta al estrés en el pez *Surubim Pseudoplatystoma corruscans*, para determinar la temperatura de crecimiento óptimo y encontraron que fue de 27 °C. A una temperatura de 30 °C, los niveles de cortisol fueron mayores y también hubo una mayor morbilidad lo que pudo indicar que los peces estaban bajo estrés crónico.

Pickering y Steward (1984) evaluaron la aclimatación del tejido interrenal de la trucha café *Salmo trutta* L., expuesta a condiciones de hacinamiento crónico (100 y 250 truchas por estanque) y, encontraron que la tasa de crecimiento disminuyó en un período de 110 días. El cortisol en el plasma se elevó a los 25 días posteriores a la exposición a las condiciones experimentales, pero a los 39 días, los niveles de cortisol fueron similares a los de las truchas mantenidas a baja densidad. Después de los 110 días, los niveles de cortisol en el plasma en ambos grupos fue bajo (<2 $ngml^{-1}$) y no hubieron diferencias significativas en la histología interrenal con lo cual concluyeron que la supresión de la tasa de crecimiento fue el resultado del hacinamiento y no estuvo mediada por la elevación crónica de los corticosteroides en el plasma.

Los daños ocasionados por los factores de estrés también se pueden observar en diferentes órganos, como son el hígado, el riñón, las branquias y la piel. Silva y Martínez (2006) evaluaron los cambios morfológicos en el riñón de los peces que habitan en un afluente de aguas residuales urbanas y encontraron lesiones severas en el riñón, en algunos casos irreparables. Los análisis morfométricos de las células interrenales de los peces de la zona urbana tenían un incremento en el número celular, en las áreas del núcleo y del diámetro nuclear, lo que indicó hiperactividad en las células interrenales, que es un signo de la estimulación a largo plazo del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI).

Bucher y Hofer (1993) evaluaron el efecto de tres diluciones de aguas residuales domésticas (13, 24 y 42 %) sobre la histología de las branquias, riñón e hígado de la trucha marrón (*Salmo trutta*) y demostraron que las altas concentraciones de las aguas residuales causaron cambios histológicos en el riñón y en el hígado. En las tres diluciones de las aguas residuales, las lesiones externas de los peces fueron infectadas rápidamente por hongos. Los cambios renales se observaron también en la trucha marrón y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Hernández (2006) evaluó el efecto de la aclimatación a de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) a 19, 21, 23 y 25 °C y estudió la temperatura crítica máxima (TCMax) y la letal superior. Observó que la exposición crónica a la temperatura ocasionó cambios en el tamaño del hepatocito, vacuolización, picnosis, apoptosis, necrosis y focos de infección bacteriana. Las TCMax a 23 y 25 °C fueron de 32 y 32.2°C y ocasionaron alteraciones del tejido hepático (hepatocitos vacíos, Infiltración de células sanguíneas, necrosis hepática e incremento en el diámetro del los nucléolos). También se observaron las respuestas de aumento de actividad, espasmos musculares y pérdida del equilibrio.

En el tejido renal, Hernández (2006) también observó alteraciones que consistieron en, un incremento del espacio de la cápsula de Bowman y el aumento en el tamaño de los glomérulos, glomérulos retraídos (21 °C), glomérulos con restos celulares y cápsulas de Bowman vacías (23 y 25 °C), degeneración tubular y glomerular, apoptosis, focos de infección bacteriana y la presencia de CMMs. En general las alteraciones se acentuaron conforme aumentó la temperatura experimental y el tiempo de exposición.

La distribución de las diferentes especies de peces está relacionada con la temperatura, la disponibilidad del alimento y en general con las condiciones adecuadas para que puedan llevar a cabo sus procesos fisiológicos. La temperatura también puede ser un factor estresor, debido a la poca tolerancia de algunas especies a las fluctuaciones térmicas, el efecto de la temperatura como estresor crónico ha sido estudiado ampliamente. En los estudios realizados con la tolerancia y resistencia térmica de los organismos acuáticos, se han descrito daños en tejidos como el hígado y el riñón, daños en la piel, en las branquias, en las aletas, susceptibilidad a enfermedades, así como también cambios en su forma de nado, aumento de actividad, espasmos musculares y la pérdida del equilibrio. La sardina es una especie de gran importancia económica ya que sus

poblaciones soportan una pesquería multinacional, en este sentido es importante conocer su tolerancia a la temperatura, ya que este factor determina los límites de su distribución, también es importante conocer los efectos negativos que este factor ambiental puede ocasionar en la estructura del riñón y del hígado, así como cambios en la concentración de cortisol.

Capítulo III

HIPÓTESIS.

El metabolismo de los peces pelágicos es afectado por la temperatura y por el tipo de dieta que consumen, ya que el tamaño de las partículas determina la forma y la velocidad del nado. La aclimatación a 15, 18 y 23 ˚C y la alimentación con partículas de dos tamaños (<500 y 1000-1180 μm) modificará la tasa de consumo de oxígeno. En el mismo sentido, la exposición crónica a temperaturas de aclimatación extremas (superiores e inferiores) provocaran alteraciones en los tejidos renal y hepático y ocasionarán un incremento en la concentración del cortisol lo que las hará más susceptibles a enfermedades.

Capítulo IV

OBJETIVOS.

IV. 1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la temperatura de aclimatación y del tamaño del alimento en el metabolismo, el cortisol y en el tejido hepático y renal de la sardina de la corriente de California *Sardinops caeruleus*.

IV. 1. 2. Objetivos particulares

- Cuantificar el consumo de oxígeno de rutina de la sardina a 15, 18 y 23˚C.

- Cuantificar el efecto de dos tamaños de partícula de alimento sobre la forma de alimentación y la acción dinámica específica aparente de la sardina aclimatada a 15, 18 y 23 ˚C, utilizando en el consumo de oxígeno como estimador del metabolismo.

- Estimar el efecto de la exposición crónica a las temperaturas de las áreas de distribución geográfica de los grupos de sardinas de aguas frías, templadas y cálidas, utilizando como indicadores de estrés la concentración plasmática de cortisol y las alteraciones en los tejidos hepático y renal.

Capítulo V

METODOLOGÍA.

Una muestra de sardinas del Pacífico se adquirió en el mes de junio, de la pesca comercial que abastece a las embarcaciones de pesca deportiva en el Puerto de Ensenada (32º 52' Latitud Norte y 116º 37’ Longitud Oeste). La captura de sardinas se hace en la región que abarca desde las costas de Rosarito hasta la Bahía de Todos Santos en Baja California (Com. pers. Simón, 2009).

Un grupo de 270 sardinas juveniles (N_T) (la longitud de primera madurez y la longitud a la que maduran el 50% de las sardinas es de 160 y 180-190 mm respectivamente, Clark, 1934) se distribuyeron en grupos de 15 sardinas (Ni) en 18 estanques de 160 l cada uno (de 93 y 63 cm de diámetro mayor y menor respectivamente). Las sardinas tenían una longitud total y un peso promedio de 140±25 mm y 25±2.9 g respectivamente. Se aclimataron a tres temperaturas (15, 18 y 23 ˚C) por un periodo de 30 días. Transcurrido el periodo de aclimatación, se procedió a realizar las medidas de consumo de oxígeno. Los estanques cubiertos con malla sombra de 95 % de reducción de la luz, estuvieron distribuidos en tres hileras de seis estanques cada una. El diseño experimental consistió en un arreglo de tres temperaturas, un alimento de dos tamaños de partícula (<500 y 1000-1180µm), por triplicado (3x2x3= 18 unidades experimentales). Los estanques se dividieron en tres grupos de seis, uno para cada temperatura y cada uno de estos se subdividió en dos grupos de tres, cada uno para un tamaño de partícula de alimento.

Se utilizó alimento para trucha “Iniciación Alevin II” de El Pedregal Silver Cup (Estado de México), de 0.850 a 1.180 mm de diámetro, con una composición proximal de 52 y 14 % de proteínas y lípidos respectivamente (Tabla I). Las partículas grandes se separaron mecánicamente a través de una malla de nylon de 1000 μm y para ajustar el tamaño de las partículas pequeñas, el alimento se molió con un mortero de porcelana y se tamizó con una malla de nylon de 500 μm de apertura para separar las partículas <500 μm.

Tabla I. Descripción del alimento para trucha, Iniciación Alevin II, El Pedregal Silver Cup, utilizado para alimentar a las sardinas *Sardinops caeruleus.*

TIPO DE ALIMENTO	Alevin #2
TAMAÑO	0.850-1.180
ANÁLISIS GARANTIZADO	
Proteína (mín)	52.00%
Grasa (mín)	14.00%
Fibra (máx)	1.20%
Ceniza (máx)	11.00%
Humedad (máx)	10.00%
INGREDIENTES	
Harina de pescado, harina de sangre, pasta de soya, harina de trigo, aceite de pescado estabilizado, lecitina de soya, vitamina A, vitamina D3, vitamina B12, riboflavina, niacina, ácido fólico, menadiona, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina, biotina, vitamina E, vitamina C estabilizada, cloruro de colina, selenio, manganeso, zinc, cobre, yodo, ácido propiónico (fungicida), etóxiquina (antioxidante)	

La entrada de agua se reguló con una válvula que se colocó sobre cada estanque, provista de una manguera flexible de polietileno que quedaba en la superficie del estanque a una distancia de 10 cm por encima de la superficie del agua, para crear una corriente que ayudaba a mantener una distribución homogénea del oxígeno en el agua y a concentrar y eliminar los residuos de alimento y heces a través de un tubo de control de nivel colocado en el centro del estanque, evitando así la acumulación de materia orgánica y por lo tanto el incremento en la concentración de amonio en el agua. Se colocaron piedras difusoras en el fondo del estanque, a un costado del tubo de nivel, para mantener una concentración de oxígeno a saturación.

El oxígeno disuelto, la temperatura y la salinidad se midieron con un analizador YSI modelo 85. El nitrógeno amoniacal total (TAN), los nitritos y nitratos se midieron utilizando un método comercial (API Aquarium Pharmaceuticals).

Cada grupo de seis estanques (un grupo para cada temperatura) estaba conectado a un estanque de compensación de 160 l, desde el cual una motobomba centrifuga Sweetwater modelo SHE 3.0, que impulsaba el agua desde el estanque de compensación a través de una bomba de calor o de un enfriador y posteriormente la distribuía a cada estanque de un grupo o temperatura de aclimatación. Para mantener la temperatura del agua a 15 °C se utilizó un enfriador Delta Star modelo DS-5 y para calentar el agua a 23 °C se utilizó una bomba de calor Delta Star modelo DSHP-6. Para la temperatura de 18 °C se utilizó el agua del sistema de recirculación del Departamento de Acuicultura, que tenía una temperatura promedio de 18±.05 °C. Para evitar la acumulación de metabolitos (TAN) y de materia orgánica particulada y disuelta (alimento remanente, heces y proteínas en solución), se mantuvo un suministro constante de agua de mar del sistema general de aprovisionamiento del laboratorio central, que se mantiene libre de estos contaminantes (TAN no detectable). La tasa de

recambio de agua fue de 1.5 l/min, lo que equivale a una tasa de recambio de 200% al día (Figura 4).

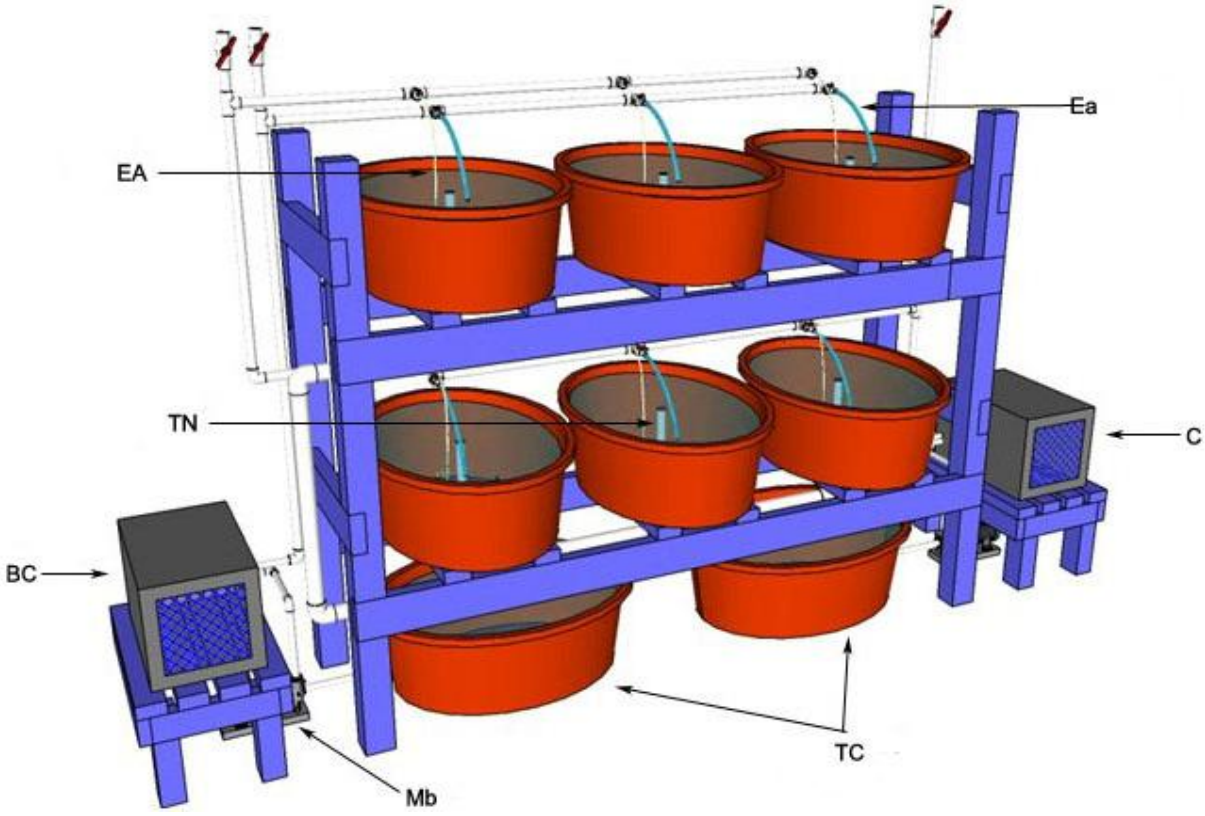


Figura 4. Sistema de aclimatación para la sardina de la corriente de California *Sardinops caeruleus*. Entrada de aire (EA), entrada de agua (Ea), chiller (C), tanque de compensación (TC), motobomba (Mb), bomba de calor (BC) y tubo de nivel (TN).

V. 1. Medición del consumo de Oxígeno.

V. 1. 1. Consumo de oxígeno de rutina

La medición del consumo de oxígeno se hizo por triplicado para grupos de cinco sardinas de cada temperatura de aclimatación. Las sardinas permanecieron en la cámara por un periodo de 24 h, durante el cual se hicieron mediciones consecutivas del metabolismo, aplicando el principio de respirometría de flujo intermitente (Steffensen, 1989). Cada medida del metabolismo se hizo a partir de la concentración de oxígeno medida cada segundo durante un periodo de 20 minutos en que la cámara permaneció cerrada.

Para las mediciones de la tasa de consumo de oxígeno se utilizó una cámara respirométrica similar a la descrita por Lingen (1995) (Figura 5), que consistió de un estanque de 160 l de capacidad (Fig 5, Ta), provisto de una tapa de acrílico que permitió cerrarla herméticamente. La cámara se colocó en un estanque (Fig. 5, Tb) de 700 l, que sirvió para mantener la temperatura del agua y para cambiar el volumen de agua de la cámara respirométrica, asegurando así un control preciso de la temperatura experimental y la restauración periódica de la calidad del agua (oxígeno a saturación y ausencia de TAN). El cambio de agua de la cámara (periodo de lavado) se hizo con una motobomba sumergible controlada por un sistema automatizado AutoResp ^{TM}1 de LOLIGO SYSTEMS, conectado a una computadora portátil, donde se registraron las medidas del consumo de oxígeno.

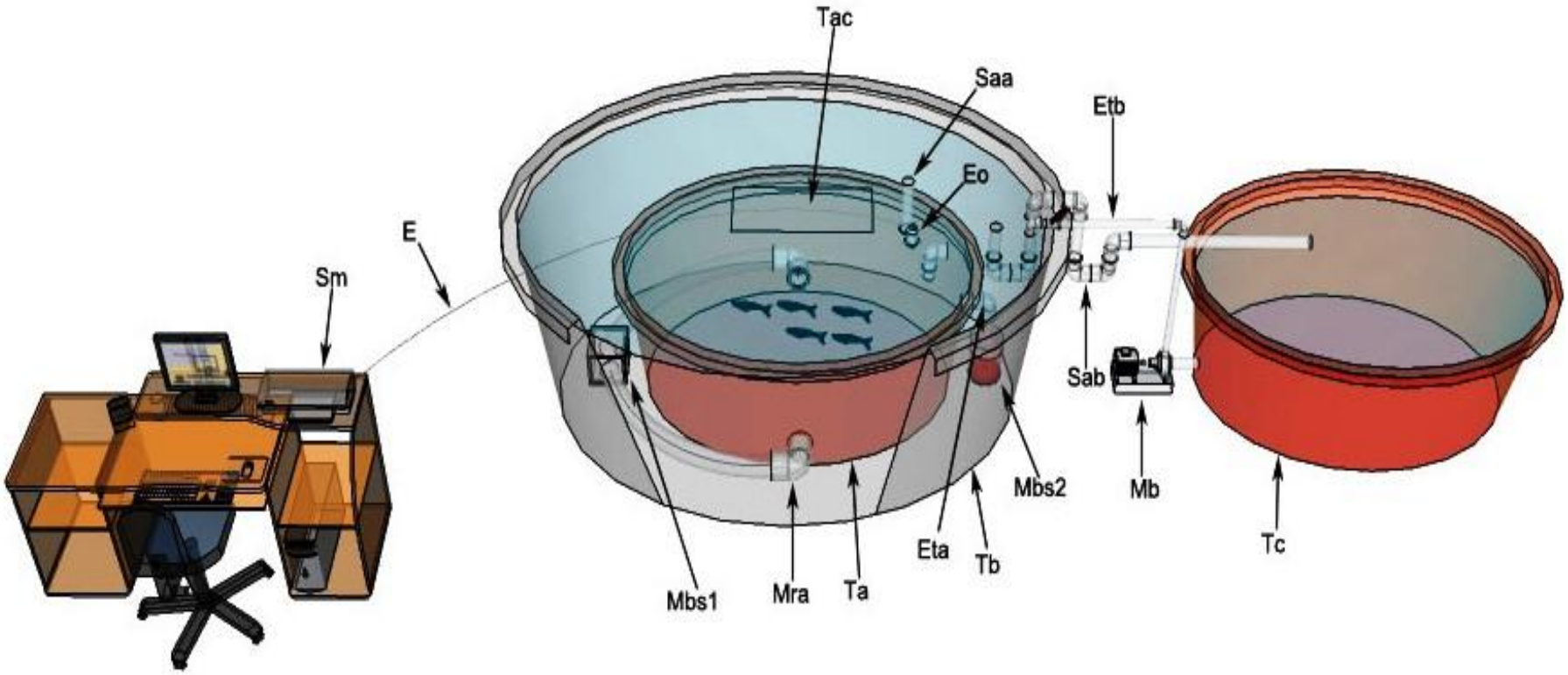


Figura 5. Respirómetro intermitente para medir el consumo de oxígeno de la sardina de la corriente de California *Sardinops caeruleus.* Dispositivo electrónico para el control automatizado de la medición del consumo de oxígeno (Sm), electrodo de medición de oxígeno (E), tapa de acrílico de la cámara (Tac), salida de agua de lavado (Saa), entrada del electrodo del oxígeno (Eo), entrada de agua (Etb), tanque de compensación (Tc), motobomba (Mb), salida de agua (Sab), estanque para recambio de agua y control de temperatura (Tb), entrada de agua para lavado (Eta), cámara metabólica (Ta), manguera de recirculación de agua de la cámara metabólica (Mra), motobomba sumergible 1 (Mbs1) y motobomba sumergible dos (Mbs2).

Antes de iniciar las mediciones del consumo de oxígeno, las sardinas se mantuvieron en condiciones de ayuno por un periodo de 24 h, posteriormente se introdujeron en la cámara respirométrica, previamente pesadas (g) y medidas (mm). Para minimizar el estrés que pudiera producirse durante este proceso, se utilizó el anestésico metanosulfonato de tricaina (MS222, Argent). Una vez crcunscritas las sardinas en la cámara, se selló e inició el proceso de medición intermitente y automática.

Las mediciones del consumo de oxígeno se hicieron en ciclos consecutivos de 1650 s, cada ciclo se dividió en tres etapas, una primera de lavado de la cámara de 360 s de duración; una segunda etapa de espera de 90 s, durante la cual la masa de agua de la cámara se homogeneizó con una motobomba auxiliar dispuesta en un circuito cerrado; y una tercera etapa de 1200 s de duración, durante la cual se midió el consumo de oxígeno. Para evitar procesos de respiración anaeróbica durante las mediciones del consumo de oxígeno, no se permitió que la concentración de oxígeno disuelto disminuyera por debajo del 80% de la concentración inicial que correspondió al valor de saturación para esa temperatura y salinidad (Beamish, 1984). El tiempo correspondiente a la disminución del 20 % en la concentración de oxígeno se predeterminó a partir de un ensayo preliminar.

V. 1. 2. Acción Dinámica Específica (SDA).

Para medir el efecto del consumo de alimento (acción dinámica específica aparente, SDA, por sus siglas en inglés) sobre la tasa metabólica de las sardinas aclimatadas a las diferentes temperaturas, una muestra de cinco organismos, que permanecieron en condiciones de ayuno por un periodo de 24 h, se confinaron en la cámara respirométrica. Para minimizar el estrés que pudiera producirse durante el traslado, se utilizó un anestésico (metanosulfonato de tricaina, MS222, Argent).

A continuación se siguió el procedimiento de medición descrito anteriormente, solo que en este experimento se suministró alimento particulado o en polvo durante el periodo de espera del ciclo 9. Cada alimento se proporcionó en una ración única a una razón del 2% de la biomasa húmeda de las sardinas, que se agregó por el orificio que servía para la salida de agua durante el periodo de lavado y para colocar el sensor de temperatura (Fig. 5, Saa). Para adicionar el alimento en forma particulada o en polvo, primero se disolvió en agua de mar, para evitar que se formaran grumos y se precipitara al fondo del estanque, y con un embudo se agrego a la cámara respirométrica.

V. 2. Cortisol

IV. 2. 1. Muestreo de sangre y preparación del plasma

A continuación del periodo de 24 h de medición del consumo de oxígeno, a cada una de las sardinas se les extrajo una muestra de sangre, haciendo una punción en el pedúnculo caudal con una jeringa de 1 ml, orientada en dirección ventro-dorsal y en posición diagonal postero-anterior con respecto al eje longitudinal del cuerpo, para este procedimiento las sardinas fueron extraídas cuidadosamente de la cámara respirométrica y anestesiadas inmediatamente con metanosulfonato de tricaina (MS222, Argent). A cada organismo se le extrajo un volumen de sangre de alrededor de 1 ml, que fue transferida a tubos impregnados con K_2EDTA (Microtainer Brand®) con capacidad de 1 ml, y se agitaron suavemente para que la sangre tuviera contacto con las paredes impregnadas con K_2EDTA y evitar la formación de coágulos. Después, las muestras se centrifugaron a 10000 r.p.m. por diez minutos para obtener el plasma (Scott *et al*., 1980), el cual fue colocado en tubos de vidrio (1 ml) estériles y almacenados a -20 °C para la extracción del cortisol y su posterior análisis.

V. 2. 2. Extracción de cortisol

Para extraer el cortisol de las muestras de plasma de la sardina, a una muestra de 100 µl del plasma previamente recolectado se le añadió 1 ml de éter etílico y se mezcló vigorosamente por 30 segundos y se dejó reposar para permitir la separación de la fase etérea de la fase acuosa. Se recuperó la fase etérea, se colocó en un tubo de vidrio y se evaporó con una corriente de nitrógeno gaseoso. Para el análisis ELISA, cada muestra se re suspendió en una solución amortiguadora de extracción en una dilución 1:2 y se procedió al análisis siguiendo las instrucciones del fabricante (NEOGEN, 402710).

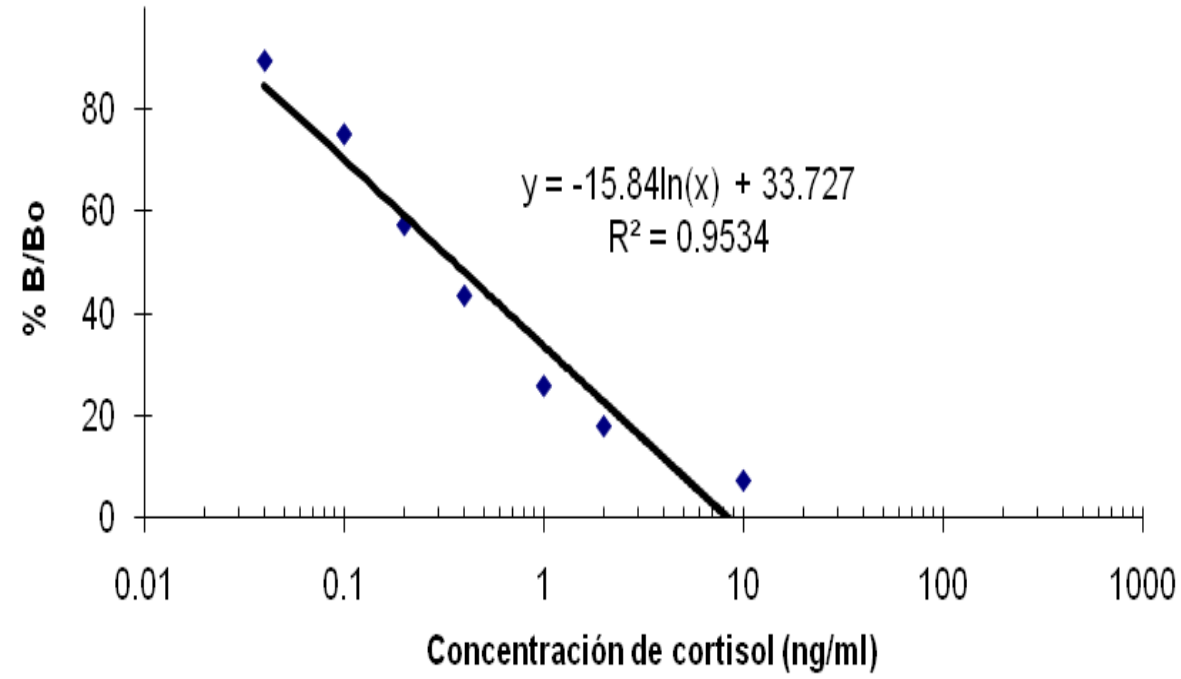
V. 2. 3. Análisis de Cortisol

La cuantificación de la concentración de cortisol en el plasma de la sardina se hizo mediante una prueba cuantitativa de inmunoabsorbancia por competencia (ELISA, NEOGEN®, #402710). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, que en forma resumida consistió en la preparación de una curva estándar para cortisol a partir de una serie de concentraciones conocidas de un estándar de cortisol (Tabla II). Cada muestra del estándar o del extracto plasmático se ensayó por duplicado colocando 50 µl del extracto plasmático de cortisol más 50 µl del conjugado cortisol-enzima (Cortisol Enzyme Conjugate [HRP]). Después de una hora de incubación, durante la cual el cortisol de la muestra de plasma y el cortisol conjugado compitieron por los anticuerpos previamente fijados a la placa, se reveló la concentración de cortisol-conjugado utilizando como sustrato 150 µl de sustrato K-Blue (3’3’5’5’ tetrametilbenzidina TMB más H_2O_2), la placa se incubó por 30 minutos a 25 °C, tiempo durante el cual la enzima degradó el sustrato, produciendo un color azul. La cuantificación de la absorbancia se hizo a una longitud de onda de 650 nm en un analizador de absorbancia Beckman Coulter AD200, en donde las absorbancias se transformaron en porcentajes, tomando

como 100% la absorbancia de E_0 (solución buffer EIA) y se expresaron como el porcentaje de ligación máximo (%B/B_0). La curva estándar se construyó graficando los valores de cada concentración en el eje de las ordenadas contra la concentración (ng/ml) en el eje de las abscisas (Figura 6). La intensidad de esta coloración azul es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra de plasma analizada.

Tabla II. Concentraciones de cortisol de la curva estándar para la prueba de inmunoabsorbancia ELISA, NEOGEN®, #402710.

Estándar	Concentración ng/ml
E_0	0
E_1	0.04
E_2	0.1
E_3	0.2
E_4	0.4
E_5	1
E_6	2
E_7	10



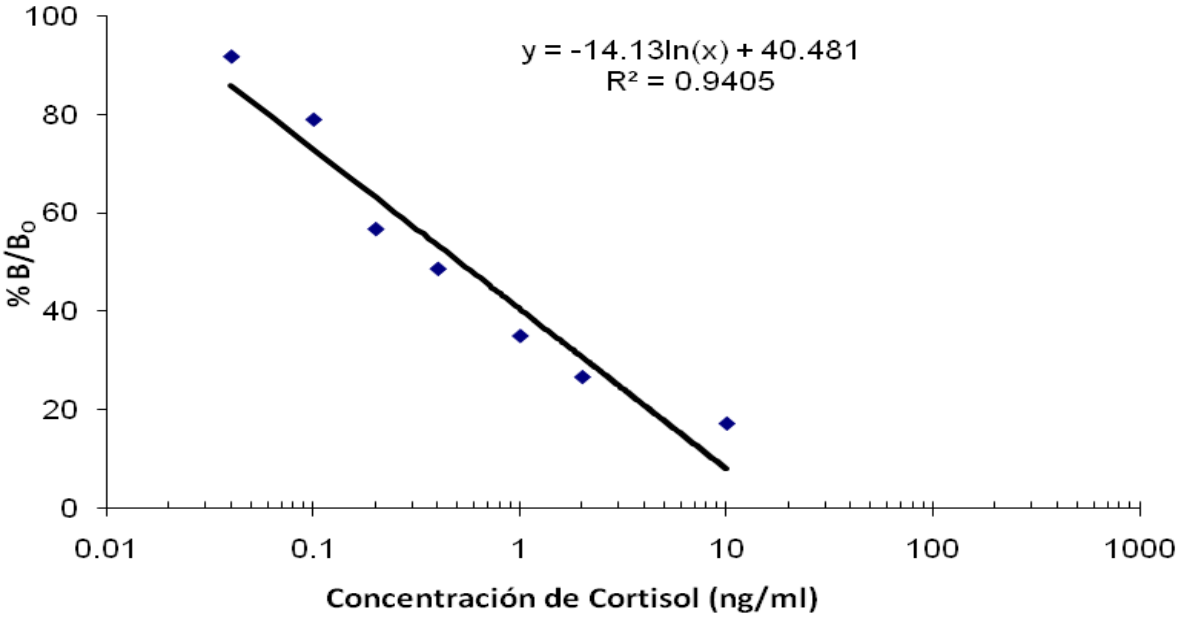


Figura 6. Curva estándar para cuantificar la concentración de cortisol en el plasma de la sardina de la Corriente de California con la prueba de inmunoabsorbancia ELISA, (NEOGEN, 402710). Porcentaje de ligación (%B/B$_0$)

V. 3. Histología

V. 3. 1. Análisis histológico del riñón e hígado.

Después de la extracción de plasma, cada sardina fue disecada por la región media abdominal para extraer el hígado y el páncreas. El hígado de la sardina consiste de varias secciones, una íntimamente adosada a los intestinos y a los ciegos pilóricos, de tal forma que envuelven al tracto digestivo en su región anterior ventral y dos más que se proyectan dorsalmente en una rama izquierda y otra derecha. Se disecó todo el hígado y se tomó una muestra de la sección izquierda del órgano.

El riñón es un órgano pareado que se ubica en posición dorsal adyacente a la medula espinal a lo largo de toda la cavidad abdominal, aunque es un órgano discreto, la extracción es complicada por la forma en que está vascularizado, para los análisis se disecó todo o la mayor parte del órgano, desde el extremo posterior hacia el anterior.

Cada uno de los órganos disecados se colocó en una caja de plástico para histología previamente etiquetada. Las muestras fueron fijadas en solución Davison por un periodo de 24 h, posteriormente se cambiaron a una solución de alcohol al 70 %. Después de la fijación, los órganos se expusieron a un proceso de deshidratación utilizando una serie ascendente de soluciones de alcohol en un procesador de tejidos automático ó Histokinette marca Leica (modelo TP1040) siguiendo la secuencia que se indica en la tabla III. El proceso de deshidratación tuvo una duración de 24 horas, posteriormente, las muestras fueron incluidas en parafina utilizando un incluidor Leica EG1160.

Los cortes de los tejidos de 5µm de espesor se hicieron en un micrótomo rotatorio (American Optical, modelo Spencer 820) y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-

E). El montaje permanente del tejido se hizo con resina sintética (Cytoseal). Finalmente, las láminas histológicas se revisaron en un microscopio Olympus CKX31 con el fin de evaluar y describir el daño asociado al estrés producido por la temperatura.

Tabla III. Protocolo de deshidratación e inclusión para los tejidos hepático y renal de la sardina del Pacífico, *Sardinops caeuruleus*.

Reactivo	Tiempo (horas)
Alcohol al 80%	2
Alcohol al 80%	2
Alcohol al 96%	2
Alcohol al 96%	2
Alcohol al 100%	2
Alcohol al 100%	2
Alcohol-Cloroformo	2
Cloroformo al 100%	2
Cloroformo al 100%	2
Cloroformo-Parafina	2
Parafina	2
Parafina	2

V. 3. 2. Cuantificación del contenido calórico de los tejidos

Con el objetivo de cuantificar el contenido de energía del hígado y de la musculatura, se disecó una muestra de estos tejidos y se secó en la estufa a 40 °C durante 24 h, posteriormente, cada muestra se homogeneizó en un mortero y se prepararon pastillas de 0.625 mm de diámetro con un peso aproximado de 25 a 200 mg en una prensa Parr 2812. Las pastillas se secaron a peso constante en

una estufa Blue M Electric Company (modelo OV-560A-2) por 24 h, una vez concluido este tiempo, se mantuvieron en un desecador para que no se hidrataran y se procesaron en un calorímetro semimicro (Parr, 1425). A las muestras que no tenían el peso mínimo necesario de 25 mg, se les agregó ácido benzoico para poderlas procesar en el calorímetro. Para calcular el contenido calórico de estas muestras, se siguió el procedimiento indicado por el fabricante para cuantificar el contenido calórico total de la muestra (tejido más ácido benzóico), posteriormente se le restaron las calorías correspondientes a la masa de ácido benzóico contenida en la muestra, utilizando la constante calórica de 1400 kcal/g de ácido benzóico (Parr, 3414).

Para evaluar los efectos potenciales de la temperatura y el alimento en la anatomía del riñón y del hígado se consideraron los criterios cuantitativos de Zacarías *et* al., (2009). Para el análisis de las alteraciones del tejido renal también se utilizaron los criterios cualitativos de Hernández (2006).

Alteraciones del riñón de la sardina:
A) Necrosis tubular (NT)
B) Necrosis glomerular (NG)
C) Centros melanomacrófagos (MM)
D) Picnosis (Pic)
E) Apoptosis (Ap)
F) Focos de infección bacteriana (FIB)
G) Coagulación (Coag)
H) Vacuolización (Vac)
I) Degeneración epitelial de los túbulos (DET)

Para el caso particular del glomérulo se siguieron los criterios de Ferguson (2006), que consistieron en evaluar el incremento en el espacio intraglomerular del corpúsculo renal.

En las laminillas histológicas del hígado se seleccionaron al azar cinco campos (una laminilla por individuo) y se midió el perímetro y área nuclear de cinco hepatocitos por campo por individuo. En las laminillas donde se observaron zonas necróticas se cuantificó el porcentaje de tejido necrosado con respecto del tejido sano.

V. 3. 3. Análisis Estadístico

Para analizar los resultados de los diferentes experimentos, inicialmente se evaluó la normalidad y la homogeneidad de varianza de los datos con una prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnof y con la prueba de Levene respectivamente. A los datos que no cumplieron con los criterios de normalidad, aun después de una transformación, se les aplicó un analisis de varianza no paramétrico de Friedman. Los datos que cumplieron con los criterios de normalidad y homocedasticidad se analizaron con un ANOVA paramétrico de dos factores (temperatura y tamaño de partícula del alimento), seguido de una prueba a posteriori de Fisher (Zar, 1984).

Capítulo VI

RESULTADOS.

VI. 1. Sobrevivencia y crecimiento.

El porcentaje de sobrevivencia de las sardinas disminuyó a medida que la temperatura de aclimatación se incrementó, el efecto fue muy marcado cuando se alimentaron con la dieta pulverizada a 23 °C, en contraste, este efecto fue menos letal cuando las sardinas se alimentaron con la dieta particulada (Tabla IV). En las sardinas aclimatadas a 23 °C se observó una mayor susceptibilidad a las enfermedades, ya que tuvieron indicios visuales de infección cutánea, daño en la boca y hongos en el opérculo, en diferentes grados, desde moderado, permitiendo que las sardinas o se recuperaran después de un tratamiento con oxitetraciclina (Terramicina, Pfizer), o que fuera letal. Para prevenir las altas tasas de mortalidad, se procedió a modificar el régimen alimentario, de tal forma que durante el periodo de aclimatación sólo se alimentaron con la dieta particulada, para evitar así un factor más de estrés. A partir de la tercera semana de aclimatación se inició la alimentación con alimento en polvo y particulado respectivamente. La sobrevivencia a 23 °C fue menor que la registrada en las otras dos temperaturas de aclimatación, por lo que el proceso se repitió en dos ocasiones, aclimatando nuevos grupos de sardinas. La concentración de O_2, salinidad, TAN y temperatura se mantuvieron siempre dentro de los parámetros normales (OD 6 mg/l^{-1}, TAN <0.5 mg/l, T° 15, 18 y 23 ± 0.05, Nitritos 0-0.25 mg/l)

Tabla IV. Porcentaje de sobrevivencia de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax*, aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta de dos tamaños de partícula (N_i= 15; N_T= 270).

	ALIMENTO	
Temperatura (°C)	**Particulado 1000-1180 µm**	**Pulverizado <500 µm**
15	36	42
18	29	38
23	24	7

En la figura 7 se observan las longitudes de las sardinas aclimatadas a las tres temperaturas y alimentadas con los dos tamaños de partícula. La longitud inicial fue de 14±1.3 cm y transcurrido un periodo de aclimatación de 30 días, las sardinas aclimatadas a 23 °C y alimentadas con la dieta pulverizada (partículas <500 µm), no crecieron, a diferencia de aquellas alimentadas con la dieta particulada a 23 °C (1000-1180 µm) y con las aclimatadas a 15 y 18 °C y alimentadas con la dieta en polvo. Las sardinas con mayor crecimiento fueron las aclimatadas a 18 °C y alimentadas con la dieta en polvo (Figura 7). Sin embargo estadísticamente no hubo diferencias significativas ($p>0.05$).

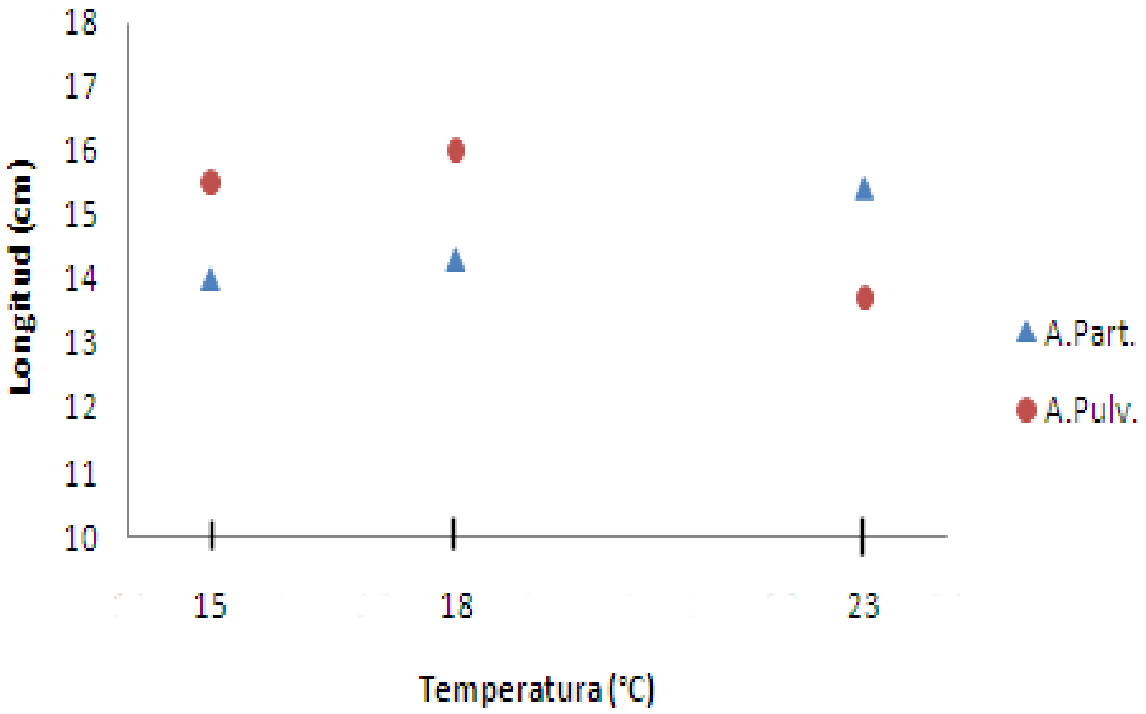


Figura 7. Longitud total (cm) de las sardinas aclimatadas a tres temperaturas y alimentadas con dos tamaños de partícula (<500 y 1000-1180 µm).

La masa de las sardinas siguió un comportamiento similar al observado para la longitud, las sardinas aclimatadas a 23 °C y alimentadas con la dieta pulverizada, disminuyeron su peso con respecto al peso inicial de 25±1.7 g. En contraste, en las sardinas alimentadas con la dieta particulada no se observaron diferencias estadísticas entre el peso inicial y final ($p>0.05$). Las sardinas alimentadas con la dieta en polvo y aclimatadas a 15 y 18 °C incrementaron su peso, pero a estas temperaturas, aquellas que se alimentaron con el alimento particulado bajaron de peso en comparación con el peso inicial (Figura 8).

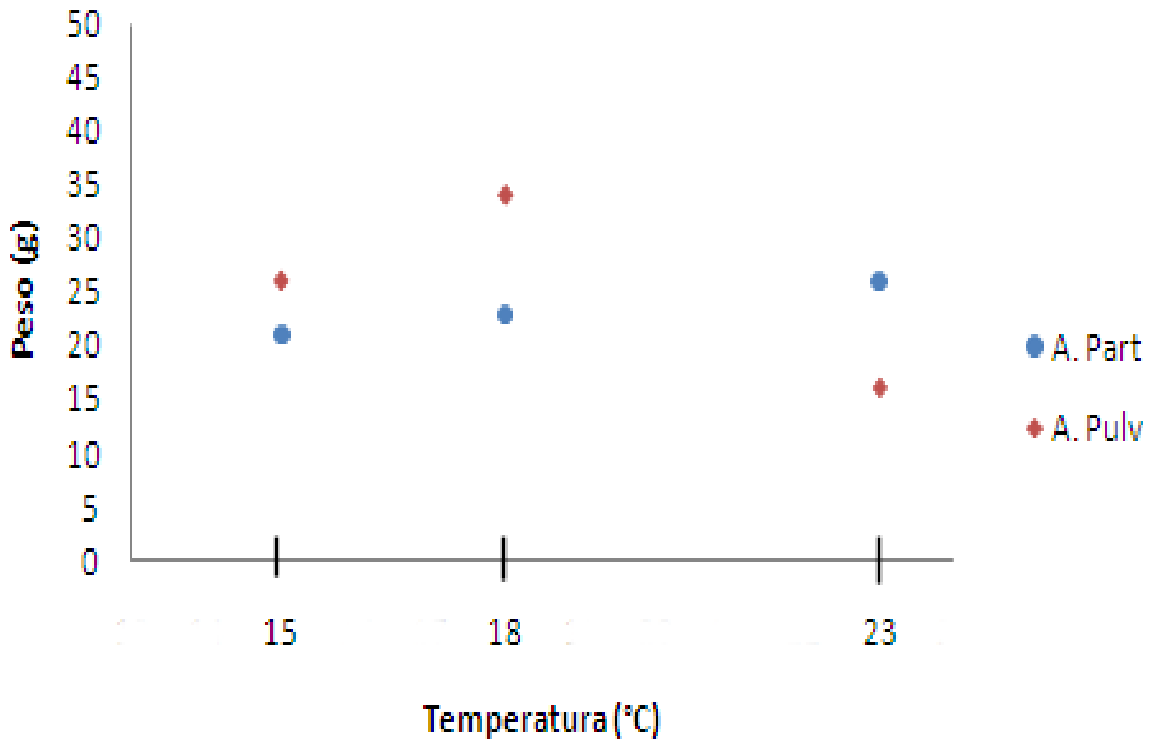


Figura 8. Peso (g) de las sardinas de la Corriente de California *Sardinops caeruleus*, aclimatadas a las tres temperaturas y alimentadas con dos tamaños de partícula (<500 y 1000-1180 µm).

VI. 2. Consumo de Oxígeno

Con los resultados de las medidas de la tasa de consumo de oxígeno (VO_2 mg kg^{-1} h^{-1}) de diferentes organismos se elaboró una gráfica tipo para describir los estados metabólicos de las sardinas (Figura 9), considerando el consumo de oxígeno en ciclos de medición de 27.5 minutos (integrados por tres periodos, uno de lavado de la cámara, otro de espera y otro más de medición) durante 24 h. Durante las primeras tres horas (ciclos 1-7) posteriores a la colocación de las sardinas a la cámara metabólica, se registra una disminución de la VO_2, ya que la sardina pasa de un estado alterado (estrés por la manipulación) a un estado de

relajación (3.5 h, ciclos 1-7), transcurrido este periodo, se observa un estado metabólico de rutina diurno (MRd) en el cual la sardina nada sin presión de ningún tipo. Posteriormente (4-5 h, ciclos 9-11) se pueden reconocer los valores de la VO_2 asociada con el incremento en la actividad natatoria relacionada con el consumo de alimento (SDAm), durante este periodo el consumo de oxígeno fue mayor en comparación con los otros periodos. Entre las 5 y las 11.45 h (ciclos 11-25), sucede el estado correspondiente a la acción dinámica específica, que se asocia con los procesos bioquímicos como la digestión y asimilación de los nutrientes (SDAb); continúa el consumo de oxígeno durante la noche (MRn) (12.83-20 h, ciclos 28-44) y por último, se vuelve al estado inicial de metabolismo de rutina asociado al día (MRd) (20.62-24.74 h, ciclos 45-54).

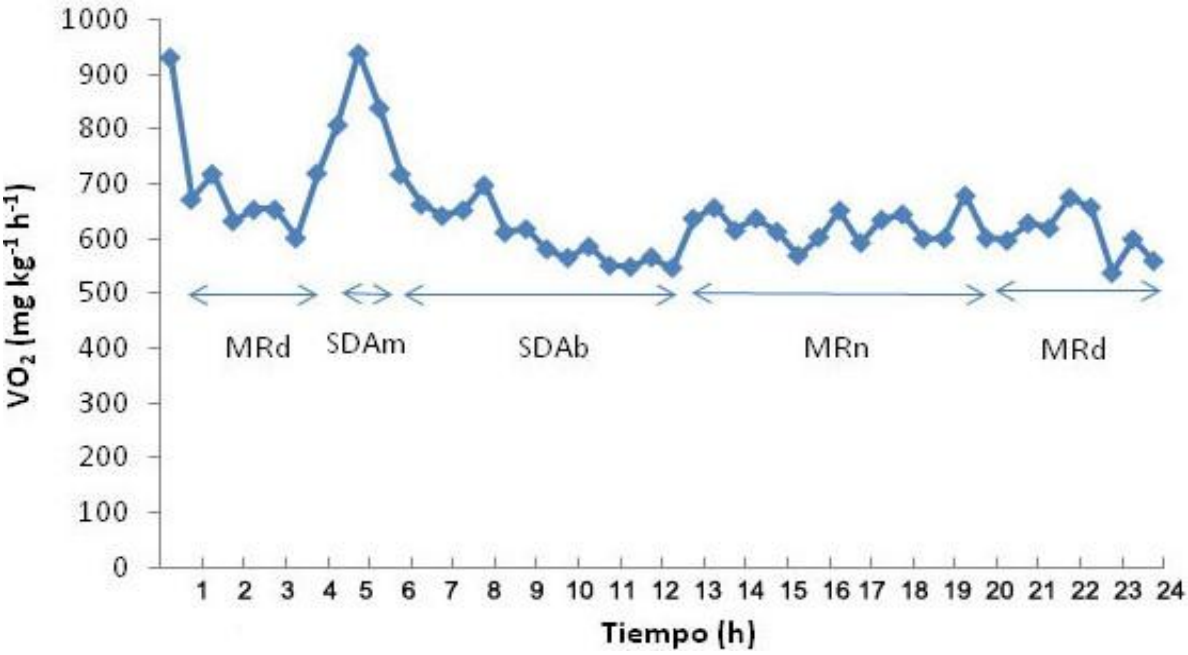


Figura 9. Tasa de consumo de oxígeno VO_2 (mg O_2 kg^{-1} h^{-1}) para la sardina de la Corriente de California en una cámara respirométrica de 160 l siguiendo el método de respirometría intermitente. El consumo de oxígeno se midió en grupos de cinco sardinas. Cada ciclo corresponde a tres periodos, uno de lavado de la cámara, otro de espera y otro más de medición del consumo de oxígeno. MRd=metabolismo de rutina disurno; MRn=Metabolismo de rutina nocturno; SDAm= Acción dinámica específica por actividad mecánica; SDAb=acción dinámica específica por actividad bioquímica.

Se encontraron diferencias en el consumo de oxígeno resultante de la SDAb, las cuales están relacionadas con el tipo de alimento y fueron mayores a 18 y 23 °C en las sardinas alimentadas con la dieta pulverizada. (Tabla V)

Tabla V. Tasa de consumo de oxígeno VO_2 (mg O_2 kg^{-1} h^{-1}) de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, en diferentes estados metabólicos, aclimatada a tres temperaturas y alimentada con dos tamaños de partícula (<500 y 1000-1180µm). MRd=metabolismo de rutina disurno; Mrn=Metabolismo de rutina nocturno; SDAm= Acción dinámica específica por actividad mecánica; SDAb=acción dinámica específica por actividad bioquímica.

	Temperatura (°C)					
	15		18		23	
Estado metabólico	A.part.	A.pulv.	A.part.	A.pulv.	A.part.	A.pulv.
MR_d	339±45	314±55	630±65	349±71	330±26	753±221
MR_n	344±38	285±42	624±55	343±71	295±67	625±231
SDAm	185±112	175±36	269±34	299±64	316±282	348±406
SDAb	$7±7^a$	$12±0^a$	$64±10^b$	$44±5^a$	$4±41^a$	$111±102^b$

Con los valores de la tasa de consumo de oxígeno de cada uno de los estados metabólicos descritos anteriormente, se calculó el promedio de la VO_2 en relación con la temperatura y el tamaño de partícula del alimento. Cuando las sardinas se alimentaron con la dieta particulada, la actividad relacionada con la captura del alimento (SDAm) se tradujo en un incremento sustancial en la tasa de consumo de oxígeno del 41, 32 y 115% para 15, 18 y 23°C respectivamente. A 18°C, se observaron las tasas de consumo de oxígeno más altas en todos los estados del metabolismo (MRd, MRn, SDAm y SDAb) (Figura 10).

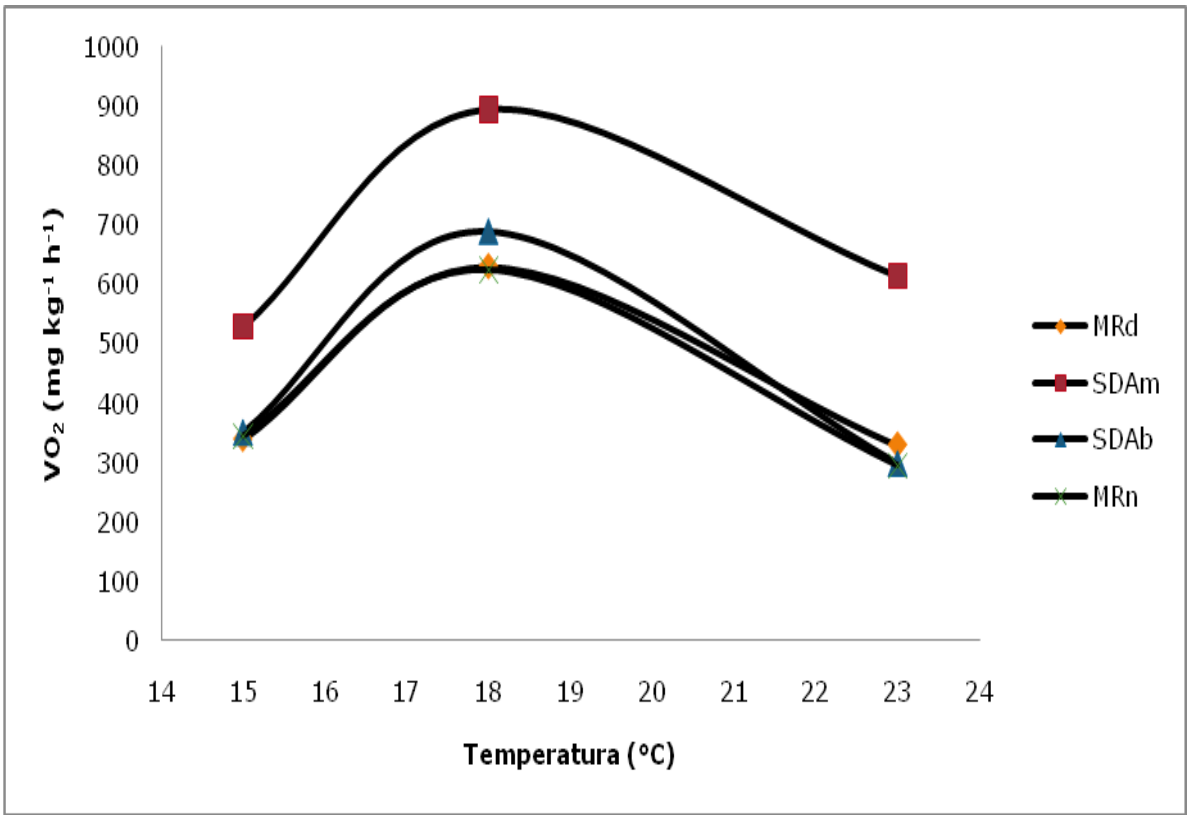


Figura 10. Tasas de consumo de oxígeno de rutina VO_2 (mg O_2 kg^{-1} h^{-1}) durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta comercial particulada.

La VO_2 para los distintos estados metabolicos siguen una tendencia parabólica, con un máximo a los 18 °C. Las VO_2 asociadas con los estados MR diurno y nocturno son muy similares, aunque durante la noche, la conducta de las sardinas es diferente a la del día, ya que nadan en un estado de agregación más relajado y a una menor velocidad. El incremento de la VO_2 relacionada con la alimentación se dividió en dos etapas consecutivas, la primera esta asociada con el incremento en la actividad natatoria que forma parte de la conducta alimentaria de la sardina y que consiste en nadar a una mayor velocidad (en comparación con el estado

rutinario) con la boca abierta (SDAm), ya sea para filtrar el alimento de diámetro pequeño (alimento pulverizado) o para capturar partículas de mayor tamaño (alimento particulado). La segunda etapa está asociada con los procesos de digestión, absorción y asimilación de los nutrientes. El incremento en la VO_2-SDAm es mayor en todas las temperaturas y se incrementa en forma moderada en proporción directa con el incremento de la temperatura (Figura 11). En contraste con el efecto de la actividad mecánica del nado, el incremento en la VO_2-SDAb producto de la actividad bioqímica es menor, no obstante, la duración del nado para la captura de alimento es muy reducido en comparación con la duración de la actividad bioquímica (v. g. 2 y 7.5 h respectivamente) (Figura 9).

Las VO_2 para los distintos estados metabólicos de las sardinas aclimatadas a las diferentes temperaturas tienen una relación temporal similar a la que se muestra en la figura 9. En este sentido las VO_2 que se presentan en la figura 14 corresponden al promedio de los valores registrados en el periodo correspondiente a ese estado y con los dos tipos de alimento, las diferencias entre las tasas son similares a 15 °C con ambos tipos de dieta. A 18 °C con la dieta particulada, se produce un mayor incremento en las VO_2 comparado con la dieta pulverizada (Figuras 11 y 12), a 18 °C con la dieta en polvo las VO_2 son similares a las de 15 °C con ambas dietas, pero a 23 °C con dieta pulverizada se observa la mayor diferencia, con un valor de la SDAm superior a los 800 mg O_2 kg^{-1} h^{-1} y de 600 mg O_2 kg^{-1} $h^{-}1$ con la dieta particulada (Figura 13). Las VO_2 en los distintos estados metabólicos aumentan con el incremento en la temperatura de 15 a 18 °C, en contraste, a 23 °C con la dieta particulada, las tasas son similares aunque con una enorme variación de los datos durante la SDAm, a las observadas a 15 °C.

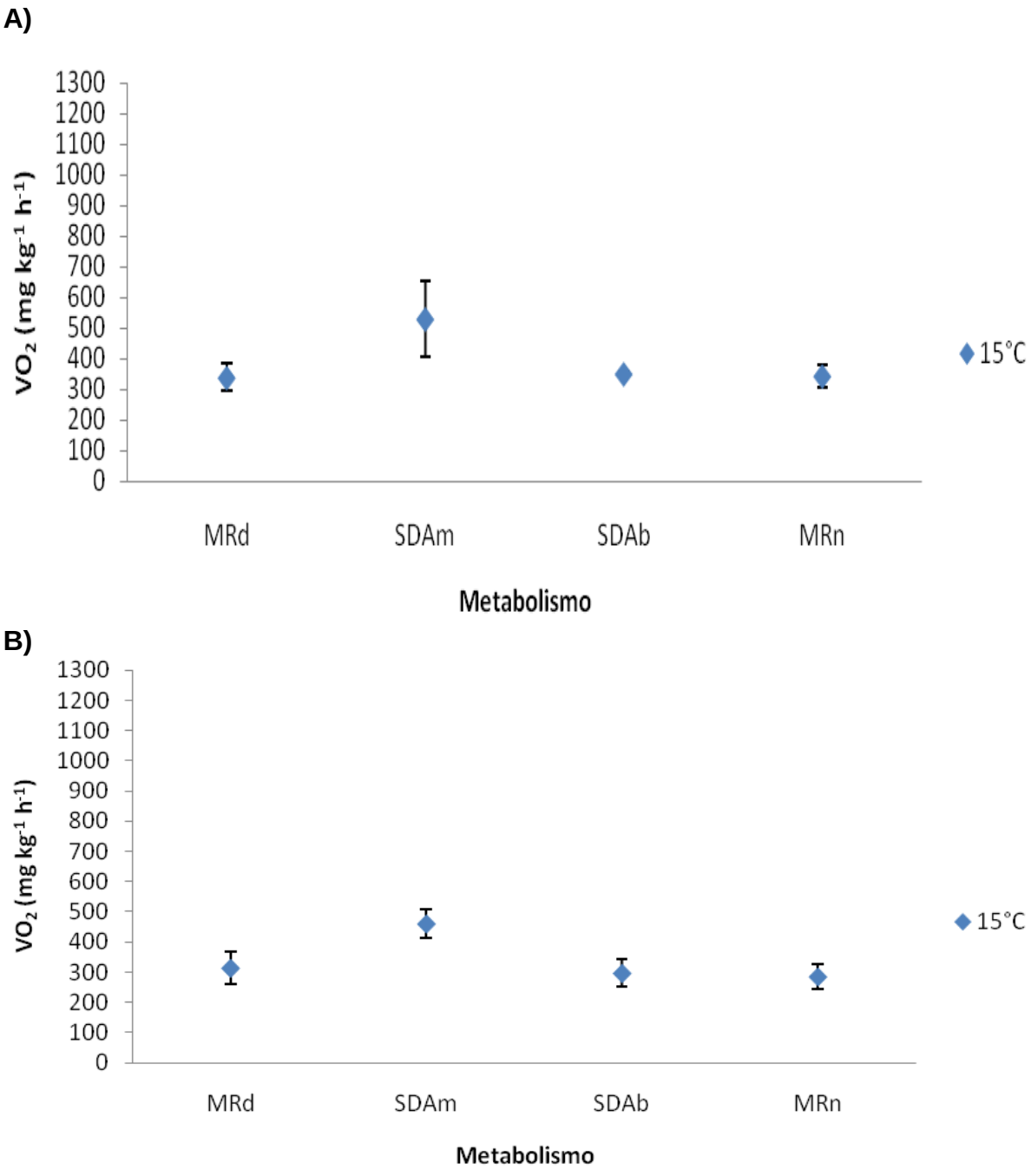


Figura 11. Tasas de consumo de oxígeno de rutina (media±desviación estándar) durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a 15 °C y alimentada con una dieta comercial particulada (A) y pulverizada (B).

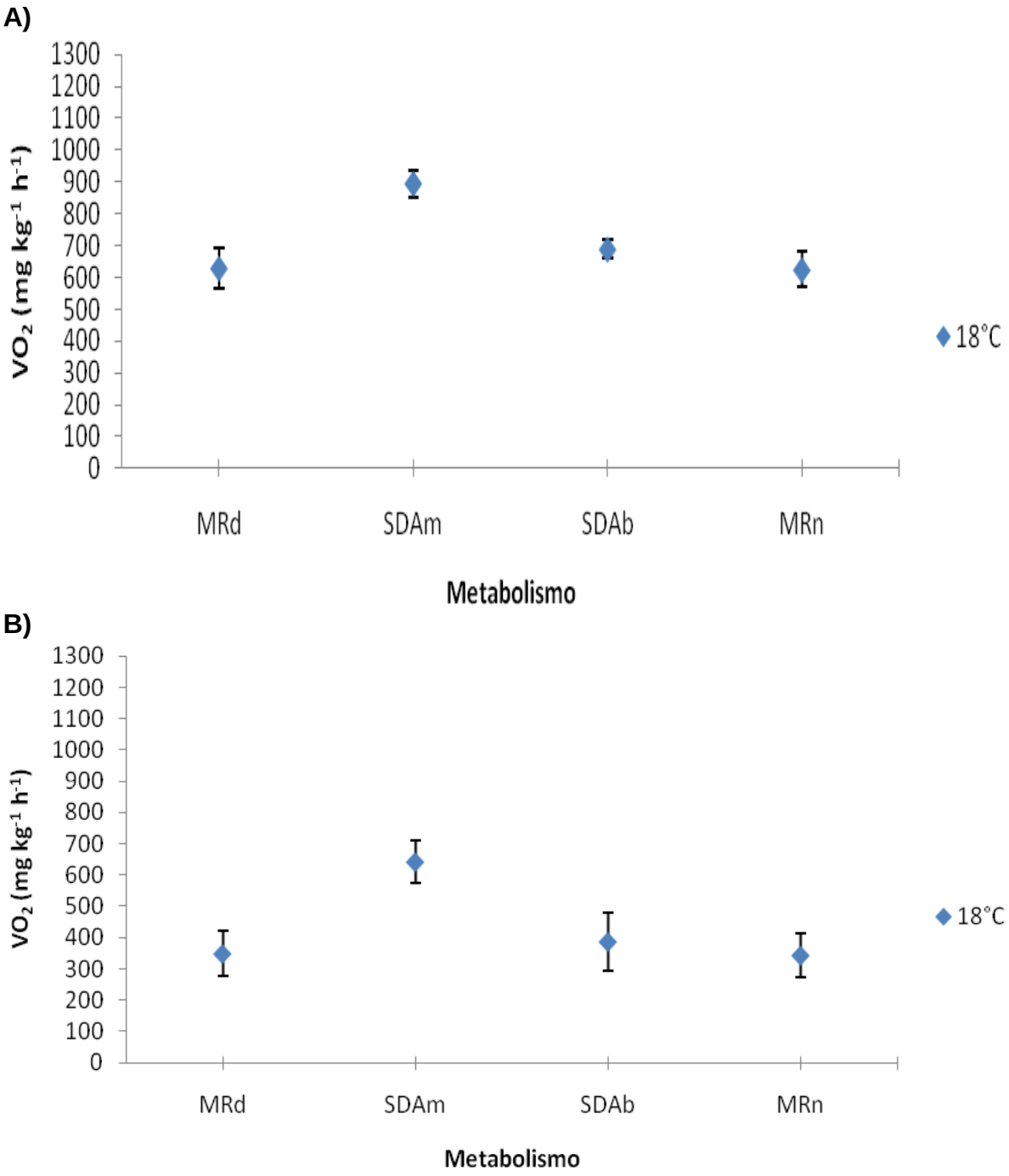


Figura 12. Tasas de consumo de oxígeno de rutina (media±desviación estándar)durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a 18 °C y alimentada con una dieta comercial particulada (A) y pulverizada (B).

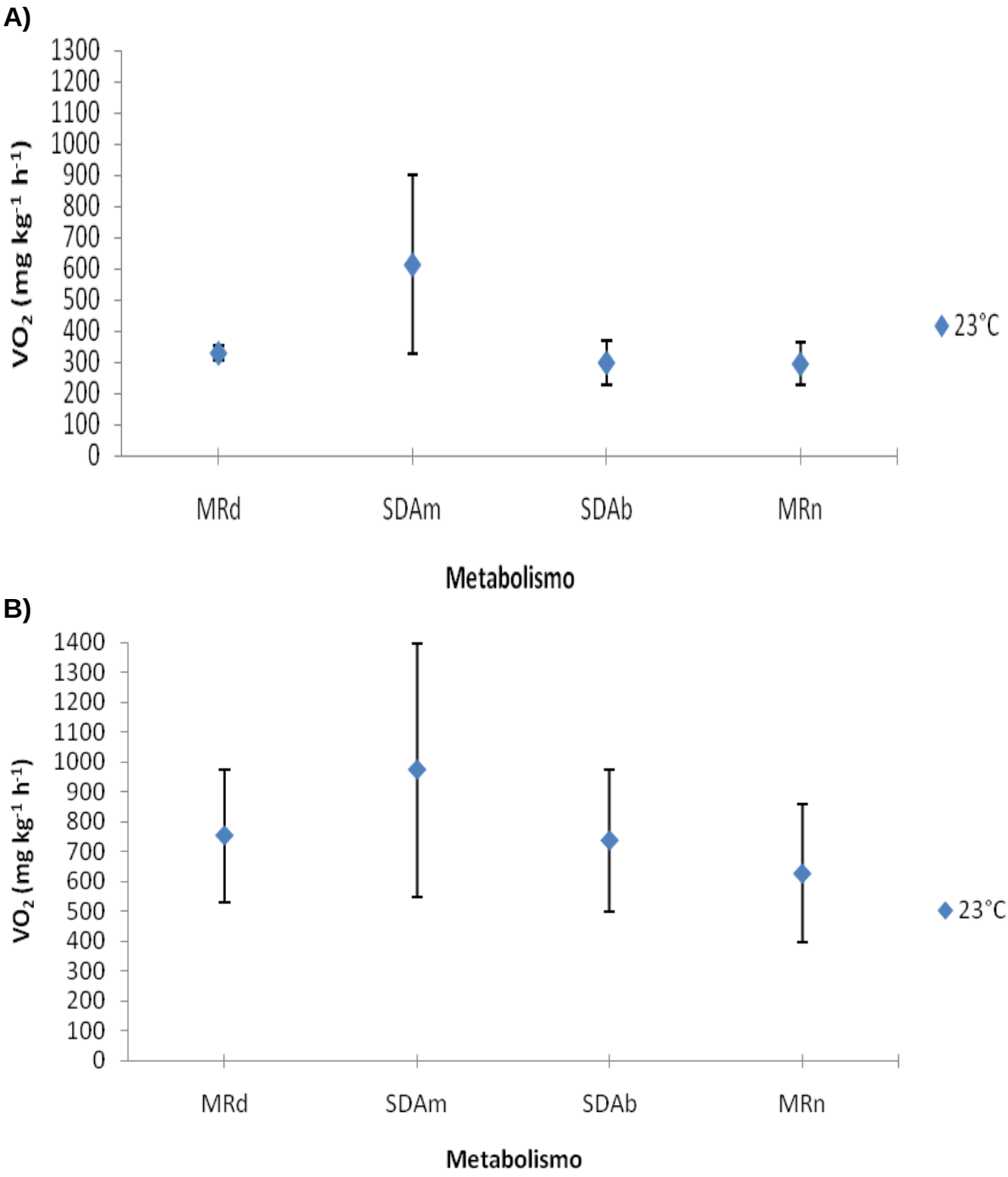


Figura 13. Tasas de consumo de oxígeno de rutina (media±desviación estándar) durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a 23 °C y alimentada con una dieta comercial particulada (A) y pulverizada (B).

Las tasas de consumo de oxígeno de las sardinas alimentadas con alimento pulverizado siguen una tendencia lineal en relación directa con el incremento en la temperatura de aclimatación y de manera similar a lo observado con la dieta particulada, la diferencia entre la VO_2 de la SDAm y la MR diurna o nocturna se incrementa un 42, 43 y 90% en relación directa con el incremento en la temperatura (Figura 14).

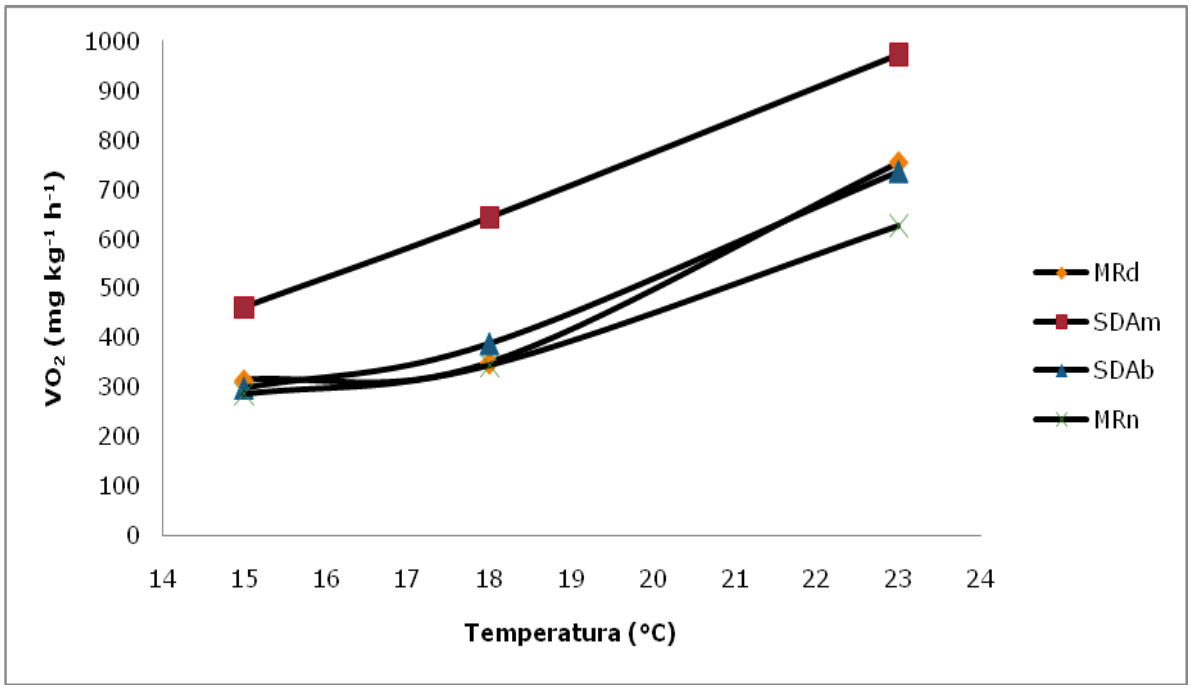


Fig. 14. Tasas de consumo de oxígeno de rutina durante el día y la noche (MRd y MRn respectivamente), acción dinámica específica relacionada con la captura de alimento (SDAm) y acción dinámica específica relacionada con procesos bioquímicos (SDAb) de la sardina de la Corriente de California aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta comercial pulverizada.

Las tasas de consumo de oxígeno de las sardinas alimentadas con ambos tipos de alimento a las tres temperaturas durante el SDAm tienen diferencias significativas con una $p<0.05$, las diferencias se originan a 18 °C.

Donde se observaron diferencias muy significativas con una $p<0.01$, fue en las tasas de consumo de oxígeno durante SDAb a 18 y 23 °C producido por el alimento como por la temperatura. Las mayores diferencias en las VO_2 se observaron en las sardinas aclimatadas a 23 °C y alimentadas con los dos tamaños de alimento

VI. 3. Histología de hígado y riñón.

En las preparaciones histológicas de los cortes transversales de hígado de *Sardinops caeruleus*, se manifestaron alteraciones estructurales que fueron de menor a mayor grado en relación directa con el incremento en la temperatura de aclimatación a la que fueron expuestas las sardinas. Los arreglos celulares característicos del hígado son los cordones hepáticos, las células sanguíneas y los sinusoides. En los tejidos de las sardinas aclimatadas a 15 °C y alimentados con dieta particulada, se observó el arreglo normal de los cordones hepáticos, es decir, la presencia de pocas células sanguíneas y sinusoides de un tamaño normal (Figura 16-B). En las preparaciones de los organismos alimentados con la dieta en polvo y en las mismas estructuras mencionadas anteriormente, no hubo ningún cambio visible (Figura 16-A), estas preparaciones histológicas se observaron a 400x. En la Figura 17 se indican las mismas estructuras solo que a 1000x se corrobora que no hay cambios visibles.

En los tejidos de los organismos aclimatados a 18 °C y alimentados con la dieta particulada, se encontró una mayor cantidad de células sanguíneas y aunque no hay diferencias estadísticas entre la cantidad de hepatocitos ($p<0.01$) existe la tendencia a disminuir numéricamente en relación con la temperatura (Figura 15). Se observó un aumento en el diámetro de los sinusoides de los organismos alimentados con la dieta en polvo (Figura 18-A), aquí la cantidad de hepatocitos fue mayor que en los organismos alimentados con la dieta particulada (Figura 18-

B), el diámetro de los sinusoides y la cantidad de las células sanguíneas aumentó comparado con 15 °C (Figura 16). Con una resolución mayor (1000x) se pudo corroborar con mayor precisión el aumento en el diámetro de los sinusoides, la disminución en la cantidad de hepatocitos y el incremento de células sanguíneas (Figura 19).

En las preparaciones de los organismos aclimatados a 23 °C que comieron ambos alimentos separadamente, el número de hepatocitos decreció, se encontraron más cantidad de células sanguíneas y el diámetro de los sinusoides aumentó (Figura 18-A y B). La observación de estos tejidos se hizo con una resolución de 1000x que corrobora las alteraciones descritas (Figura 18-C1 y 2).

El análisis comparativo de la densidad de los hepatocitos revelo que no hay diferencias entre los tejidos hepáticos de las sardinas expuestas a las diferentes combinaciones de temperatura y tamaño de partícula del alimento (Figura 15).

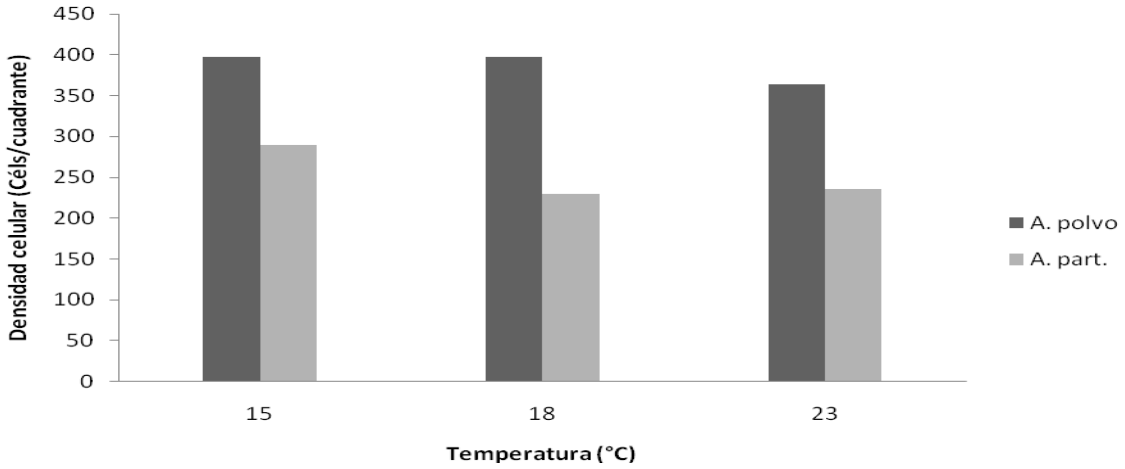


Figura 15. Densidad de hepatocitos en cortes histológicos del hígado de la sardina de la Corriente de California aclimatada a tres temperaturas y alimentada con dos dietas de diferente tamaño de partícula. Un cuadrante corresponde a una superficie de 0.0276 mm^2

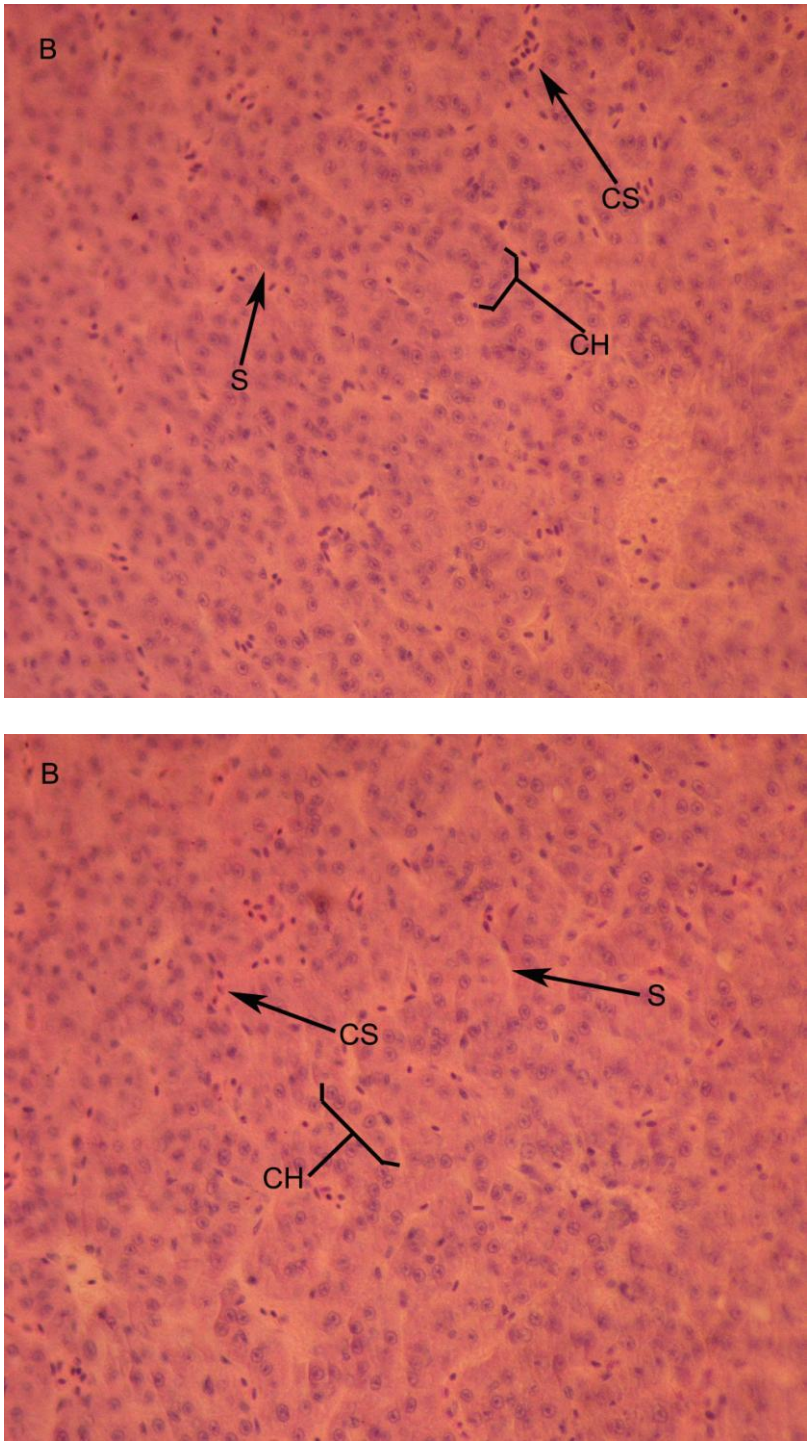


Figura 16. Corte transversal del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 15 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A) Sardinas alimentadas con la dieta pulverizada, 400x B) Sardinas alimentadas con la dieta particulada, 400x. Cordones hepáticos (CH), células sanguíneas (CS), sinusodes (S).

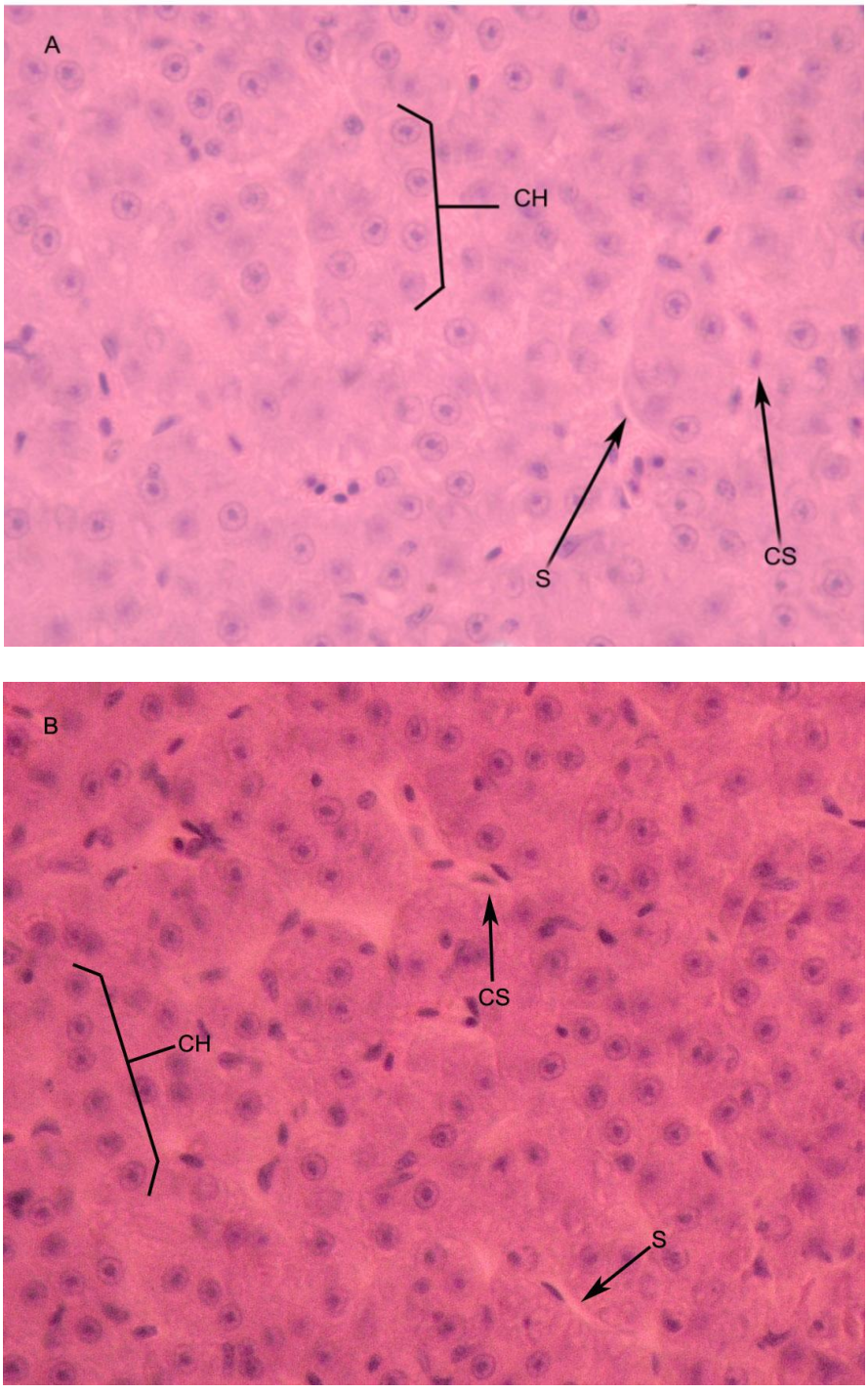


Figura 17. Corte transversal del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 15 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A) Sardinas alimentadas con la dieta pulverizada, 1000x B) Sardinas alimentadas con la dieta particulada, 1000x. Cordones hepáticos (CH), células sanguíneas (CS), sinusodes (S).

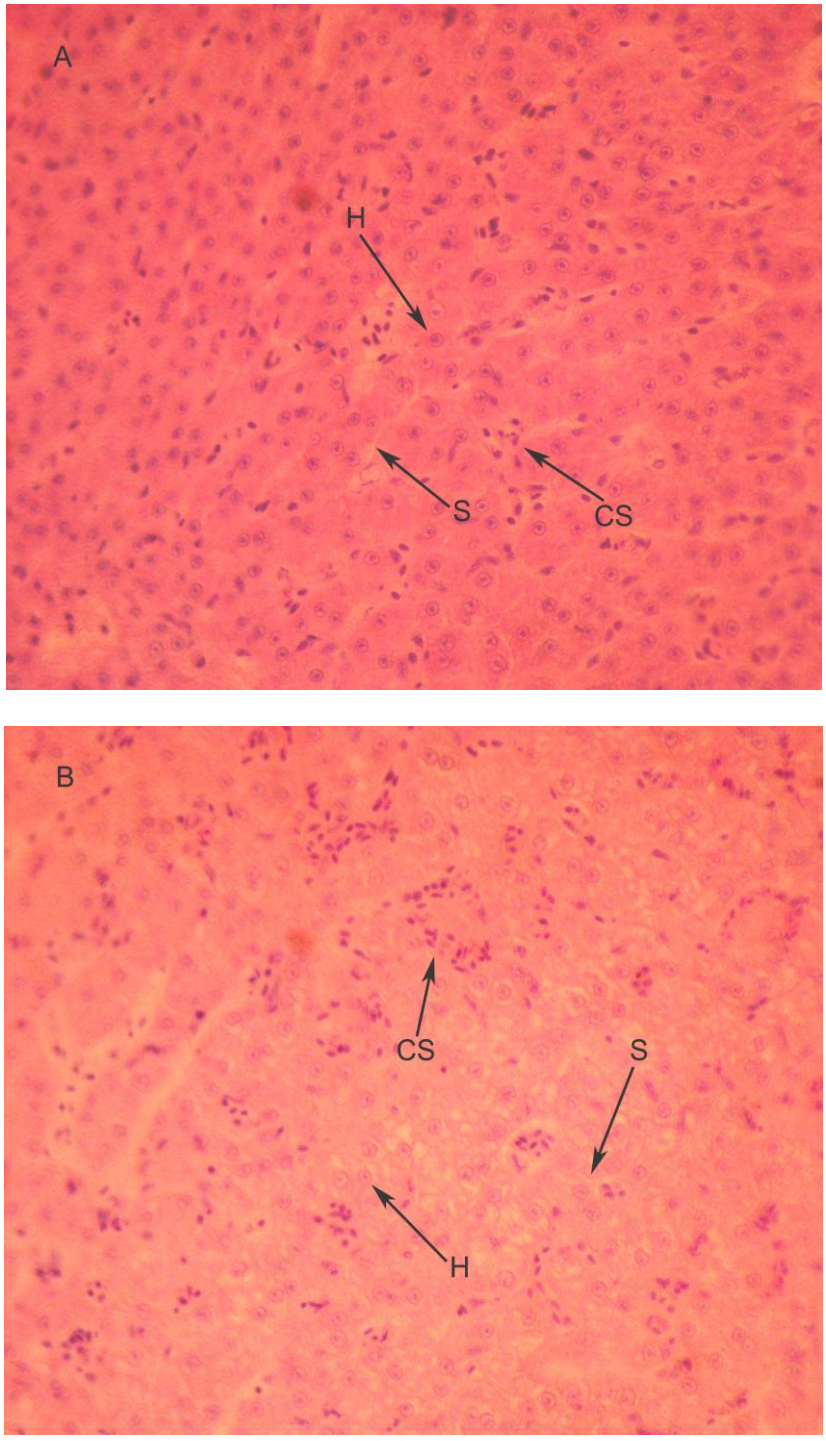


Figura 18. Corte transversal del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 18 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A) Sardinas alimentadas con la dieta pulverizada, 400x B) Sardinas alimentadas con la dieta particulada, 400x. hepatocitos (H), células sanguíneas (CS), sinusoides (S).

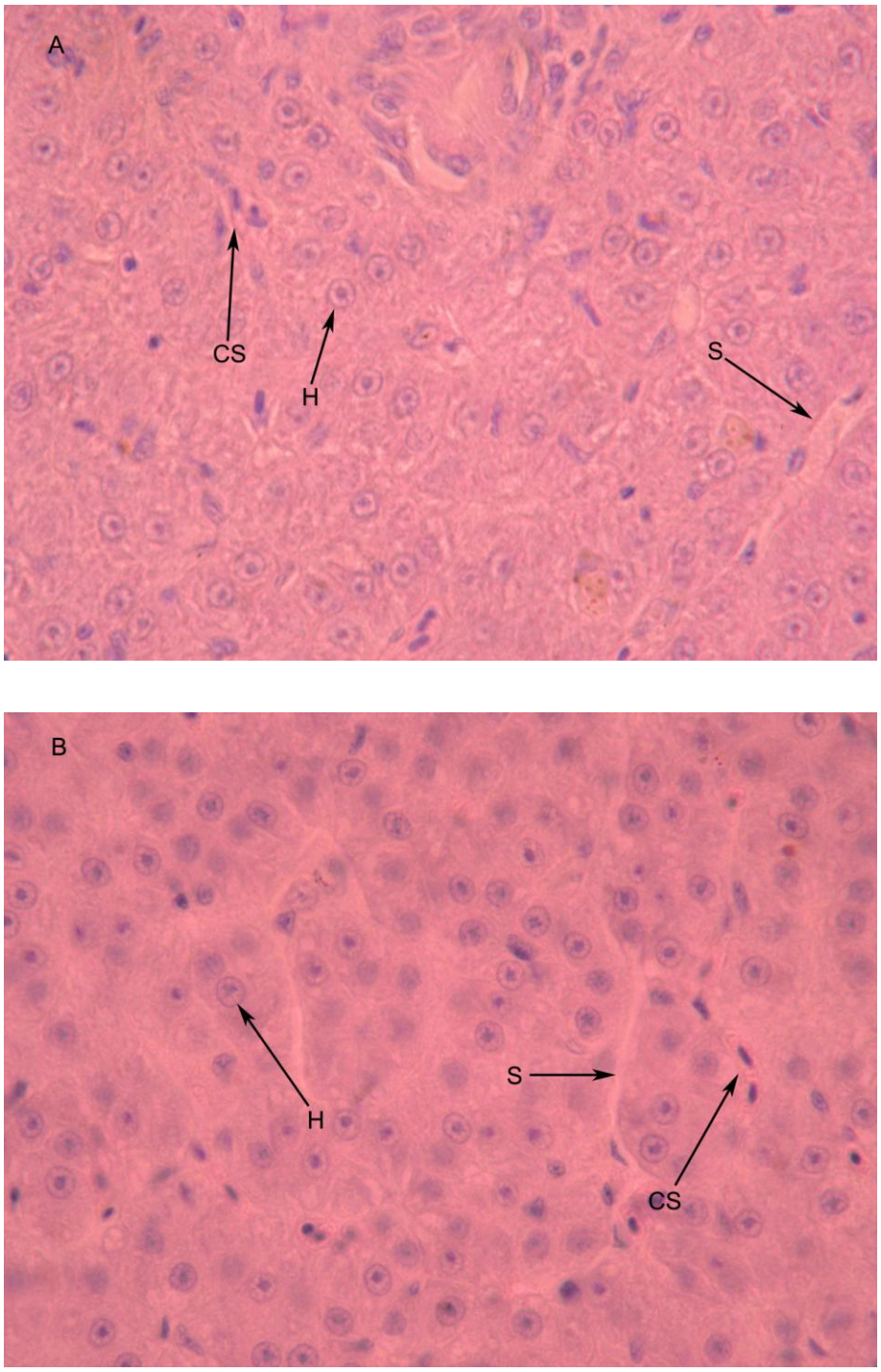


Figura 19. Corte transversal del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 18 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A) Sardinas alimentadas con la dieta pulverizada, 1000x B) Sardinas alimentadas con la dieta particulada, 1000x. hepatocitos (H), células sanguíneas (CS), sinusoides (S).

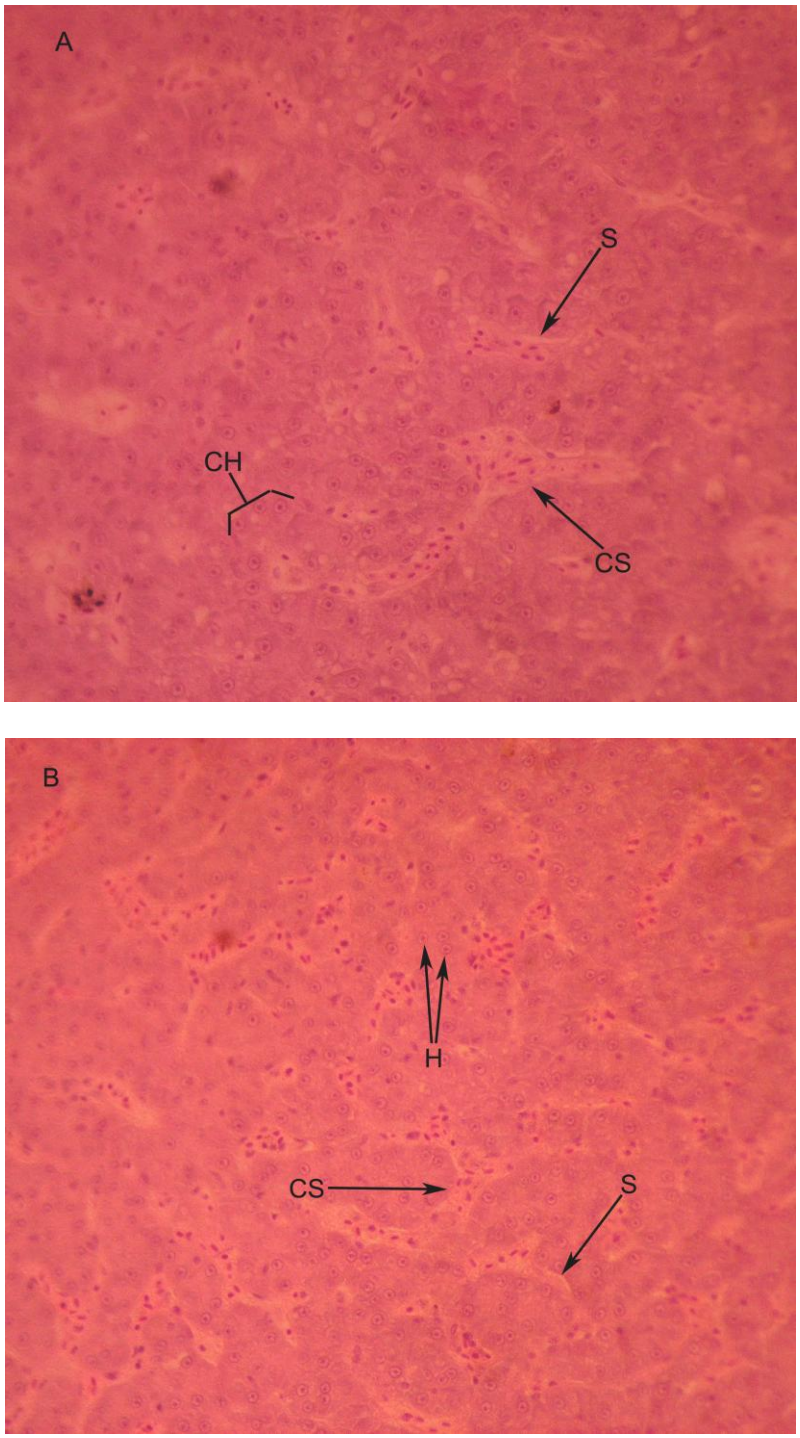


Figura 20. Corte transversal de hígado de *Sardinops caeruleus,* aclimatada a 23 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A y B) Sardinas alimentadas con una dieta pulverizada y particulada respectivamente, 400x. Disminución de hepatocitos (H); células sanguíneas (CS); aumento del diámetro de los sinusoides (S)

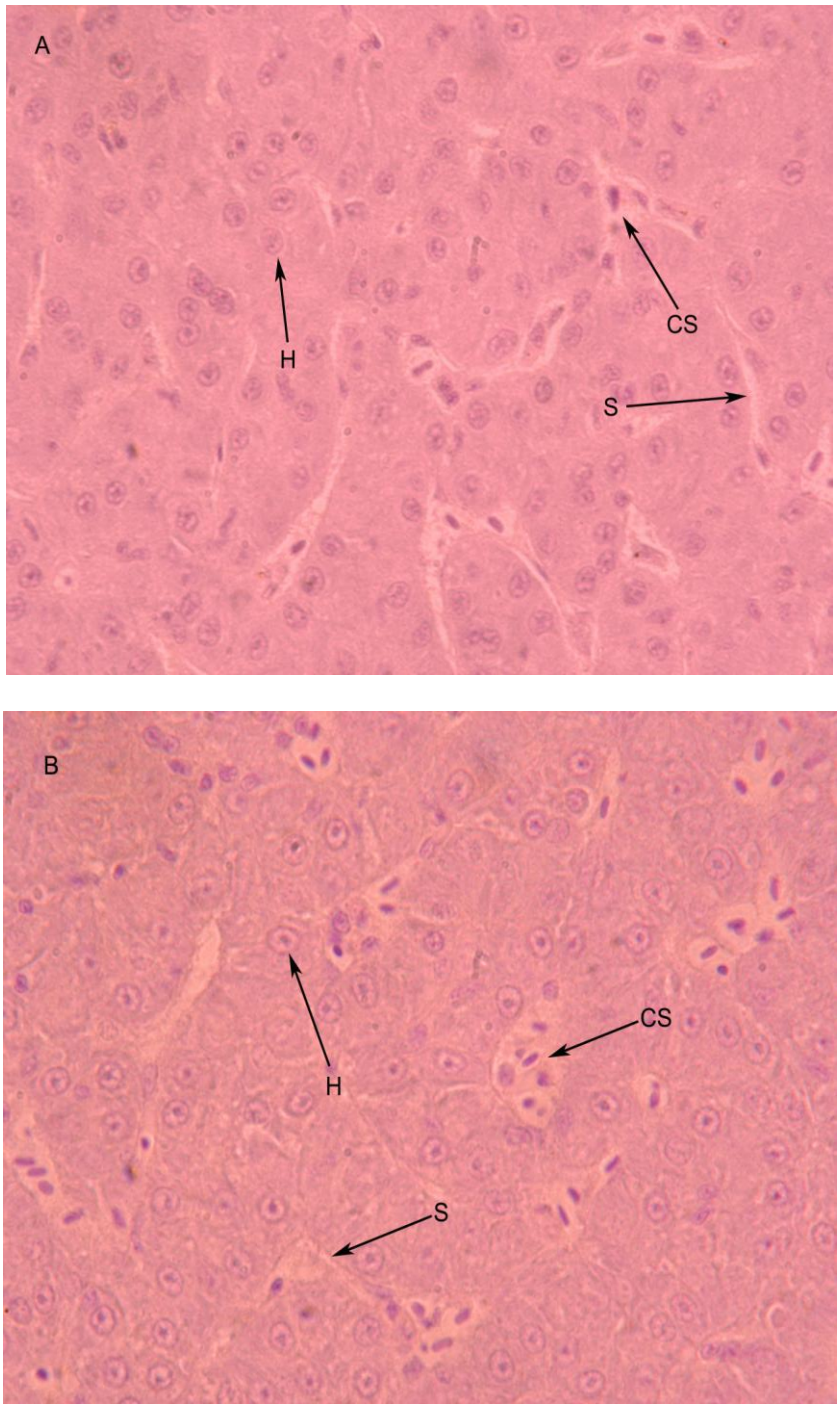


Figura 21. Corte transversal de hígado de Sardinops caeruleus, aclimatada a 23 °C. Tinción con hematoxilina-eosina. A y B) Sardinas alimentadas con una dieta en polvo y particulada respectivamente, 1000x. Disminución de hepatocitos (H); células sanguíneas (CS); aumento del diámetro de los sinusoides (S)

Para corroborar la disminución en el número de hepatocitos, se hizo un análisis de la densidad, contando el número de células por unidad de superficie (0.0276 mm^2) a 400x. Se cuantificó una menor densidad en los cortes de hígado de las sardinas aclimatadas a 18 y 23 °C que comieron alimento particulado, de manera similar a 23 °C, con el alimento pulverizado también se cuantificó la menor densidad de hepatocitos (Tabla VI).

Tabla VI. Densidad de hepatocitos cuantificada en los cortes histológicos del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta de dos tamaños de partícula. La unidad de superficie analizada fue 0.0276 mm^2 (400x).

	Temperatura (°C)		
Alimento	**15**	**18**	**23**
Particulado (1000-1180 µm)	**290±58[a]**	**230±62[b]**	**235±57[a]**
Pulverizado (<500 µm)	**397±30[a]**	**397±128[a]**	**364±207[b]**

Una segunda cuantificación de la densidad celular a 1000x confirmó la disminución en el número de hepatocitos por unidad de superficie (0.0123 mm^2) en relación directa con el incremento de la temperatura de aclimatación, el número de hepatocitos fue menor a 23°C (Tabla VII).

Tabla VII. Densidad de hepatocitos cuantificada en los cortes histológicos del hígado de la sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus*, aclimatada a tres temperaturas y alimentada con una dieta de dos tamaños de partícula. La unidad de superficie analizada fue 0.0123 mm^2 (1000x).

Temperatura (°C)	Alimento	
	Particulado (1000-1180µm)	Pulverizado (<500µm)
15	101±9	114±12
18	83±6	90±4
23	70±4	88±5

Al analizar los diámetros celulares y nucleares de los hepatocitos (Tabla VIII), se encontraron diferencias significativas en los diámetros celulares ($p<0.05$), que reflejan el tipo de alimento que consumieron los peces. Estas diferencias se observan en el alimento pulverizado a 18 y 23 °C. De manera similar y con diferencias muy significativas ($p<0.01$) el diámetro nuclear de los hepatocitos es afectado por el alimento que ingieren los peces.

Tabla VIII. Medidas del diámetro celular (µm) de los hepatocitos de la sardina *Sardinops caeruleus,* aclimatada a tres temperaturas y alimentadas con dos dietas de diferente tamaño de partícula.

	Temperatura (°C)*		
Alimento	**15**	**18**	**23**
Particulado	1.94±0.22^a	2.03±0.26^a	1.93±0.23^a
Pulverizado	1.83±0.23^a	1.74±0.23^b	1.76±0.23^b

* Las letras indican diferencias entre las temperaturas para cada tipo de alimento.

Tabla IX. Medidas del diámetro nuclear (µm) de los hepatocitos de la sardina *Sardinops caeruleus,* aclimatada a tres temperaturas y alimentadas con dos dietas de diferente tamaño de partícula.

	Temperatura (°C)		
Alimento*	**15**	**18**	**23**
Particulado	0.99±0.12[a]	0.99±0.09 [a]	0.91±0.08 [a]
Pulverizado	0.88±0.07 [b]	0.88±0.08[b]	0.84±0.11[b]

* Las letras indican diferencias entre las medidas del diámetro nuclear entre alimentos

El riñón de los peces se puede dividir en tres regiones, la región cefálica, que tiene principalmente tejido hematopoyético y linfoide, la parte media, donde se localizan los corpúsculos renales o de Malpighi, y la zona caudal, donde se encuentran más tubos renales y menor cantidad de tejido linfoide y tejido intersticial hematopoyético. Los corpúsculos de Malpighi están formados por el glomérulo renal o de Malpighi, que a su vez está constituido por capilares rodeados de una membrana que los envuelve y que se conoce como Cápsula de Bowman, cuya estructura es una membrana delgada formada por epitelio plano.

Las alteraciones en el tejido renal de la sardina son las siguientes:

1. Normal, la organización anatómica del glomérulo de Malpighi está bien definida, la capsula de Bowman está completa, bien definida y uniformemente delgada, con el espacio intraglomerular (distancia entre la cápsula de Bowman y el glomérulo) reducido y se observan pocos centros melanomacrófagos (Figura 22).

2. Daño moderado, existe un incremento en el espacio intraglomerular y un engrosamiento en algunas partes de la cápsula de Bowman y también aumenta el número de centros melanomacrófagos (Figura 23).

3. Daño agudo, se incrementa el tamaño del espacio intraglomerular, la cápsula de Bowman pierde su forma y se observa un mayor engrosamiento en la mayor parte de la cápsula y los centros melanomacrófagos aumentan (Figura 24).

VI. 4. Análisis calórico del hígado y del músculo.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la temperatura y del tamaño de las partículas del alimento (a través de la conducta natatoria de los peces relacionada con el tamaño del alimento) sobre el contenido de energía del hígado y del riñón (glucógeno en el hígado y proteínas en el músculo), se analizaron dos tejidos que responden directamente a las exigencias metabólicas reduciendo sus almacenes de energía. Al cuantificar el contenido total de energía no se encontraron diferencias estadísticas entre los contenidos de las calorías del hígado en las sardinas aclimatadas a las diferentes temperaturas (Tabla XI).

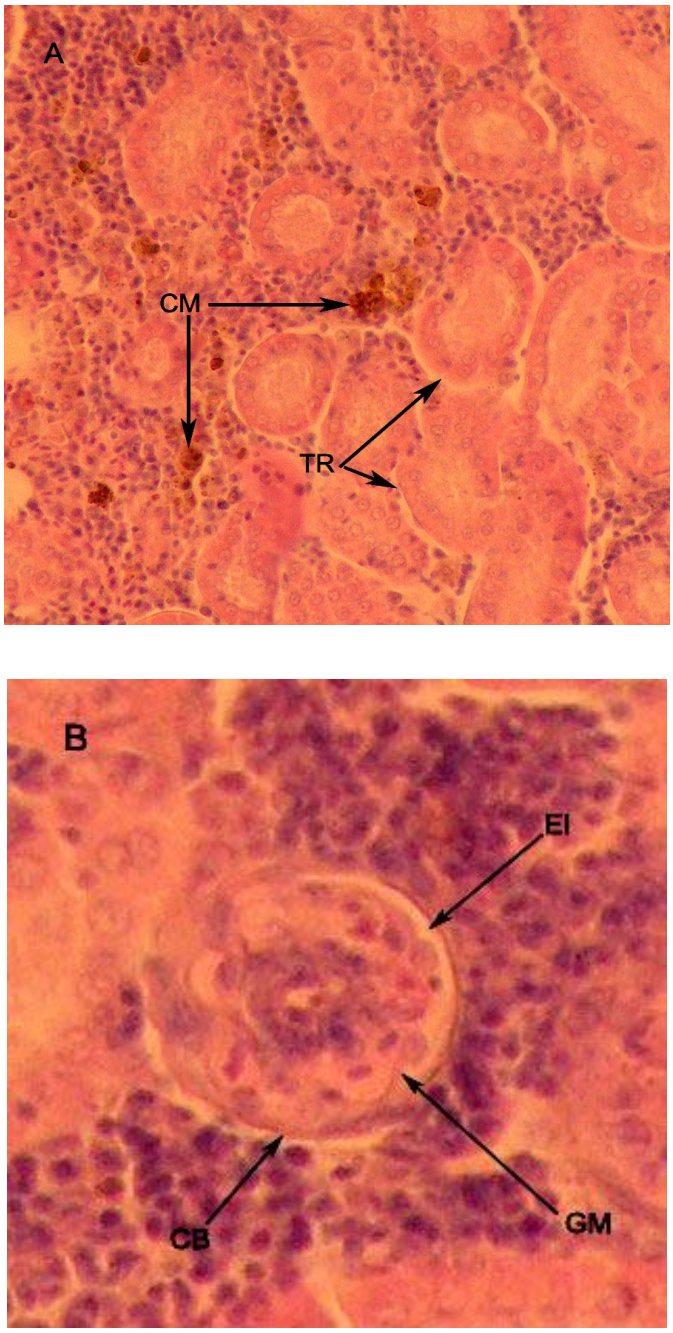


Figura 22. Corte transversal de riñón de sardina de la Corriente de California *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 15 °C (condición normal del tejido), donde se observan las distintas organizaciones del riñón. A) centros melanomacrófagos (CM), túbulos renales (TR). Las observaciones se hicieron a 400x. B) cápsula de Bowman (CB), espacio intraglomerular normal (EI), glomérulo de Malpighi (GM), Tinción con hematoxilina-eosina. Las observaciones se hicieron a 1000x.

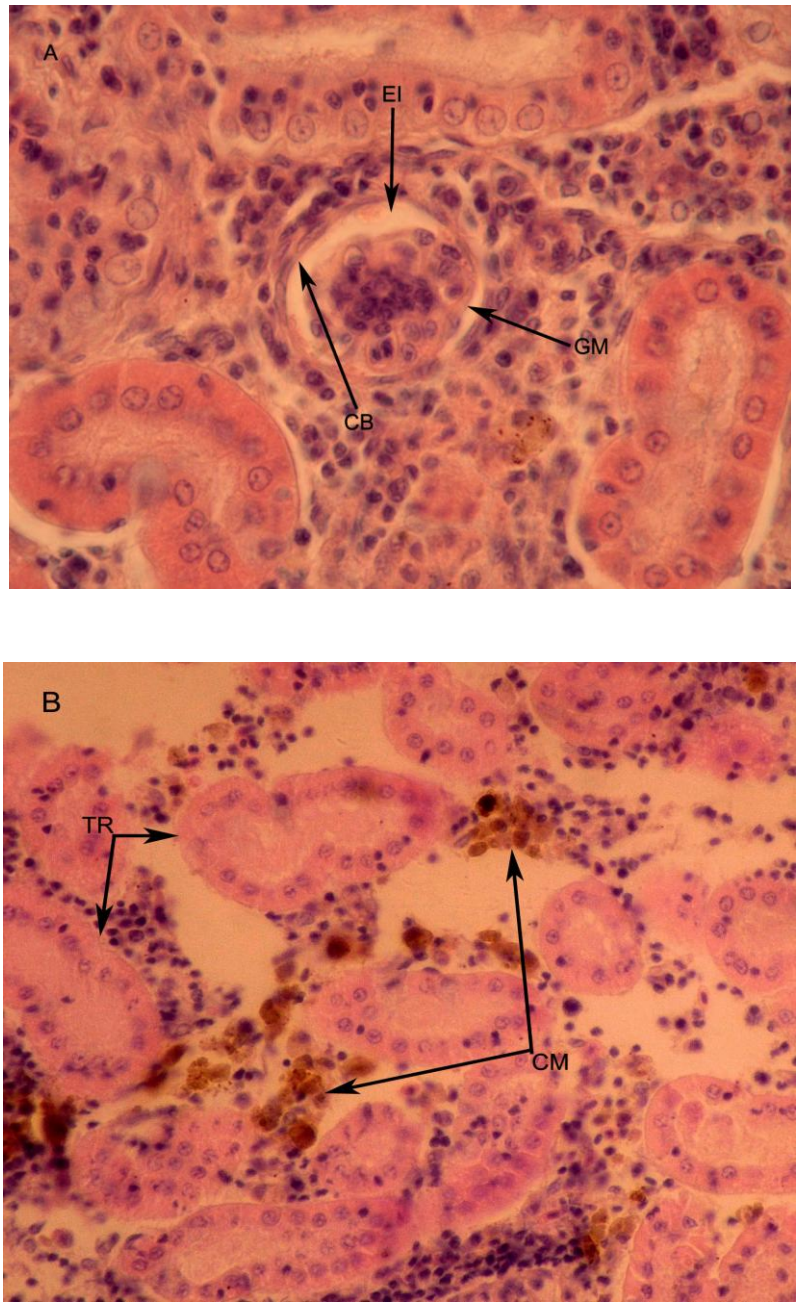


Figura 23. Corte transversal de riñón de la sardina de la Corriente de California *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 18 °C. A) Se observa el incremento en el espacio intralomerular. B) Túbulos renales, incremento en el número de centros melanomacrófagos. Glomérulo (GM), espacio intraglomerular (EI), cápsula de Bowman (CB), túbulo renal (TR), centros melanomacrófagos (CM). Tinción con hematoxilina-eosina. Las observaciones se hicieron a 400x.

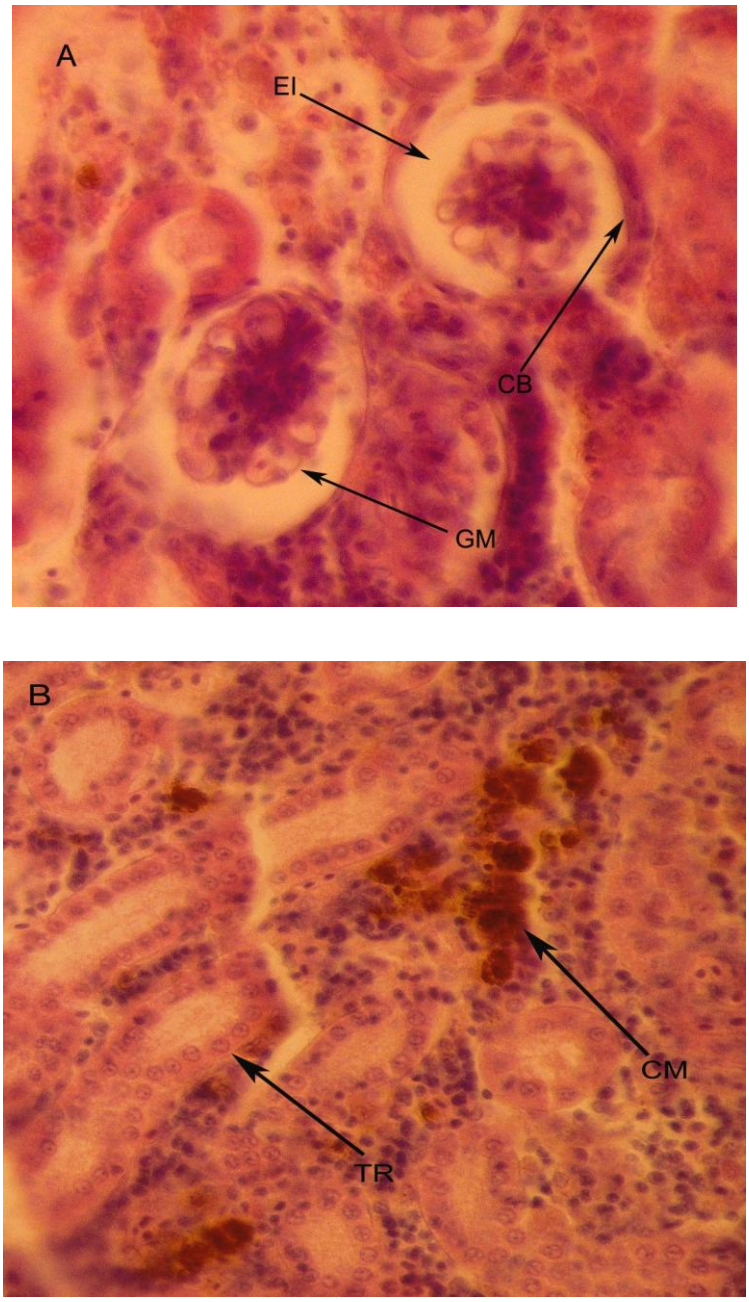


Figura 24. Corte transversal de riñón de la sardina de la Corriente de California *Sardinops caeruleus*, aclimatada a 23 °C. A) Corpúsculos renales donde se observa el aumento del espacio intraglomerular. Las observaciones se hicieron a 1000x. B) Túbulos renales, incremento del número de centros melanomacrófagos. Túbulos renales (TR), Glomérulo (GM), espacio intraglomerular (EI), cápsula de Bowman (CB), centros melanomacrófagos (CM). Tinción con hematoxilina-eosina. Las observaciones se hicieron a 400x.

Tabla X. Clasificación de las alteraciones en el tejido renal de la Sardina de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus* aclimatada a 15, 18 y 23 °C. Glomérulo (GM), Cápsula de Bowman (CB).

Estructura		Temperatura en °C		
		15	18	23
Corpúsculos renales	Glomérulo	Normal	Normal	Normal
	Cápsula de Bowman	Normal	Daño moderado	Daño agudo
	Espacio Intraglomerular	Normal	Daño moderado	Daño agudo
Túbulos renales		Normales	Normales	Normales
Centros melanomacrófagos		Poca incidencia	Daño moderado	Daño agudo

Tabla XI. Promedios del contenido calórico (cal/g) (media±desviación estándar) de hígado (H) y músculo blanco (MB) de sardinas, *Sardinops caeruleus*, aclimatadas a tres temperaturas y con dos tamaños de alimento.

	Temperatura (°C)					
Tejido	15		18		23	
	A. part.	A. pulv.	A. part.	A. pulv.	A. part.	A. pulv.
H	5.7±0.4	5.8±0.4	5.4±0.3	5.7±0.2	5.5±0.4	5.7±0.4
MB	5.2±0.2	5.2±0.1	5.2±0.2	5.2±0.2	4.9±0.1	5.4±0.2

VI. 5. Cortisol

La concentración de cortisol disminuyó en relación inversa con respecto al incremento de la temperatura, sin embargo estadísticamente no se observan diferencias ($p>0.05$) (Tabla XII).

Tabla XII. Concentraciones de cortisol en el plasma (media±desviación estándar) de las sardinas de la Corriente de California, *Sardinops caeruleus,* aclimatadas a tres temperaturas y alimentadas con dos tamaños de partícula.

	Temperatura (°C)		
Alimento	**15**	**18**	**23**
Particulado	1.93±1.3	1.18±0.1	0.97±1.2
Pulverizado	1.44±1	1.86±0.6	0.61±0.2

Las concentraciones de cortisol en el plasma de las sardinas aclimatadas a 23 °C que fueron alimentadas con ambas dietas resultaron menores en comparación con las obtenidas a 15 y 18 °C. Las concentraciones de cortisol a 15 °C fueron más altas con la dieta particulada en comparación con la dieta en polvo, a diferencia de las obtenidas a 18 °C, donde las concentraciones fueron mayores se obtuvieron de las sardinas alimentadas con la dieta en polvo. A 23 °C la concentración de cortisol fue similar con ambas dietas (Figura 25).

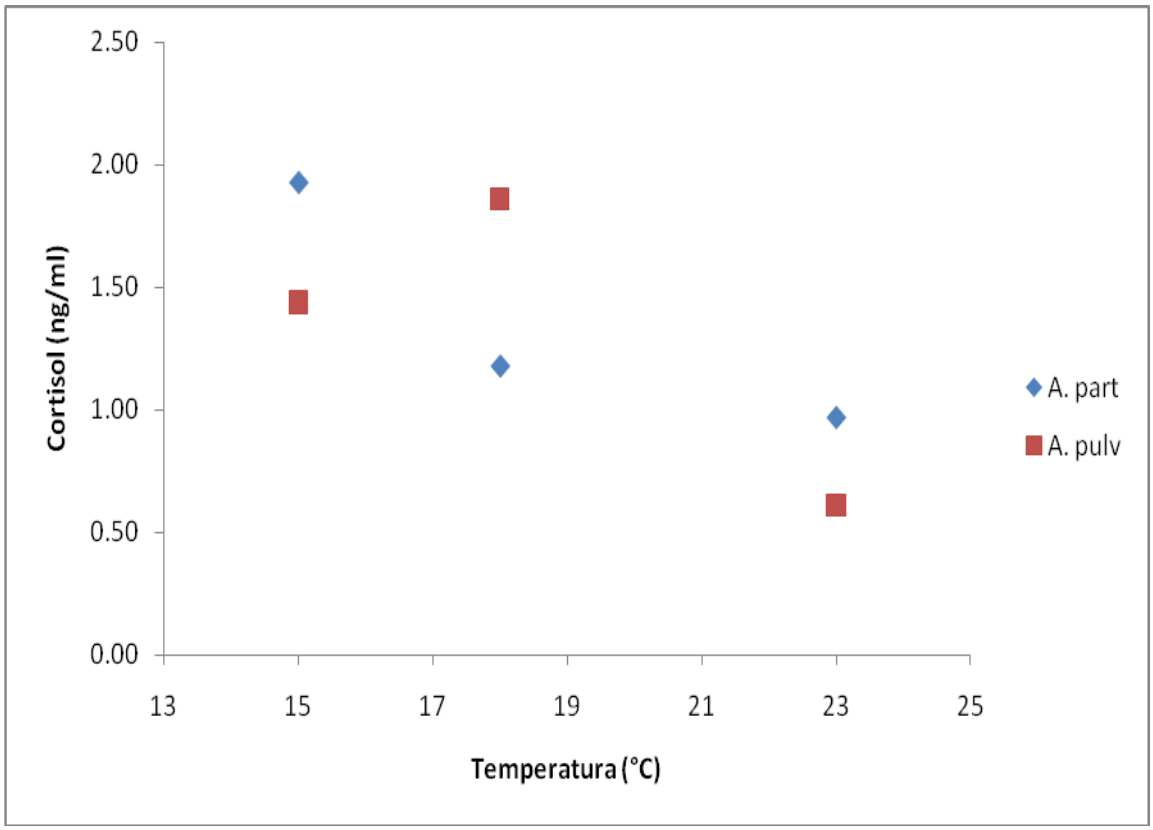


Figura 25. Concentraciones de cortisol en plasma de las sardinas de la Corriente de California *Sardinops caeruleus* aclimatadas a tres temperaturas y alimentadas con dos tamaños de partícula.

Capítulo VII

DISCUSIÓN

La distribución de la sardina de la corriente de California está relacionada con el comportamiento migratorio y con el tamaño de la población. En este sentido se ha propuesto la existencia de tres grupos de sardinas a lo largo de la costa occidental de Baja California, Félix-Uraga *et al* (2004) identificó un grupo en aguas cálidas, otro de agua templadas y uno de aguas frías, de acuerdo con esta clasificación, las sardinas que se utilizaron en este trabajo fueron organismos juveniles cuyo origen se remonta a los desoves que ocurrieron entre abril y mayo del año anterior, ya que de acuerdo con su tasa de crecimiento, la longitud al final del primer año de vida es de 115 mm (COSEWIC, 2002). Es posible que los progenitores de este grupo de sardinas juveniles pertenecieran al grupo de sardinas de aguas frías y que se encuentran frente a las costas de Baja California, al norte de ensenada. Estas sardinas permanecen cerca de la costa, tal vez debido a que aun no están en condiciones de integrarse a la población de adultos.

Los resultados de la sobrevivencia y las alteraciones de los tejidos hepático y renal indican que estas sardinas se adaptan mejor a temperaturas bajas (15 y 18°C), ya que a 23 °C se observó una mayor mortalidad y susceptibilidad a enfermedades, así como daños en el riñón e hígado.

Múltiples factores influyen en las respuestas fisiológicas y aunque su magnitud puede ser interpretada como un indicador del estímulo estresor, las respuestas, en sus diferentes niveles de organización dependen mucho de la capacidad de cada

individuo o de una especie en particular (Pankhurst y Van Der Kraak, 2000). Diferentes estímulos pueden generar diferentes respuestas en los órganos dedicados a mantener la homeostasis. El Síndrome de Adaptación General (GAS en inglés) es polimórfico y puede ser modificado por distintas condiciones externas como la temperatura, que modifica los niveles de cortisol, de la prolactina o de la hormona tiroidea (Flores, 2002; Barabdica and Tort, 2008). El GAS tiene distintas etapas según la duración del agente estresor: a) reacción de alarma inicial, b) fase de resistencia, y c) fase de agotamiento (Selye, 1955).

En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura y el tamaño del alimento sobre las diferentes respuestas fisiológicas y órganos blanco de estrés en la sardina *Sardinops caeruleus*. El mayor porcentaje de mortalidad se observó en las sardinas expuestas a 23° C por un periodo de un mes, en algunos experimentos se registró hasta el 100% de mortalidad. En consecuencia un segundo grupo de sardinas se aclimataron a las mismas condiciones y se alimentaron con una dieta particulada donde la mortalidad fue del 67%, en contraste, en las sardinas alimentadas con la dieta pulverizada la mortalidad fue del 91%. La alta mortalidad puede estar relacionada con una interacción entre la temperatura y el tamaño del alimento, ya que como se pudo observar en este trabajo, a 15 y 18 °C la mayor tasa de mortalidad se produjo en las sardinas que ingirieron el alimento particulado. Aunque la causa final de la muerte de las sardinas puede estar ligada a un incremento en la susceptibilidad a las enfermedades, tal como lo explica el GAS. La imposibilidad de alcanzar la homeostasis en el mediano plazo, se traduce en la incidencia de daños en diferentes órganos, además del hígado y el riñón, en el opérculo, boca y aleta caudal, los cuales pueden estar relacionados con infecciones bacterianas.

Aún cuando se ha descrito que las sardinas adultas tienen un amplio rango de tolerancia a la temperatura (Félix-Uraga, 2004), en este trabajo se observó que las sardinas juveniles aclimatadas a 15 y 18°C tienen una mayor sobrevivencia que

las que experimentaron 23 °C. Es posible que a 23°C el alimento pulverizado sea una limitante para los juveniles de sardina. Se ha descrito que cuando las sardinas se encuentran en los estanques de mantenimiento durante meses (de aproximadamente de dos metros de diámetro y de 7 m^3), la mortalidad es muy baja. Posiblemente el tamaño de los estanques donde se aclimataron las sardinas (93, 63 cm de diámetro mayor y menor respectivamente) fue una limitante, pudieron ser muy pequeños y esto causó estrés a las sardinas haciéndolas más susceptibles a enfermedades y por lo tanto a una mayor mortalidad.

Las sardinas tienen dos formas de alimentarse, una es filtrando partículas pequeñas (de hasta 1230 µm, según Lingen, 1994) y la otra capturando las partículas de mayor tamaño. En etapas tempranas del desarrollo de los peces, la forma de alimentación más dominante es por filtración, sin embargo ésta, está influenciada por el tamaño y por la concentración de las partículas (Gibson y Ezzi, 1990). En el presente trabajo se pudo comprobar que en las sardinas juveniles, la alimentación por filtración fue la más efectiva para el tipo de alimento que se les proporcionó, esto se contrastó con la cantidad de alimento particulado no ingerido que se encontró en el fondo de los estanques. Aparentemente, es más fácil para las sardinas capturar el alimento pulverizado, cuando se desplaza por el estanque con la boca abierta. Este resultado puede ser una consecuencia del tiempo que el alimento pulverizado permanecía en la columna del agua a diferencia del alimento particulado, el cual rápidamente se iba al fondo del estanque. Lingen (1994) evaluó el efecto del tamaño y la concentración de las partículas de alimento en la conducta de alimentación de sardinas adultas *Sardinops sagax* de la corriente de Benguela y observó que la forma de alimentación, ya sea por filtración o por captura de partículas, depende del tamaño de la partícula, de la concentración y del coste energético asociado con cada modo de alimentación. Cuando los peces son grandes y las presas son pequeñas y en altas concentraciones y la intensidad de la luz es baja, el modo de alimentación es por filtración. Cuando el pez es pequeño y las presas son grandes pero en bajas concentraciones y hay suficiente

luz, el modo de alimentación es por captura de partículas (Lingen, 1994). En sus experimentos, Lingen suministro zooplancton de tres clases de tamaño: grande (>900 µm), mediano (>500 µm) y chico (>200 µm) en diferentes concentraciones y concluyó que el tipo de alimentación dominante es por filtración. James y Findlay (1989) concluyeron que para la anchoveta, la alimentación por filtración es más cara energéticamente que la particulada, como el resultado de la forma del cuerpo y del incremento del gasto de energía asociado con el movimiento del opérculo durante la filtración del alimento. El incremento de la actividad metabólica asociada con la alimentación es consecuencia de la digestión, que reduce la capacidad aeróbica para nadar y que está relacionado con la cantidad y tipo de alimento en el tracto digestivo (Beamish, 1984).

En este trabajo las sardinas alimentadas con el alimento pulverizado y aclimatadas a 15 y 18°C, alcanzaron la mayor longitud y peso, al igual que las sardinas alimentadas con el alimento particulado a 23 °C, esto puede significar que la alimentación por filtración resultó en una mayor ingestión de alimento, que se reflejó en el peso y longitud de las sardinas.

La comparación de la conducta y la tasa de alimentación entre varias especies de cupleidos es difícil debido a las diferencias entre las técnicas experimentales y analíticas usadas por diferentes investigadores. Sin embargo, la conducta de alimentación es similar en las especies analizadas. La duración de la conducta de microfiltración parece tener relación con la glándula epibranquial, que es el órgano responsable de la concentración de las partículas de alimento en los peces micrófagos. Las especies que carecen de las glándulas epibranquiales y que se alimentan por filtración lo hacen por periodos cortos, en contraste, los que poseen glándulas epibranquiaes pequeñas tienen la capacidad de filtrar por un periodo de duración intermedia en comparación con las especies que tienen una glándula bien desarrollada. El desarrollo de la glándula epibranquial en los clupeidos parece estar relacionado con el grado de microfagia y puede representar etapas

progresivas de adaptación para el uso de este recurso alimentario, desde especies facultativas a filtradoras obligadas. En la sardina, el tiempo de filtración abarca de 0.2 a 4.6 s, lo que implica un desarrollo importante de la glándula epibranquial y por lo tanto un alto grado de especialización hacia la microfagía. Lingen (1994) comparó sus resultados experimentales con los de otros cupleidos y concluyó que la sardina fue altamente eficiente al retener partículas pequeñas, aunque es capaz de utilizar ambos tipos de alimentación, filtrado (alimento pulverizado) y captura de partículas (alimento particulado), sin embargo, la forma de alimentación dominante es la filtración.

En el presente trabajo, la forma de alimentación por filtración fue más efectiva, ya que al final del periodo experimental, la longitud y el peso de las sardinas fue mayor que con la dieta particulada y además que el mayor crecimiento fue a 18 °C, lo que también podría indicar el óptimo térmico con este tipo de alimento. La preferencia térmica de las sardinas de la subpoblación templada expuestas a temperaturas constantes es de 18 °C, independientemente de su aclimatación previa (Hernández, 2006; Martínez-Porchas *et al*, 2010). La explicación de esta preferencia térmica puede estar relacionada con la temperatura a la cual la sardina encuentra el óptimo, donde sus procesos fisiológicos son más eficientes (Jobling, 1981).

El incremento en la tasa de consumo de oxígeno es una consecuencia de los requerimientos del organismo, ya que el tipo de nado en el cual hay una mayor demanda de oxígeno es el nado relacionado con la alimentación y con el escape de los depredadores. En este trabajo se midió el consumo de oxígeno asociado con el consumo de alimento (captura, digestión, absorción y asimilación de los nutrientes), donde se encontraron diferencias altamente significativas en relación con la temperatura y el tipo de alimento. El mayor incremento en la tasa de consumo de oxígeno se observó a 18°C con la dieta particulada, sin embargo, para la dieta en polvo el mayor consumo de oxígeno se registró a 23 °C, aunque

los datos tuvieron una enorme variación en esta última temperatura. Estos resultados concuerdan con los de Lingen (1995), quien evalúo la tasa de consumo de oxígeno de la sardina adulta *Sardinops sagax,* en relación con la temperatura, la velocidad del nado voluntario y la conducta de alimentación. Describe que cuando adicionó el zooplancton hubo un incremento en la velocidad de nado, en la alimentación y en la tasa de respiración con ambos tipos de alimentación, ya sea por captura de partículas y/o por filtración. Durante la alimentación por captura de partículas, se registró una mayor velocidad de nado y la tasa de respiración fue proporcional a la velocidad de nado (Lingen, 1995). Conforme aumentó la temperatura, la tasa de consumo de oxígeno también se incrementó. Esta relación entre la temperatura y la tasa de consumo de oxígeno también fue estudiada por Fry y Hart (1946) en el pez dorado (*Carassius auratus*), quienes observaron que a 35 °C la diferencia entre la tasa metabólica estándar y máxima, está correlacionada con la tasa a la cual el pez dorado puede nadar constantemente.

El estrés es considerado como un factor determinante e importante en la aparición, establecimiento y propagación de enfermedades. Diversos signos pueden detectarse de manera visible en los peces que son expuestos a estrés y entre los más frecuentes se encuentran: las alteraciones en la función cardiaca, descamación, producción de moco, mortalidad en masa, decoloración de la piel, hemorragias branquiales, entre otros. Una forma de evaluar el estrés es analizar su efecto en la integridad de los tejidos. De menor a mayor grado se pueden observar procesos inflamatorios agudos o crónicos a nivel celular y tisular, degeneración, procesos de reparación y regeneración, neoplasias y trastornos genéticos (Zacarias *et al,* 2009). En los cortes de histológicos de hígado de las sardinas alimentadas con ambos tamaños de alimento y aclimatadas a 15 °C, no se observaron daños aparentes, sin embargo a 18 y 23 °C se cuantificó una mayor cantidad de células sanguíneas, un aumento en el diámetro de los sinusoides y la disminución de la densidad de hepatocitos. Zacarias *et al,* (2009) analizaron las modificaciones estructurales del estómago y el hígado de *Paralabrax*

maculatofasciatus (Steindacher, 1868) en condiciones de estrés crónico, (descenso en el nivel del agua y cultivo a altas densidades,) y encontraron que el mayor daño producido por el estrés se registró en el estómago caracterizado por l aumento en el tamaño de las células secretoras de moco y atrofia celular en las mucosas. En el hígado se constató la reorganización del parénquima, hepatocitos formando rosetas, infiltración de leucocitos y macrófagos en relación directa con las áreas necróticas, núcleos picnóticos, congestión e hipertrofia del tejido conjuntivo de la periferia de los conductos biliares. Todas estas modificaciones indicaron que el hígado funcionó como uno de los principales órganos blanco que respondió al estrés. Sin embargo, no todos los factores de estrés afectan al hígado de igual manera, por lo que no se considera como buen indicador para evaluar sus efectos. Hernández (2006) observó que en los cortes de hígado de las sardinas aclimatadas a 19 °C, no se observaron daños aparentes, sin embargo, en las sardinas aclimatadas a 25 °C observaron CMMs, así como una modificación en el tamaño de núcleo.

En las muestras de riñón de las sardinas aclimatadas a 15 °C las estructuras características no se dañaron, sin embargo a 18 y 23 °C, se observaron modificaciones en el corpúsculo renal y un aumento en el número de CMMs. Silva y Martínez (2007) evaluaron los cambios morfológicos en el riñón de *Astyanax altiparanae,* peces que fueron recolectados de un afluente de aguas residuales que al contrastarlos con los tejidos de organismos sanos, recolectados en sitios libres de contaminación, constataron alteraciones en la cápsula de Bowman (proliferación de las células epiteliales y el adelgazamiento de la lámina basal), que produjeron una disminución en el espacio de la cápsula. También había un daño en los túbulos renales, incremento en la densidad área y diámetro del núcleo de las células interrenales. Estos resultados evidenciaron la pobre calidad del agua y la exposición de los peces a sustancias tóxicas.

Se ha sugerido que los centros CMMs son buenos indicadores del estado fisiológico de los peces silvestres ya que su número y tamaño se incrementan en condiciones de inanición o cuando hay un déficit nutricional, por la exposición a agentes tóxicos e infecciosos y por el efecto de factores ambientales como la temperatura (Agius y Roberts, 2003). En el presente trabajo, se observó un incremento en el número y en la coloración de estos centros, en relación directa con el incremento con la temperatura de aclimatación, lo que podría indicar una elevada actividad de remoción de desechos celulares o de agentes infecciosos como bacterias. Cabe destacar que en el caso de la sardina, los CMMs se pueden considerar buenos indicadores del estrés por temperatura.

Hernández (2006) observó que los CMMs, se hacían más evidentes en el hígado a medida que se incrementaba la temperatura de aclimatación, a diferencia de lo que se encontró en el presente trabajo, en donde no se observó la presencia de estos centros, aunque es posible que su ausencia esté relacionada con la región del hígado que fue analizada.

El cortisol es una hormona importante en la respuesta de estrés y se ha utilizado como un indicador de los efectos de agentes estresores. Pickering y Stewart (1984) observaron que al mantener a la trucha *Salmo trutta* L, en diferentes condiciones de hacinamiento, los niveles de cortisol en el plasma cambiaron con el tiempo, durante los primeros 25 días hubo un aumento en las concentraciones de cortisol, pero al día 39 los niveles de cortisol fueron similares en las truchas mantenidas a baja densidad. A los 110 días, los niveles de cortisol se mantuvieron por debajo de 10 ng/ml^{-1}, sin embargo a nivel histológico no encontraron diferencias en los tejidos interrenales. En el presente trabajo, el nivel de cortisol que se encontró en las tres temperaturas, después de un mes de aclimatación y alimentados con ambos tamaños de partícula disminuyó y fue inferior a la concentración observada en los peces aclimatados a 18 °C, que es la temperatura óptima para esta población de sardinas (Martínez-Porchas *et* al., 2009). Barton *et*

al (1987) alimentaron a la trucha *Salmo gairdneri* con cortisol y observaron el efecto a largo plazo en el crecimiento, en su estado fisiológico y en la respuesta al estrés. Los peces alimentados con una dieta rica en cortisol durante 10 semanas, mostraron un aumento en la concentración de cortisol en plasma, sin embargo, al transcurrir las horas, esta concentración disminuyó. Cuando los peces se expusieron diariamente a condiciones de estrés, la concentración de cortisol tuvo un pico durante la primera hora y disminuyó con el paso de las horas, a las 12 h se elevó de nuevo aproximadamente a la misma concentración del pico durante la primera hora.

Lankford *et al* (2005) midieron la actividad del campo metabólico y la velocidad del nado crítico en el esturión verde *Acipenser medirostris* y observaron que con diferentes tipos de estresores, la concentración de cortisol se incrementa en respuesta al estrés crónico. Contrariamente, las concentraciones de cortisol de la sardina evaluadas en este trabajo disminuyen después de una exposición crónica a la temperatura de aclimatación, es posible que en el largo plazo, las alteraciones fisiológicas observada sean independientes del efecto del cortisol, lo que indicaría que las sardinas se encuentran en el estado terciario del estrés, en el que los efectos se traducen e diferentes grados de daño a los tejidos, en el incremento en la susceptibilidad a las enfermedades y en el incremento en la mortalidad (Jobling, 1994).

El incremento en la concentración de metabolitos como la glucosa y el cortisol son indicadores del estrés en los peces cuando son expuestos a diferentes temperaturas sub-óptimas. Martínez-Porchas *et* al (2010) encontró que en la sardina aclimatada a 23 °C, la concentración de cortisol se incrementó en más del 40%, este aumento se puede atribuir a un aumento en la demanda energética, provocada por una tasa metabólica elevada necesaria para mantener la homeostasis. El cortisol estimula los procesos catabólicos para liberar aminoácidos (AA) y ácidos grasos libres y asegurar el aprovisionamiento de

glucosa a través de la gluconeogénesis a las células. Este ajuste en las rutas catabólicas es regulado directamente por el cortisol, mediante el aumento de la transcripción y la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que es la enzima que limita la velocidad de la gluconeogénesis en peces. La mayoría de la glucosa libre es sintetizada por la gluconeogénesis hepática la cual es resecuestrada y se almacena como glucógeno hepático y muscular, con lo que se restablece la glucosa utilizada durante la respuesta de estrés inicial (glucogenólisis). El cortisol también puede aumentar la degradación del glucógeno hepático (Lankford *et al,* 2005).

Capítulo VIII

CONCLUSIONES

- La combinación de la temperatura y el tamaño del alimento afecta el consumo de oxígeno de la sardina de la Corriente de California, con el alimento particulado es mayor a 18°C, con el alimento pulverizado el consumo de oxígeno fue mayor a 23°C.

- El consumo de alimento particulado o pulverizado provoca un incremento en la tasa metabólica (SDAm) en una relación directa con el incremento de la temperatura

- La temperatura de 23 °C estresa a las sardinas y deteriora su condición fisiológica, lo cual se reflejó en la alteración de la concentración de cortisol. El tiempo de exposición a ésta temperatura provocó que los organismos se volvieran más susceptibles a enfermedades y por lo tanto se produjo una mayor tasa de mortalidad.

- La alteración más conspicua en el tejido hepático fue la modificación en el tamaño del núcleo.

- En el riñón se observaron alteraciones en los glomérulos, como el aumento en el espacio intraglomerular, engrosamiento en la mayor parte de la cápsula de Bowman, lo cual puede ser un buen indicador del estrés en las sardinas.

- Hubo un aumento en el tamaño y en el número de centros melanomacrófagos en el riñón.

Capítulo IX

RECOMENDACIONES.

- Cambiar el alimento de tipo comercial por alimento vivo, para eliminar el efecto artificial del alimento formulado y obtener una respuesta aproximada a la que evoca el alimento natural de las sardinas (fitoplancton y zooplancton).

- Realizar el experimento por un tiempo más prolongado para poder saber si el hígado, en el caso de la temperatura y el tipo de alimento como factor de estrés, es buen indicador de estrés y si se observa otro tipo de daño además del aumento del diámetro del núcleo.

- Realizar un análisis de la actividad natatoria asociada con diferentes estados metabólicos para tener una aproximación cuantitativa de la modificación en la velocidad del nado como estimador del estrés por el efecto de la temperatura.

- Hacer una cuantificación del daño ocasionado en el estómago de los peces, debido a que también se considera un buen estimador del estrés.

- Realizar los experimentos en estanques con un diámetro mayor para poder asegurar que la limitación de espacio no ocasiona estrés en las sardinas.

Capítulo X

LITERATURA CONSULTADA.

Arenas, P. R., Hunter, J. R. y Jacobson, L. D. 1996. The 1994 Mexico-U.S. Spawning Biomass Survey for Pacific Sardine (*Sardinops sagax*) and the 1995 CalCOFI Sardine Symposium, California Cooperative Fisheries Investigations Reports. 37: 129-133 p.

Barandica, L. M. y Tort, L. B. 2008. Neuroendocrinología e inmunología de la respuesta al estrés en peces. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias. 32 (123): 267-284 p.

Barton, B., Schreck, C. y Barton, L. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions and stress responses in juvenile rainbow trout. Diseases of Aquatic Organisms. 2: 173-185 p.

Beamish, F. W. H. 1974. Apparent specific dynamic action of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 31: 1763-1769 p.

Beamish, F. W. H. 1984. Swimming performance of three southwest Pacific fishes. Mrine Biology. 79: 311-313 p.

Beamish, F. W. H. 1990. Swimming metabolism and temperature in juvenile walleye, Stizostedjon vitreum vitreum. Environmental Biology of Fishes. 27:309-314 p.

Beamish, F. W. H. y Trippel, E. A. 1990. Heat increment-a static or dynamic dimension in bioenergetics models. Transactions of the American Fisheries Society. 119 (4): 649-661 p.

Boggs, C. y Kitchell, J. 1991. Tuna metabolic rates estimated from energy losses during starvation. Physiological Zoology. 64 (2): 502-524 p.

Brett, J. R. y Glass, N. R. 1973. Metabolic rates and critical swimming speeds of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in relation to size and temperature. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 30, 379-387 p.

Brett, J. R. y Groves, T. D. D. 1979. Physiological energetics. In Hoar, W. S, Randall, D. J. Brett, J. R. (eds) Fish physiology, Vol VIII, Energetics and growth. Academic Press, New York. 279-352 p.

Bucher, F. y Hofer, R. 1993. The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of Brown trout (*Salmo trutta*). Water Research. 27 (2): 255-261 p.

Chávez, H., Silva, S. y Sunada, J. S. 1979. La pesquería de anchoveta (Engraulis mordax) en California y Baja California durante 1975, con datos sobre el desarrollo de la industria en 1976 y 1977. Serie Científica del Departamento de Pesca 20. 1-48 p.

Cisneros-Mata, M. A., Nevárez-Martínez, M. O. y Hammann, M. G. 1995. The rise and fall of the Pacific sardine, Sardinops sagax caeruleus Girard, in the Gulf of California, Mexico. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 36:136-143 p.

Clark, F.N. 1934. Maturity of the California sardine (*Sardina caerulea*): determined by ova diameter measurements. Fish Bulletin 42. 49 pp.

Cliff, R. J. y Jensen, F. B. 1993. Fish Ecophysiology. Chapman & Hall. Fish and Fisheries series. Institute of Biology. Odense University Denmark. 161-179 p.

Correa. L. L., Ribeiro, L. P., Malison, J., Bary, T. y Held, J. 2004. Effects of temperature on the growth and cortisol stress response of surubim. Stress in fish: Consequences to Performance. International Congress on the Biology of Fish. Physiology Section, American Fisheries Society. Book Number(ISBN) 1-894337-57-3.

COSEWIC 2002. COSEWIC assessment and update status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. vii + 19 p.

Deriso, R. B., Barnes, J. T., Jacobson, L. D. y Arenas, P. 1996. Catch-at-age analysis for Pacific sardine (*Sardinops sagax*), 1983-1995. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 37:175-187 p.

DFO, 2004. Pacific Sardine DFO Canadian Science Advisory Secretariat. Stock Status Report 2004/037. 1-5 p.

Randall, D., Burggren, W. y French, K. 1997. ECKERT. Animal physiology. Mechanisms and adaptations. Freeman and Company. 727 p.

Engelsma, M. Y., Huising, M. O., van Muiswinkel, W. B., Flik, G., Kwang, J., Savelkoul, H. F. J. and Verburg-van Kemenade, B. M. 2002. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. Veterinary Immunology and Immunopathology. 87: 467-479 p.

Félix-Uraga, R., Alvarado-Castillo, R. M. y Carmona-Piña, R. 1996. The sardine fishery along the western coast of Baja California, 1981 to 1994. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 37:188-192 p.

Félix-Uraga, R., Gómez-Muñóz, V. M., Quiñonez-Velázquez, C., Melo-Barrera, F. N. y García-Franco, W. 2004. On the existence of Pacific sardine groups off the west coast of Baja California and Southern California. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 45: 146-151 p.

Ferguson, H. W. 2006. Systemic Pathology of fish. A text and Atlas of normal tissues in Teleosts and their responses in disease. Second Edition. Scotian press. 367 p.

Flores, Q. C. 2002. Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. Revista de Ictiología. 10 (1/2): 57-78 p.

Fry, F. E. J. y Hart, J. S. 1946. The relation of temperatura to oxygen consumption in the goldfish. Anatomical Record. 96 (4): 66-77 p.

García, W. y Sánchez, R. F. J. 1996. Proyecto Pelágicos Menores: Boletín Anual de la Temporada 1995. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca. (Inédito). 3-18 p.

García, W. y Sánchez, R. F. J. 1997. Proyecto Pelágicos Menores: Boletín Anual de la Temporada 1996. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca. (Inédito). 2-23 p.

Gibson, R. N. y Ezzi, I. A.1990. Relative importance of prey size and concentration in the feeding behavior of the herring *Clupea harengus.* Marine Biology. 107: 357-362 p.

Grodzinski, W., Klekowski, R. Z. y Duncan, A. 1975. Methods for Ecological Bioenergetics. Blackwell Scientific Publications. Oxford London Edinburgh Melbourne. 293-300 p.

Hammann, M. G. y Cisneros-Mata, M. A. 1989. Range extension and commercial capture of the Northern anchovy *Engraulis mordax* Girard, in the Gulf of California, Mexico. California Fish and Game. 75:49-53 p.

Hargreaves, N. B., Ware, D. M. y McFarlane, G. A. 1994. Return of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) to the British Columbia coast in 1992. Canadian Journal of Fisheries and Aquatics Sciences. 51:460-463 p.

Harris, J. and Bird, D. J. 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. Veterinary Immunology and Immunopathology. 77: 163-176 p.

Hart, J.L. 1938. A brief account of the life-history of the pilchard. Report of the British Columbia Fisheries Department 1937. 50-56 p.

Hart, J.L. 1973. Pacific fishes of Canada. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada. 180:100-103 p.

Hernández, L. J. R. 2006. Holliday, F. G. T. y Blaxter, J. H. S. 1960. The effects of salinity on the developing eggs and larvae of the herring. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 39, 591-603 p.

INAPESCA, 2001.La pesquería de peces pelágicos menores. Peces pelágicos menores *Sardinops caeruleus*, *Engraulis mordax, Opisthonema spp, Scomber japonicas. Cetengraulis mysticetus, Trachurus symetricus, Etrumeus teres, Oligoplites* spp. 96 p.

James, A. G. y Findlay, K. P. 1989. Effect of particle size and concentration on feeding behaviour, selectivity and rates of food ingestion by the Cape anchovy Engraulis capensis. Marine Ecology Progress Series. 50: 275-294 p.

Jobling, M. 1994. Fish Bioenergetics. The Norwegian College of Fishery Science. University of Tromso, Norway. Champman & Hall. 285-290 p.

Lagler, K. F., BARDACH, J. E. MILLER, R. R. y MAY-PASSINO, D. R. 1984. Ictiología. 1ª edición en español. AGT Editor. México. 489 p

Lankford, S. E., Adams, T. E., Miller, R. A. y Cech Jr, J. J. 2005. The cost of chronic stress: Impacts of a nonhabituating stress response on metabolic variables and swimming performance in Sturgeon. Physiological and Biochemical Zoology. 78 (4): 599-609 p.

Lasker, R. y Theilacker, G. H. 1962. Oxygen Consumption and Osmoregulation by Single Pacific sardine eggs and larvae (*Sardinops caerulea* girard). Journal du Conseil. 27(1):25-33 p.

Lasker, R. 1970. Utilisation of zooplankton energy by a Pacific sardine population in the California Current. In: Steele JH (ed) Marine food chains. Oliver and Boyd, Edinburgh. 265-284 p.

Levinton, J. S. 1982. Marine ecology. N. Jersey: Prentice-Hall. 526 p.

Li, C. y Kim, K. Neuropeptide. September 25, 2008. WormBook. The *C. elegans* Research Community, WormBook. http://www.wormbook.org/

Lingen, Van der. C. D. 1994. Effect of particle size and concentration on the feeding behaviour of adult pilchard *Sardinops sagax*. Marine Ecology preogress series. 109, 1-13 p.

Lingen, Van der. C. D. 1995. Respiration rate of adult pilchard *Sardinops sagax* in relation to temperature, voluntary swimming speed and feeding behavior. Marine Ecology Progress Series. 129:41-54 p.

Lluch-Belda D., Magallon J. F. y Schwartzlose R. A. 1986. Large Fluctuations In The Sardine Fishery In The Gulf Of California: Possible Causes. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 27:136-140 p.

Lluch-Belda, D., Hernández-Vázquez, S. y Schwartzlose, R. A. 1991. A hypothetical model for the fluctuation of the California sardine population (*Sardinops sagax caerulea*). En: Kawasaki, T., S. Tanaka, Y. Toba & A. Taniguchi (Eds). The long-term-variability of pelagic fish populations and their environment. Proc. Int. Symp., Sendai Japan, 14-18 nov. 1989. Oxford Pergamon Press: 293-300 p.

Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, D. B., Hernández-Vázquez, S., Salinas-Zavala, C. A. y Schwartzlose, R. A. 1991. Sardine and anchovy spawning as related to temperature and upwelling in the California Current system. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 32:105–111 p.

Lluch-Belda, D., Arvizu, M. J., Hernández-Vázquez, S., LLuch-Cota, D., Salinas, A. C. Z., Baugartener, T., Hammann, G., Cota, V. A., Cotero, C. E., García, F. W., Pedrín, O., Lizárraga, S. M., Martínez, M. A., Morales, R., Nevárez M. M. O., Santos, M. J. P., Ochoa, B. R., Rodríguez, S. R., Torres, V. J. R. y Páez, B. F. 1995. Atlas Pesquero de México. Pesquerías Relevantes. Secretaría de Pesca/Instituto Nacional de la Pesca/Universidad de Colima (Cenedic).

Lo, N. C. H., Green-Ruiz, Y. A., Jacob-Cervantes, M., Moser, H. G. y Lynn. R. J. Egg production and spawning biomass of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) in 1994, determined by the daily egg production method. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 37:160-174 p.

Logerwell, E. A. 2001. Metabolic Rate of California Pacific Sardine Estimated from Energy Losses during Starvation. Transactions of the American Fisheries Society. 130:526–530 p.

MacCall, A. D. 1979. Population estimates for the waning years of the Pacific sardine fishery. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 20:72-82 p.

Martínez-Porchas, M., Mártinez-Córdoba, L. R. y Ramos-Enriquez, R. 2009. Cortisol and Glucose: reliable indicators of fish stress?. Pan-American Journal of Aquatic Sciences. 4 (2):158-178 p.

Martínez-Porchas, M., Hernández-Rodríguez, M., Herzka, Z. S. y Gutierrez-Millán, E. L. 2010 .Evaluation of the physiological status of the Pacific sardine, *Sardinops sagax caeruleus*, acclimated to different thermal regimes based on selected blood parameters. Environmental Biology of Fishes. DOI 10.1007/s10641-010-9757-z.

Murphy, G. I. 1966. Population biology of the Pacific sardine (*Sardinops caerulea*). Proceedings of the California Academy of Science. 34:1-84 p.

Nevarez-Martínez, M. O. y Santos-Molina, J. P. 1996. Small pelagic fisheries of the Gulf of California. 1995/96 fishing season. Abstracts, Annual Conference California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports, Asilomar Conference Center, California. 10 p.

Nevárez, M. M., Martínez, Z. M. de los A., Cotero, A. C. E., Jacob, C. M. L., Green, R. Y., Gluyas, M. G., Cota, V. A. y Santos, M. J. P. 2006. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo. Peces pelágicos menores. INAPESCA. 263-301 p.

Pankhurst, N. y Van Der Kraak, G. 2000. Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. General and Comparative Endócrinology 117: 225-237 p.

Parrish, R. H., Serra, R. and Grant, W. S. 1989. The monotypic sardines, Sardina and Sardinops: their taxonomy, distribution, stock structure, and zoogeography. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 46: 2019-2036 p.

Pickering, A. D. y Stewart, A. 1984. Acclimation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress. Journal of Fish Biology. 24: 731-740 p.

Quiñonez-Velázquez, C., Alvarado-Castillo, R. y Féliz-Uraga, R. 2002. Relación entre el crecimiento individual y la abundancia de la población de la sardina del Pacífico *Sardinops caeruleus* (Pisces: Clupeidae) (Girard 1856) en Isla de Cedros, Baja California, México. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 37 (1): 1-8 p.

SAGARPA. 2001. Programa Sectorial de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001-2006. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 104 p.

Schwartzlose, R. A., Alheit, J., Bakun, A., Baumgartner, T. R., Cloete, R., Crawford, R. J. M., Fletcher, W. J., Green-Ruiz, Y., Hagen, E., Kawasaki, T., Lluch-Beldaio, D., Lluch-Cota, S. E., MacCall, A. D., Matsuura, Y., Nevarez-Martínez, M. O., Parrish,R. H., Roy, C., Serra, R., Shust, K. V., Ward, M. N., y Zuzunaga, J. Z. 1999. Worldwide large scale fluctuations of Sardine and Anchovy populations. South African Journal of Marine Science. 21: 289-347 p.

Schweigert, J. F. 2002. Update COSEWIC Status Report on the Pacific Sardine Sardinops sagax in Canada. Stock Assessment Division Science Branch Fisheries and Oceans Canada Pacific Biological Station 3190 Hammond Bay Road Nanaimo, BC. 26 p.

Selye, H. M. D. 1950. Stress and disease. The laryngoscope. 65 (7): 500-514 p.

Steffensen, J. F. 1989. Some errors in respirometry of aquatic breathers:how to avoid and correct for them. Journal Fish Physiology and Biochemistry. 6: 49-59 p.

Silva, G. A. y Martínez, B. R. C. 2006. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23: 185-192 p.

Smith, P. E. 2005. A history of proposals for subpoblation structure in the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) population off western north America. CalCOFI Rep. 46: 75-82 p.

Svetovidov, A. N. 1952. Clupeidae. Fauna of the USSR, fishes, 2: 1. Translated from Russian, 1963: Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem. New series 48:1–374 p.

Zacarias, M., Cadena, M. y Rivas, P. 2009. Modificaciones estructurales en el estómago y el hígado de *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindacher, 1868) ante situaciones de estrés crónico. International Journal of Morphology. 27 (2): 425-433 p.

Whitehead, P. J. P. 1985. FAO species catalogue. Clupeoid of the world (suborder Clupeoidei). Part 1-Chirocentridae, Clupeidae and Pristgasteridae. 125 (7) part 1. 303 p.

Wolf, P. 1992. Recovery of the Pacific sardine and the California sardine fishery. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports. 33:76-86 p.