

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**COMPORTAMIENTO TERMORREGULADOR Y
RESPUESTA DE LOS PARÁMETROS SANGUÍNEOS DE
Sardinops sagax caeruleus A DIFERENTES
FLUCTUACIONES TÉRMICAS**

TESIS

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

Presenta:

Marcel Martínez Porchas

Ensenada, Baja California, México, Octubre de 2009.

RESUMEN de la tesis de **Marcel Martínez Porchas**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en Acuicultura.

Ensenada, Baja California, México. Octubre, 2009.

Comportamiento termorregulador y respuesta de los parámetros sanguíneos de *Sardinops sagax caeruleus* a diferentes fluctuaciones térmicas

Resumen aprobado por:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Director de Tesis

Con el fin de conocer el efecto de la temperatura sobre la fisiología de *Sardinops sagax caeruleus*, se estudio el comportamiento termorregulador y los parámetros sanguíneos a diferentes fluctuaciones térmicas, para establecer sus límites térmicos y monitorear su condición fisiológica. Las sardinas fueron capturadas en la Bahía de Ensenada durante el Otoño de 2007-2008 y expuestas durante 20 días a un ciclo simétrico de invierno (CS-INV) donde la temperatura fluctuó de 13 a 18 °C cada 24 horas, el tiempo de permanencia en la temperatura alta y baja fue de 7 horas, mientras que los cambios de temperatura ocurrían en 5h (7-5-7-5). También se aclimataron organismos a un ciclo simétrico de verano (CV-Ver) con fluctuación de 18-23 °C. Adicionalmente, se aclimataron otras sardinas a ciclos asimétricos de invierno y verano (CA-INV y CA-Ver) donde la temperatura baja y alta se mantuvo por 10 y 4h respectivamente (10-5-4-5). Se aclimató un grupo de sardinas a la temperatura óptima constante (TO: 18 °C) para comparar la respuesta de los parámetros sanguíneos. Ninguno de los tratamientos tuvo un efecto sobre la preferencia térmica de las sardinas (≈ 18 °C). El tipo de ciclo (CS o CA) tampoco influyó sobre los límites térmicos; sin embargo, la temperatura de los ciclos tuvo un efecto sobre el desplazamiento de los límites. Los intervalos de preferencia térmica delimitados por las temperaturas de evitación fueron de 13.5-19.6 °C y 16.1-22.5 °C para los ciclos de INV y Ver respectivamente. Los intervalos de tolerancia delimitados por las temperaturas letales incipientes fueron 6.1-24.3 °C y 7.5-25.6 °C para INV y Ver respectivamente. Los intervalos de resistencia delimitados por las temperaturas críticas fueron 5.5-30.5 °C y 6.6-32.2 °C. Las respuestas de los parámetros sanguíneos mostraron que los niveles de cortisol permanecieron constantes a 18 °C independientemente del tipo de aclimatación, pero incrementaron en un 74.6 y 55.6 % cuando la temperatura aumentó a 23 °C en los CS y CA de verano respectivamente. También los niveles de glucosa se incrementaron en un 58 y 25 % respectivamente, mientras que no hubo diferencias en la concentración de glucosa a 13 o 18 °C independientemente del tratamiento. Los niveles de la enzima aspartato

aminotransferasa fueron similares entre los tratamientos de invierno y la TO, e incrementaron en un 64 y 36 % en los CS-Ver y CA-Ver respectivamente. Los niveles de alanina aminotransferasa se incrementaron en un 83 % en el CS-Ver y no hubo diferencias entre los demás tratamientos. El número de eritrocitos incrementó en los ciclos de verano pero las diferencias no fueron significativas con los demás tratamientos. Con base en los resultados, se puede concluir que las sardinas estudiadas pueden modificar su preferencia térmica en un intervalo de 13.5-22.5 °C y son vulnerables a las altas temperaturas, ya que evitan incursionar en temperaturas superiores a 23 °C; además el estatus fisiológico de estas sardinas fue óptimo a temperaturas de 13 a 18°C como las registradas en California durante el verano. Por el contrario, las temperaturas superficiales de más de 23 °C como las registradas en aguas de Bahía Magdalena y el Golfo de California podrían afectar su condición fisiológica poniendo en riesgo su supervivencia ya que se pueden alcanzar los límites letales para estos organismos.

Palabras Clave: Sardina, comportamiento térmico, condición fisiológica, límites térmicos, estrés.

ABSTRACT of the thesis presented by **Marcel Martínez Porchas** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in Aquaculture. Ensenada, Baja California, México October 2009.

Thermal behavior and blood parameters response of *Sardinops sagax caeruleus* to different thermal fluctuations

The aim of this experiment was to know the effect of temperature on the physiology of *Sardinops sagax caeruleus*, their thermal behavior and blood parameters at different thermal fluctuations, to establish the thermal limits and monitoring its physiological condition. Sardines were captured at Ensenada Bay during the fall of 2007-2008 and exposed for 20 days to a symmetrical winter cycle (S-WC) with a thermal fluctuation from 13 to 18 °C every 24 hours, the period of permanence at the highest and lowest temperature was 7 hours, whereas the thermal changes occurred in 5h (5-7-5-7). Another group of organisms were exposed to a symmetric summer cycle (S-SC) with a fluctuation of 18-23 °C. Other sardines were exposed to two asymmetric cycles of winter and summer (A-WC and A-SC) in which the lowest and highest temperature remained during 10 and 4h respectively (10-5-4-5). Also a group of sardines was acclimated to an optimal constant temperature (OT: 18 °C) to compare the response of the blood parameters. None of the treatments had an effect on the thermal preference of the sardines (≈ 18 °C). Neither the type of cycle (S or A) had an influence on their thermal limits; however, the thermal fluctuation of the cycles had an effect on the displacement of those limits. The intervals of thermal preference, delimited by the avoidance temperatures were: 13.5-19.6 °C and 16.1-22.5 °C for the cycles of W and S respectively. The tolerance intervals, delimited by the incipient lethal temperatures were 6.1-24.3 °C and 7.5-25.6 °C for W and S respectively. The intervals of resistance, delimited by the critical temperatures were 5.5-30.5 °C y 6.6-32.2 °C respectively. The levels of cortisol remained constant at 18 °C independently of the acclimation cycle, but increased in a 74.6 and 55.6 % when the temperature increased to 23 °C in the S-SC and A-SC respectively. Also, the glucose levels increased in a 58 and 25 % respectively, while no differences were assessed in the concentrations at 13 or 18 °C independently of the treatment. The levels of the enzyme aspartate aminotransferase were similar among the winter treatments and the OT, but increased in a 64 and 36 % in the S-SC and A-SC respectively. The levels of alanine aminotransferase increased 83 % in the S-SC and there were not differences between the other treatments. The erythrocyte number increased in the summer cycles but the differences were not significantly with the rest of the treatments. With base on the results, it can be concluded that the sardines are able to modify their thermal preference within an interval of 13.5-22.5 °C and are vulnerable to high temperatures, because they avoid incursions in temperatures higher than 23 °C; also the physiological status of this sardines was optimal at 13 to 18 °C, such as those registered in the waters of California during the winter. On the other hand, the surface

temperatures higher than 23 °C registered in waters of Magdalena Bay and the Gulf of California may put in risk their survival, because those temperatures can reach the lethal limits of this organisms.

Dedicatorias

A mi Dios primeramente quien es el motor principal de mi vida y que me ha traído hasta este punto. “Job 38:4-6: *¿Dónde estabas tú cuando yo fundaba la tierra?. Házme saber, si tienes inteligencia. ¿Quién ordenó sus medidas, si lo sabes?, ¿O quién extendió sobre ella cordel?, ¿Sobre qué están fundadas sus bases?*”.

A mis amados padres Luis Rafael Martínez Córdova y Julia Porchas Cornejo, quienes me han inculcado en todo momento los valores y enseñanzas suficientes para poder volar más alto de lo que yo mismo esperaba. Quienes me dieron una vida plena, llena de amor y cariño. A ustedes queridos padres los hago partícipes de este logro.

A mis muy queridas hermanas Marysol y Mariel quienes han estado a mi lado en todo momento, y con quienes he compartido aventuras y sueños.

A mis abuelos Miguel Porchas Jiménez y Enriqueta Cornejo Borjas, quienes representan mi eterno símbolo de perseverancia a base de trabajo honesto. A ustedes quienes nunca desfallecieron en la guía de sus hijos y nietos, demostrándolo no sólo con palabras sino también con hechos.

A mis abuelos Rafael Martínez y Oralía Córdova, cuyo recuerdo llevo siempre en mi corazón.

A ti mí amada prometida, Anabel Enid Kennedy Paz, mi fiel acompañante durante todo este trayecto; siempre fuiste y eres un soporte en todos los aspectos de mi vida. Hoy cerramos un ciclo y comenzamos uno nuevo, en el cual nos enfrentaremos a nuevos retos y aventuras, siempre de la mano y en compañía de Dios.

A mis queridas tías: Vicky, Flora, Dolores, Rossy, Mary y Vita, por haberme dado siempre palabras de aliento y por su apoyo durante este proceso.

A mi gran familia en general, a quienes debo algunos de los más bellos recuerdos de mi vida.

A mis queridos amigos, con quienes he compartido sueños, alegrías, tristezas, fracasos y logros. Me complace en esta ocasión compartir con ustedes un logro.

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.

A CONACYT nuevamente por el apoyo mediante el proyecto P46060-Z: EL COMPORTAMIENTO TERMORREGULADORE DE ORGANISMOS ACUÁTICOS: UNA HERRAMIENTA PARA PREDECIR EL EFECTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por darme la oportunidad de superarme y por el apoyo brindado durante el primer año de doctorado.

Mi especial agradecimiento a la Dra. Mónica Hernández Rodríguez por su apoyo, paciencia y confianza durante este proceso, y por haberme enseñado de manera más profunda en significado de la palabra “perseverancia”.

Agradezco al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez por su importante aporte intelectual para la realización de éste trabajo y el honor de haber formado parte del comité de tesis.

A la Dra. Sharon Herzka Llona por su disposición, y apoyo en todo momento y sus adecuados comentarios para enriquecimiento de ésta investigación.

Al Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán por su amable disposición y sugerencias para el adecuado desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Timothy Baumgartner por sus relevantes opiniones para el diseño de éste experimento.

A la Dra. Lydia Ladah por los datos otorgados de la fluctuación térmica en aguas de la Bahía de Ensenada y lugares aledaños.

Al técnico Francisco Valenzuela por su apoyo en el diseño de los sistemas experimentales y en la realización de figuras.

A los técnicos Luis Murillo, Francisco Valenzuela, Carlos Carballo, Norberto Flores y José Espinoza por su apoyo en el transporte de organismos vivos.

A la Dra. Pilar Sanchez Saavedra, por su apoyo en todo momento, tanto moral como material. Gracias por su amistad y consejos.

A Michael Richardson Bayne por la donación de sardinas para llevar a cabo este proyecto.

A Mario Armando Cabrales de “Astilleros Ensenada” por la donación y venta de organismos vivos.

A Jorge Villanueva de “Sport Fishing Wahoo, Ensenada”, por el transporte de organismos del mar hacia la Bahía.

Al personal investigador de Acuicultura por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios.

A mis amigos y compañeros de clase por su compañía y apoyo durante estos tres años

CONTENIDO

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iv
Dedicatorias	vi
Agradecimientos	viii
Contenido	x
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tablas	xv
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	1
<i>I.1 El estudio de las sub-poblaciones de sardina</i>	3
<i>I.2 Temperatura</i>	7
<i>I.3 Parámetros sanguíneos</i>	14
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
Capítulo II. MATERIALES Y METODOS	23
<i>II.1 Obtención y manejo de organismos</i>	23
<i>II.2 Aclimatación</i>	24
<i>II.3 Comportamiento termorregulador</i>	26
II.3.1 Preferencia térmica.....	29
II.3.2 Temperaturas de evitación.....	30
II.3.3 Temperaturas letales.....	30
II.3.4 Temperaturas críticas.....	32
II.3.5 Zonas térmicas.....	33
<i>II.4 Parámetros sanguíneos</i>	34

CONTENIDO (continuación)

II.4.1 Obtención de muestra.....	34
II.4.2 Cortisol.....	35
II.4.2.1 Curva patrón.....	35
II.4.2.2 Análisis de muestras.....	37
II.4.3 Glucosa.....	38
II.4.4 Alanina Aminotransferasa.....	40
II.4.5 Aspartato Aminotransferasa.....	41
<i>II.4. Número de Eritrocitos.....</i>	42
<i>II.5 Análisis estadístico.....</i>	43
Capítulo III. RESULTADOS.....	45
<i>III.1 Comportamiento termorregulador.....</i>	<i>45</i>
III.1.1 Preferencia térmica.....	45
III.1.2 Temperaturas de evitación.....	45
III.1.3 Temperaturas letales.....	46
III.1.4 Temperaturas críticas.....	50
III.1.5 Zonas térmicas.....	51
<i>III.2 Parámetros sanguíneos.....</i>	<i>53</i>
III.2.1 Cortisol.....	53
III.2.2 Glucosa.....	53
III.2.3 Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanina aminotransferasa (ALT).....	54
III.2.4 Eritrocitos.....	58
<i>III.3 Supervivencia.....</i>	<i>58</i>
Capítulo IV. DISCUSIÓN.....	60

CONTENIDO (continuación)

<i>IV.1 Termorregulación por comportamiento.....</i>	60
<i>IV.2 Parámetros Sanguíneos.....</i>	66
<i>IV.3 Aspectos Biológico-Pesqueros.....</i>	72
Capítulo V. CONCLUSIONES.....	83
Capítulo VI. RECOMENDACIONES.....	85
LITERATURA CITADA.....	87

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1	Sardina del Pacífico (<i>Sardinops sagax caeruleus</i>).....	4
2	Distribución de <i>Sardinops sagax caeruleus</i>	4
3	Distribución de las tres subpoblaciones de sardina en las diferentes épocas del año (Tomado de Félix-Uraga <i>et al.</i> , 2004).....	8
4	Fluctuación térmica de los ciclos durante los 20 días de aclimatación de las sardinas.....	27
5	Sistema utilizado para la aclimatación de las sardinas a las fluctuaciones térmicas.....	28
6	Gradiente térmico utilizado para evaluar la preferencia térmica de <i>S. sagax caeruleus</i>	29
7	Curva patrón para la determinación de la concentración de cortisol en plasma.....	37
8	Hematocitómetro.....	43
9	Preferencia térmica de <i>Sardinops sagax caeruleus</i> aclimatada al ciclo simétrico (CS) y asimétrico (CA) de verano (18-23 °C) e invierno (13-18 °C).....	47
10	Distribución de los datos de preferencia térmica de las sardinas expuestas a los diferentes fluctuaciones térmicas.....	48
11	Temperaturas de evitación de <i>S. sagax caeruleus</i> aclimatada a los ciclos simétrico (CS) y asimétrico (CA) de verano (18-23 °C) e invierno (13-18 °C).....	49
12	Concentración de cortisol en el plasma de las sardinas aclimatadas a temperatura óptima (18 °C), a los ciclos simétricos de invierno y verano (CS-INV y CS-Ver) y asimétricos (CA-INV y CA-Ver).....	55
13	Concentración de glucosa en el plasma de las sardinas aclimatadas a la temperatura óptima (18 °C).....	55

LISTA DE FIGURAS (continuación)

14	Concentración plasmática de aspartato aminotransferasa (AST) en sardinas aclimatadas a la temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos (CS-Inv y CS-Ver) y asimétricos (CA-Inv y CA-Ver) de invierno y verano.....	57
15	Concentración plasmática de alanina aminotransferasa (ALT) en sardinas aclimatadas a la temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos (CS-Inv y CS-Ver) y asimétricos (CA-Inv y CA-Ver) de invierno y verano.....	57
16	Número de eritrocitos en sardinas aclimatadas a la temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos (CS-Inv y CS-Ver) y asimétricos (CA-Inv y CA-Ver) de invierno y verano.....	59
17	Supervivencia de <i>S. sagax caeruleus</i> aclimatada a temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos (CS:13-18 °C y CS:18-23 °C) y asimétricos (CA:13-18 °C y CA:18-23 °C) de la fluctuación invierno y verano.....	59
18	Zona geográfica que contiene las temperaturas óptimas para la subpoblación templada de <i>S. sagax caeruleus</i> a lo largo del año, con base en las temperaturas de evitación.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Parámetros fisicoquímicos del agua durante la aclimatación de las sardinas a las diferentes fluctuaciones térmicas.....	26
II	Concentración de cortisol de los estándares utilizados en la curva patrón.....	36
III	Preparación de muestras y reactivos para la determinación de glucosa.....	39
IV	Límites térmicos de <i>S. sagax</i> aclimatada a los diferentes termociclos. Temperatura crítica máxima y mínima (TCMax y TCMin), temperatura letal incipiente superior e inferior (TLIS y TLII), temperatura de evitación superior e inferior (TES y TEI), preferencia térmica (PT).....	52
V	Zonas de preferencia (ZP), tolerancia (ZT) y resistencia (ZR) térmica de <i>S. sagax caeruleus</i> expuesta a las fluctuaciones térmicas de verano e invierno y a los ciclos simétrico y asimétrico.....	52

Capítulo I

Introducción

La pesca es una de las principales actividades que el hombre realiza para la obtención de alimento y sustento económico (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1995). En el reporte más reciente de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), se documentó una producción total por pesca y acuicultura de alrededor de 150 millones de toneladas en nivel mundial (FAO, 2008). En México, esta actividad representa una importante fuente de alimento, así como la generación de empleos y divisas por la exportación de sus productos. Hoy en día son cientos las especies que son capturadas en nivel mundial, dentro de las cuales se encuentran los peces pelágicos como las sardinas.

El desarrollo económico de varias entidades costeras se ha atribuido a la captura de sardina, ya que es un producto altamente comercial (Schweigert, 2002). La sardina es una de las principales especies pelágicas explotadas por la pesca mexicana, con una producción de 268 943 toneladas durante el año 2006 (Hill *et al.*, 2009). La sardina tiene un papel importante en los ecosistemas, ya que representa una fuente de alimento para otros organismos marinos como peces, mamíferos y aves (COSEWIC, 2002). Por su importancia en la red alimentaria marina se le ha llamado “forraje del ecosistema” (Allocation of the Pacific Sardine

Harvest Guideline, 2003). Además, este pez es considerado como un recurso natural de gran relevancia, ya que es fuente de alimento para el hombre (Frimodt, 1995) y también un ingrediente indispensable en alimentos formulados para otros organismos terrestres y marinos, como cerdos, vacas, aves, camarones y peces.

Existen en el mundo alrededor de 18 especies de sardinias (COSEWIC, 2002). Una de las más importantes por su abundancia y volumen de captura es la sardina del Pacífico (*Sardinops sagax caeruleus*) (Figura 1). Ésta es una especie pelágica que habita en áreas templadas y subtropicales altamente productivas y se encuentra distribuida desde el sur de Alaska hasta el Golfo de California, México (Culley, 1971; COSEWIC, 2002) (Figura 2).

Sardinops sagax caeruleus es una especie de hábitos alimenticios omnívoros que se alimenta principalmente de copépodos y diatomeas (Ahlstrom, 1960; McFarlane y Beamish, 2001). El intervalo de temperatura de su hábitat oscila entre los 7 y 28 °C, aunque durante el período de reproducción se le encuentra en aguas con temperaturas de 13 a 22 °C; sin embargo esto depende de la subpoblación, ya que subpoblaciones del Golfo de California se reproducen en aguas más cálidas (Ahlstrom, 1960; Llunch-Belda *et al.*, 1991). Estas temperaturas (13 – 22 °C) son comunes en el Norte del Pacífico como en California, específicamente en el territorio mexicano en la Península de Baja California y lugares aledaños (COSEWIC, 2002). Se ha documentado que el cambio de temperatura tiene un efecto sobre la distribución horizontal y vertical de

la sardina (Lynn, 2003), así como en la composición de tallas de un año con respecto a otro (McFarlane *et al.*, 2005).

Estos organismos se caracterizan por su rápido crecimiento y alta tasa de reproducción. Otra de sus particularidades es que forma grandes cardúmenes (Whitehead, 1985) y no se les encuentra en un mismo lugar a lo largo del año, debido a que migra hacia diferentes zonas del continente, dependiendo principalmente del cambio de la temperatura en el agua y de la disponibilidad de alimento (Hart, 1938, 1943a; Ware, 2001). También se ha observado que a medida que aumenta la edad de la sardina, incrementa la distancia de migración horizontal (Hart, 1973); sin embargo, las larvas de la sardina también migran verticalmente (Fletcher, 1999; Stenevik, 2001).

I.1 El estudio de las sub-poblaciones de sardina

A principios del siglo XX, existía una gran industria de pesca y enlatado de sardina en la costa Oeste de Canadá y Noroeste de los Estados Unidos, sin embargo, en la década de los 40 el volumen de pesca comenzó a disminuir hasta que las pesquerías colapsaron por la desaparición de la sardina en esa zona. Dicho colapso atrajo la atención de la comunidad científica y llevó a los investigadores a estudiar sus causas, así como la dinámica poblacional de la especie con el objetivo de evitar una nueva sobreexplotación (Radovich, 1982; Hill *et al.*, 2005).

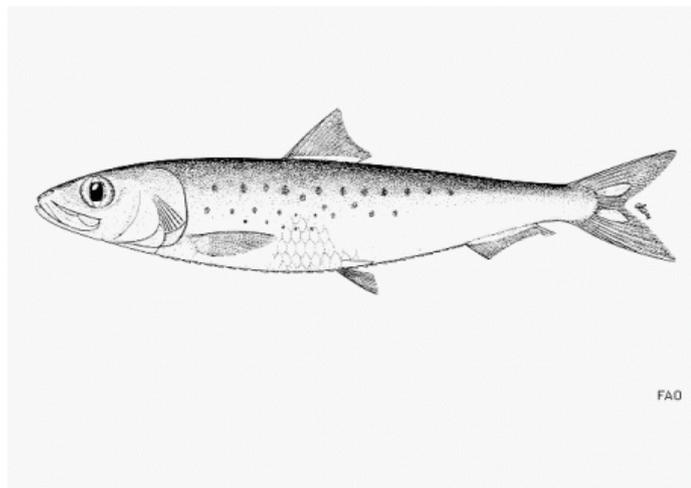


Figura 1. Sardina del Pacífico (*Sardinops sagax caeruleus*).

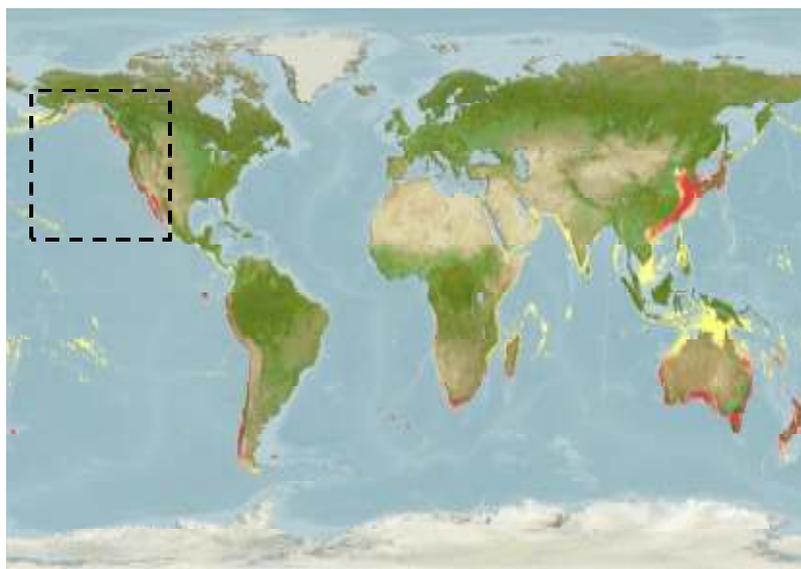


Figura 2. Distribución de *Sardinops sagax caeruleus*. El cuadro (- - -) muestra el intervalo de distribución de la sardina que comprende desde las costas de Sonora y Baja California Sur hasta el Sur de Alaska. Imagen obtenida de FishBase.org (<http://www.fishbase.ca/tools/aquamaps/search.php>).

Smith (2005) argumentó que es importante conocer la distribución y movimiento migratorio de la sardina para establecer principios de manejo de la pesquería, a fin de reducir el riesgo de sobrepesca y evitar un desastre ecológico. Durante varias décadas, los científicos han estudiado el comportamiento y ciclo de vida de esta especie, llegando a la conclusión de que su dinámica poblacional es compleja y en algunas ocasiones no tiene un patrón constante (Lasker, 1964; Hamman *et al.*, 1988; Lo *et al.*, 1996).

Una de las primeras hipótesis acerca de la distribución de las poblaciones de sardina, fue la existencia de diferentes sub-poblaciones de la misma especie, debido a que cuando ocurrió el colapso de la pesquería, solamente sucedió en la parte Norte del Continente (Canadá y Norte de los Estados Unidos), mientras que en lugares sureños como Baja California no hubo tal colapso. A partir de dicha hipótesis, se ha intentado diferenciar a estas sub-poblaciones de sardinas con el objetivo de establecer adecuados programas de pesca (Radovich, 1982).

Se han realizado estudios de diferenciación fenotípica entre las distintas sub-poblaciones de sardina tales como el recuento de las vertebras, morfometría del cuerpo completo, morfometría de los otolitos, las tasas de crecimiento, entre otros (Clark, 1936, 1947; Phillips, 1948; Vrooman, 1964; Hedgecock *et al.*, 1989; Félix-Uraga *et al.*, 2005; De la Cruz-Agüero y García Rodríguez, 2005) los cuales han demostrado que existen diferencias entre las sardinas del norte (Washington, Oregón y California) con respecto a las sardinas del sur (Baja California y Golfo de California). Sin embargo, los estudios de genética, específicamente el análisis de

las aloenzimas, las secuencias nucleotídicas y microsatélites, no detectan diferencias significativas entre las sub-poblaciones, por lo que las diferencias fenotípicas podrían deberse a un efecto de condiciones ambientales sobre la ontogenia y el desarrollo de las sardinas (Hedgecock *et al.*, 1989; Lacomte *et al.*, 2004; Gutiérrez-Flores, 2007; Ríos-Vargas, 2007). Los estudios mostraron la existencia de diferentes sub-poblaciones con características fenotípicas específicas, sin embargo, con base en estos datos tampoco es posible establecer límites geográficos precisos en cuanto a su distribución y migración, ya que sólo se indica si existen diferencias entre los organismos de una determinada zona geográfica y otra.

Una de las primeras aproximaciones para determinar la distribución de sub-poblaciones de esta especie comenzó con el trabajo de Félix-Uraga y colaboradores (1996), quienes con base en las capturas a lo largo de la Península de Baja California observaron que los volúmenes de captura de sardina más altos se producían en Ensenada y Bahía Magdalena, mientras que en la zona geográfica que los divide, los volúmenes de captura eran muy bajos. Esto sugirió la existencia de dos sub-poblaciones distintas; además, se observó que las temperaturas en las que se encontraban estas sub-poblaciones eran diferentes, siendo alrededor de 18 °C para Ensenada y 23 °C para Bahía Magdalena, lo cual permitió inferir que no solamente ocupaban espacios diferentes sino que su hábitat térmico era distinto. Posteriormente, los análisis de las capturas y temperaturas registradas a lo largo de 21 años (1981 - 2002) en San Pedro,

Ensenada, Isla Cedros y Bahía Magdalena, demostraron la existencia de tres distintas sub-poblaciones de sardina, las cuales estaban divididas por barreras térmicas. El stock frío o norteño se distribuía en un rango de temperatura de 13 - 17 °C, el stock templado en 17 - 22 °C y el stock cálido > 22 °C (Félix-Uraga *et al.*, 2004). Con estos resultados se propuso un modelo de distribución y migración con respecto a las diferentes estaciones del año (Figura 3).

A pesar de que varios estudios han contribuido al avance en el conocimiento de la dinámica poblacional, no puede ignorarse el hecho de que los estudios de campo, son observacionales y no experimentales, lo que impide el aislamiento de variables que pudieran tener un efecto que erróneamente podría atribuirse a la temperatura. Por lo tanto, es posible que los estudios de laboratorio aporten datos importantes acerca del efecto de la temperatura sobre el comportamiento de las sardinas así como sobre su fisiología.

I.2 Temperatura

Los diversos estudios realizados en estos organismos han aportado la información sobre la dinámica poblacional y la pesquería, sin embargo, se considera que se sabe poco acerca de sus hábitos y fisiología, así como de su tolerancia a diferentes factores fisicoquímicos (Schweigert, 2002). Diversos factores biológicos y fisicoquímicos se han asociado a su patrón de vida (crecimiento, reproducción y migración), dentro de ellos posiblemente el más

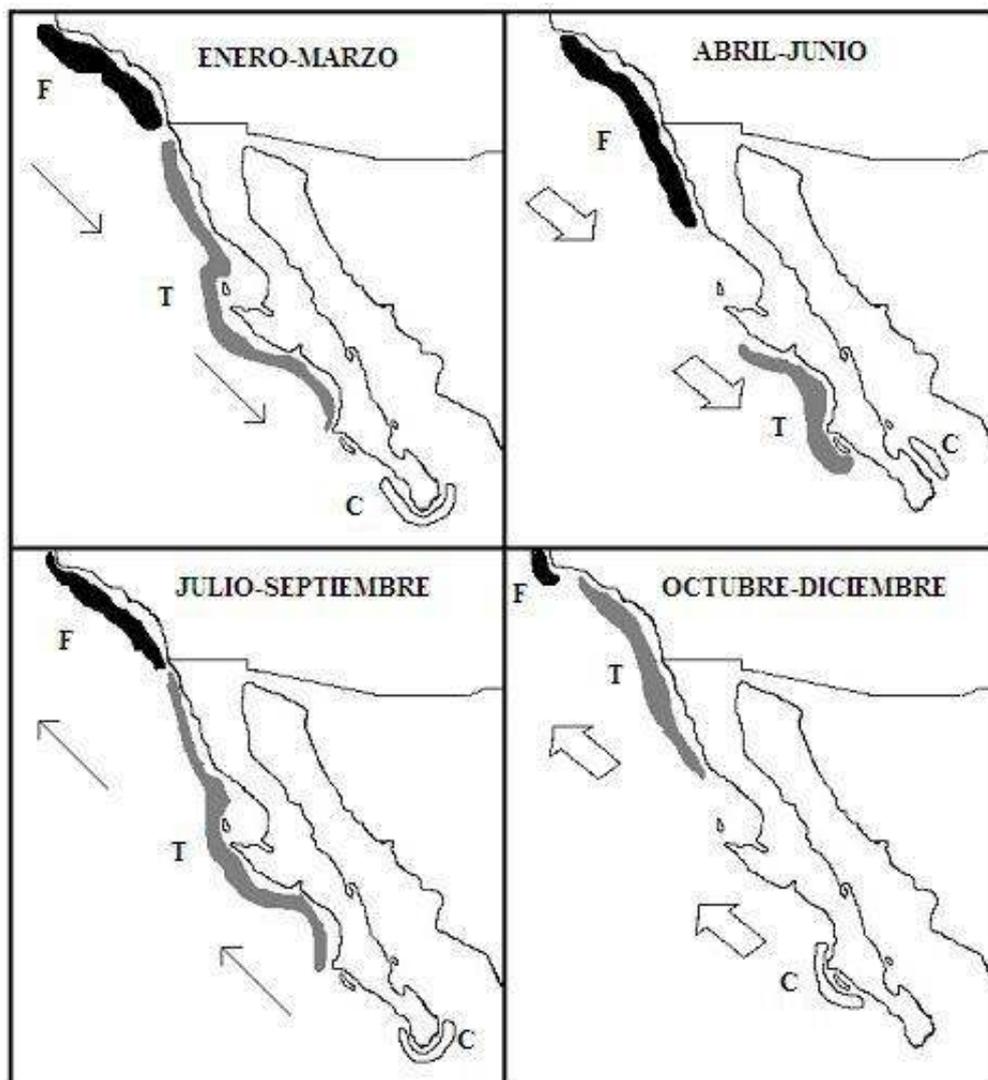


Figura 3. Distribución de las tres subpoblaciones de sardina en las diferentes épocas del año (Tomado de Félix-Uraga *et al.*, 2004). Subpoblación fría (F), templada (T) y cálida (C).

importante es la temperatura (Hart, 1938; Llunch-Belda *et al.*, 1991; Ware, 2001; Lynn, 2003).

La temperatura, es un factor físico que tiene un efecto sobre el metabolismo y la reproducción de todos los organismos, pero es particularmente importante en los organismos acuáticos, los cuales están directamente expuestos a la temperatura del agua. Cuando la temperatura del agua no es la adecuada en los organismos poiquiloterms, se produce un efecto sobre el metabolismo (Prosser, 1986; Huey y Bennett, 1990; Cifuentes-Lemus *et al.*, 1997) por encontrarse fuera de su óptimo fisiológico e incluso dentro de la zona de temperatura óptima la alteración de 1 o 2 grados centígrados produce modificaciones en la tasa metabólica de los peces. En situaciones extremas, la actividad del organismo disminuye drásticamente, con la posibilidad de llegar a un estado de coma o de muerte (Currie *et al.*, 1998; Makarieva *et al.*, 2006). Por el contrario, cuando la temperatura incrementa más allá de las condiciones óptimas, el metabolismo aumenta drásticamente, causando un comportamiento de actividad anormal debido a un daño parcial al sistema nervioso, el cual puede ser irreversible dependiendo de la intensidad y tiempo de exposición (Prosser y Nelson, 1981; Huey y Bennett, 1990).

La temperatura es un factor que influye en gran medida sobre el ciclo de vida de la sardina y por ende en su distribución y movimiento poblacional. Sin embargo, los estudios de campo no proporcionan la información acerca de los límites térmicos de esta especie, lo cual es una herramienta útil para conocer su

dinámica poblacional y además predecir el efecto que un fenómeno climatológico (como El Niño o calentamiento global) podría tener sobre la población y su distribución.

Existen estudios de laboratorio en los cuales se evalúan las respuestas específicas en los organismos a la temperatura y se conocen como termorregulación o comportamiento térmico. Las respuestas de los animales a la temperatura sirven para inferir los límites térmicos de tolerancia y resistencia (Fry, 1942; Brett, 1946; Armour, 1991). Dentro de estos límites se encuentra la temperatura preferida o preferendum térmico, las temperaturas de evitación, las letales incipientes y las críticas de los peces (Brett, 1946).

La temperatura preferida o preferendum final (PF) según la definición de Fry (1947) es *“la temperatura a la cual los organismos se congregan en un gradiente térmico sin considerar su aclimatación previa”*; Armour (1991) definió el “prerferdum final” de los peces de manera similar: *“la zona térmica seleccionada por los peces independientemente de su historia térmica”*. Esta zona es identificada como el intervalo térmico en donde el pez encuentra su óptimo fisiológico, lo cual maximiza la probabilidad de sobrevivir, crecer y reproducirse, (tomando en cuenta que las demás variables son constantes) (Jobling, 1981; Das *et al.*, 2005). El PF se obtiene mediante el uso de un gradiente térmico, en el cual los organismos son colocados y eligen libremente cierta temperatura que es óptima para su especie (Cincotta y Stauffer, 1984; Konecki *et al.*, 1995, Bückle *et al.*, 2003).

La zona de preferencia térmica se encuentra delimitada por las temperaturas de evitación superior (TES) e inferior (TEI) y son básicamente las temperaturas inferiores o superiores que los peces visitan con menor frecuencia dentro de un gradiente térmico. Estas temperaturas constituyen para el organismo la zona biocinética que le permite conservar su habilidad para realizar sus funciones fisiológicas e incluso reproducirse. Fuera de dichos límites, la temperatura produce un efecto negativo sobre el funcionamiento bioquímico y fisiológico de los organismos, que se incrementa a medida que se aleje de esas temperaturas (Alpaugh, 1972; Currie *et al.*, 2004).

Fuera del intervalo de las temperaturas evitadas se encuentra la zona de tolerancia, delimitada por la temperatura letal incipiente superior (TLIS) e inferior (TLII); en estas temperaturas el 50 % de la población muere en un período de 24 a 96 horas mientras que el resto sobrevive por tiempo indefinido (Fry *et al.*, 1942; Wilson y Nagler, 2006; Cook *et al.*, 2006). Este tipo de mediciones se utilizan como parámetro para conocer si una población podría sobrevivir bajo condiciones determinadas, ya que aunque la mitad de una población puede sobrevivir por tiempo indefinido no son capaces de reproducirse. Por ejemplo, la sardina del Pacífico tolera un intervalo de temperatura de 7 a 28 °C, pero ciertas subpoblaciones solo se reproducen de 13 a 22 °C (Ahlstrom, 1960; Llunch-Belda *et al.*, 1991).

La zona de resistencia se encuentra delimitada por la temperatura crítica mínima (TCMin) y máxima (TCMax). En estas temperaturas el sistema nervioso de

los peces se descontrola y colapsa, lo que provoca que el organismo pierda su capacidad locomotora (Nelson y Prosser, 1981). Según la definición original de Cowles y Bogert (1944), cuando un organismo experimenta su temperatura crítica, *“la actividad locomotora del organismo se desorganiza y los organismos pierden la capacidad de escapar de condiciones que lo llevarán rápidamente a la muerte”*. De manera similar, Cox (1974) definió a la temperatura crítica como *“la media aritmética de los puntos térmicos en donde la actividad locomotora de los organismos se desorganiza y pierden la capacidad de escapar de condiciones que los llevarán rápidamente a la muerte”*.

Existen diversos factores que pueden afectar los límites térmicos de los peces, por ejemplo: niveles de oxígeno, *“baggage”* o carga genética, historia térmica, fotoperiodo, entre otros (Mattyews y Mannes, 1979; Benfley *et al.*, 1997; Elliott y Elliott, 1995; Mahoney y Hutchison, 1969). Sin embargo, la temperatura se destaca como uno de los factores que tiene mayor influencia sobre el comportamiento y los límites de distribución de los peces (Roots y Prosser, 1962; Ziegeweid *et al.*, 2008). Konecki *et al.* (1995) estudiaron la preferencia térmica de dos poblaciones de salmón (*Oncorhynchus kisutch*), y encontraron que la temperatura preferida de salmones que se encontraban en un hábitat con un intervalo de temperatura de 6 - 16 °C fue de 9.6 °C, en tanto que la población que experimentaba un intervalo de 7 - 21 °C tuvo una temperatura preferida de 11.6 °C. A este respecto Johnson y Kelsch (1998), mencionan que en la mayoría de los

estudios la historia térmica de los peces tiene un efecto directamente proporcional sobre su preferencia térmica.

En diferentes especies de peces se han evaluado los límites letales, por ejemplo en la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) aclimatada a temperaturas de 24, 28 y 32 °C, la TLIS fue de 38 °C en los peces que experimentaron 24 °C, mientras que aquellos expuestos a los tratamientos de 28 y 32 °C tuvieron una TLIS de 39 °C (Del Rio Zaragoza *et al.*, 2008). También, Carveth y colaboradores (2007) aclimataron peces (*Meda fulgida*) a diferentes temperaturas con el objetivo de conocer su tolerancia térmica; los autores mencionan que a medida que aumentaba la temperatura de aclimatación más allá del óptimo (25 °C), la temperatura letal se incrementaba, pero la supervivencia y el crecimiento fueron afectados negativamente.

Das y colaboradores (2005) evaluaron la resistencia térmica de *Labeo rohita* a cuatro temperaturas, y comentan que a medida que la temperatura de aclimatación aumentaba, también lo hacía la TCM_{in} y la TCM_{ax}. Resultados similares fueron reportados por Currie *et al.* (1998) en perca americana, el bagre de canal y la trucha arcoíris mantenidos a distintas temperaturas.

Los resultados de los límites térmicos característicos de varias especies de peces, han sido utilizados en estudios en nivel biológico pesqueros y de fisiología básica, para establecer temperaturas de cultivo de peces, modelos de distribución, efecto de diversos contaminantes y otros factores sobre su comportamiento térmico (Armour, 1991). Su aplicación sería de gran utilidad en un

recurso de importancia económica como lo es la sardina del Pacífico. Hasta el momento, no existen reportes acerca del comportamiento térmico de la sardina del Pacífico o del efecto de la temperatura sobre su estado fisiológico. Estos datos serían fundamentales para complementar la información sobre la distribución geográfica y los movimientos migratorios de la sardina y también para establecer la plasticidad térmica de éste organismo, con lo cual se podría inferir su desempeño ante las variaciones del clima, así como para establecer mejores programas de pesca. Además, podrían caracterizarse las distintas subpoblaciones de sardina en base a sus límites térmicos.

Es importante conocer el efecto de la temperatura sobre la sardina, no sólo en términos de su comportamiento térmico, sino también en su funcionamiento y estado fisiológico. Este puede ser evaluado por diversas respuestas, incluyendo los parámetros sanguíneos, ya que algunas alteraciones bioquímicas en distintos órganos y tejidos se reflejan en la composición sanguínea. Esto puede ser evaluado en nivel hormonal, enzimático, iónico y de otros compuestos (Gilmour *et al.*, 2005; Mandelman y Farrington, 2007; Askarian y Koshua, 2009).

I.3 Parámetros sanguíneos

La sangre es un tejido fluido de constitución compleja cuya función principal es la distribución logística y sistemática de componentes esenciales hacia todo el cuerpo. Algunos de estos componentes han servido de base para el monitoreo del

estado de estrés o estatus fisiológico de organismos acuáticos (Shreck y Moyle, 1990). Los indicadores que han sido utilizados con más frecuencia son el cortisol, la glucosa, las enzimas aminotransferasas y los eritrocitos (Gilmour *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2006; Cooke *et al.*, 2008).

El cortisol es el glucocorticoide principal, que es segregado por el tejido interrenal localizado en la cabeza del riñón y por los nervios adrenérgicos de los peces teleósteos (Iwama *et al.*, 1999). También se le ha llamado la “hormona del estrés”. Este esteroide tiene una función glucocorticoide, es decir, promueve la liberación de glucosa hacia el torrente sanguíneo cuando el organismo requiere energía (Begg y Pankhurst, 2004). En condiciones de estrés, el requerimiento energético se incrementa significativamente, lo cual activa el eje “Hipotálamo-Pituitaria-Interrenal” (eje HPI), produciendo gran cantidad de hormona adrenocorticotrópica (ACTH por sus siglas en inglés) que a su vez actúa sobre la corteza interrenal, promoviendo la liberación de altos niveles de cortisol (Iwama *et al.*, 1999). Se ha documentado en peces teleósteos expuestos a condiciones de estrés, un incremento significativo en la concentración de cortisol o “cortisolemia”. Perez-Casanova y colaboradores (2008) evaluaron la respuesta inmune del bacalao (*Gadus morhua*) expuesto a incrementos de temperatura, encontrando que los niveles de cortisol aumentaron hasta tres veces cuando la temperatura incrementó de 10 a 16 °C. Hanna *et al.* (2008) observaron que los niveles de cortisol de *Gadus macrocephalus* incrementaron después de ser expuestos a pruebas de mayor actividad natatoria.

El segundo indicador de estrés más utilizado es la glucosa, que es el carbohidrato que tiene la función más importante en la bioenergética de los animales. Ésta puede ser transformada en adenosín trifosfato (ATP) o energía química la cual posteriormente puede ser transformada en energía mecánica o utilizada por otros tejidos para formar diversos compuestos (Lucas, 1996). Cuando la demanda energética se incrementa, también aumenta la concentración de glucosa en la sangre (Nelson y Cox, 2005), lo cual capacita al pez para poder compensar el gasto energético adicional ocasionado por el estresor. A este respecto, Del Rio-Zaragoza y colaboradores (2008) indican que en la tilapia (*Oreochromis mossambicus*), la glucosa se incrementaba cuando era expuesta a pruebas de TCM_{ax} y TLIS. Los autores concluyeron que la glucosa podía ser un buen indicador de estrés térmico para esta especie. Costas *et al.* (2008) observaron en *Solea senegalensis* incrementos (> 40 %) en la glucosa plasmática por el efecto de la densidad de siembra mediana (9 kg/m²) y alta (14 kg/m²) en comparación con baja densidad (4 kg/m²).

En relación a las enzimas aminotransferasas, éstas están involucradas en el catabolismo de las proteínas para producir esqueletos carbonados. Esto ocurre cuando los niveles de carbohidratos no son suficientes para cubrir la demanda energética. Bajo tal escenario, el sistema del metabolismo energético utiliza vías alternas para obtener esqueletos carbonados que son producidos en parte, por acción de las aminotransferasas y procesados en la célula por medio del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs (Watts y Watts, 1974; Tiwari y Singh, 2004). Estas

enzimas no se incrementan bajo condiciones de estrés agudo como el cortisol y la glucosa y tampoco tienen un papel en la integración de la respuesta fisiológica del organismo ante condiciones adversas. Sin embargo, han sido ampliamente utilizadas para monitorear el estatus fisiológico de teleósteos, debido a que cuando un órgano interno (riñón, intestino, hígado, etcétera.) se daña, los componentes que se encuentran dentro de las células lisadas son vertidos hacia el torrente sanguíneo. Entre los componentes se incluyen a las enzimas aminotransferasas, su concentración en el plasma se incrementa por encima de los niveles basales de los organismos, indicando lesiones internas y por lo tanto siendo un indicador del estatus fisiológico (Ciereszko *et al.*, 1998).

Las aminotransferasas más utilizadas son la alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) (Morrissey *et al.*, 2005; Aragão *et al.*, 2008). En la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) expuesta a un insecticida organofosforado, las concentraciones de ALT y AST se incrementaron en el plasma y el riñón (Venkateswara Rao, 2006). Choi *et al.* (2006) evaluaron la respuesta al estrés de *Acanthopagrus schlegeli* incrementando la temperatura en condiciones de alta y baja salinidad, donde ALT y AST aumentaron con la temperatura en agua de baja salinidad, aunque no hubo cambios en agua de alta salinidad. Das *et al.* (2004) evaluaron en *Cirrhinus mrigala* el efecto de las concentraciones de amonio sobre la actividad de ALT y AST, que se incrementaron a medida que aumentaba la concentración de amonio.

Además de las enzimas, los compuestos químicos y las hormonas, también existen en la sangre otros constituyentes vitales que son las células sanguíneas como los eritrocitos y leucocitos, entre otros. Los eritrocitos o glóbulos rojos son las células de la sangre encargadas del transporte de oxígeno hacia los diferentes tejidos. Estas células contienen altas cantidades de hemoglobina, una heteroproteína encargada de ligar moléculas de oxígeno y liberarlas en el tejido que requiere el suministro de este elemento (Primett *et al.*, 1986). A diferencia de los eritrocitos de los mamíferos, estas células de los peces son nucleadas y ovaladas (Nikinmaa y Huests, 1984); no obstante, cumplen con una función similar a la de los mamíferos. Algunos estudios han utilizado el recuento de eritrocitos como un parámetro de adaptación y estatus fisiológico de los peces cuando son expuestos a diferentes condiciones. En el surubí pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), el número de eritrocitos y la concentración de otros componentes sanguíneos aumentan cuando es expuesto a manejo y transporte, pero vuelven a su estado basal después de 48 horas (Fagundes y Urbinati, 2008). En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se analizó el estatus fisiológico después de ser expuesta a diferentes fotoperiodos. Los resultados mostraron que hubo un efecto del fotoperiodo sobre el número de eritrocitos; aunque este incremento fue asociado con un estado de estrés, debido a las bajas concentraciones de oxígeno, lo cual se reflejó en un mayor porcentaje de mortalidad (Valenzuela *et al.*, 2008). La temperatura que experimenta un pez, ya sea en su medio natural o en condiciones de laboratorio, tiene un efecto directamente proporcional sobre la producción de eritrocitos, porque al incrementarse la temperatura del agua la

solubilidad del oxígeno disminuye y la demanda de oxígeno por parte del organismo se incrementa (Konstantinov y Zdanovich, 2007). En condiciones de temperatura sub-óptima el estrés causado provoca una demanda adicional de oxígeno, por lo que se requiere de una mayor cantidad de eritrocitos y aumento en el proceso de ventilación y ritmo cardiaco, para que el pez pueda cumplir con un adecuado suministro de oxígeno (Konstantinov y Zdanovich, 2007).

La alteración de algunos componentes sanguíneos ante diferentes factores permite que éstos constituyan una herramienta útil para evaluar si hay un efecto de la temperatura u otro factor sobre la fisiología de *S. sagax caeruleus*. Esto también puede utilizarse para complementar otros estudios tales como el comportamiento termorregulador.

La mayoría de los estudios sobre la temperatura en relación a la distribución y ciclo de vida de la sardina se han realizado en condiciones de campo, lo cual dificulta la tarea de evaluar el efecto de este factor sobre la fisiología de la sardina. Es por este motivo que los estudios de laboratorio que permiten aislar variables son de gran utilidad, ya que es factible evaluar el efecto de la temperatura sobre la fisiología de *S. sagax caeruleus* tales. Estos estudios aportan información valiosa acerca de sus límites térmicos y plasticidad fisiológica, que sirven para complementar los trabajos relacionados con los aspectos biológico-pesqueros al inferir los límites de la distribución geográfica de las poblaciones de sardina, su comportamiento migratorio y el efecto de la variación climática.

Hipótesis

Hipótesis general

El patrón de distribución de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus* la caracteriza como una especie altamente tolerante a los cambios de temperatura con capacidad de ajustar sus límites térmicos para mantener su estatus fisiológico.

Hipótesis específicas

Los límites térmicos de la sardina se modifican por la aclimatación previa a diferentes fluctuaciones térmicas, reflejando su plasticidad fisiológica.

Los indicadores de estrés (glucosa y cortisol) y del estado fisiológico (alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa) no se modifican por las fluctuaciones térmicas, debido a que la sardina puede aclimatarse a un amplio intervalo térmico.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de las fluctuaciones térmicas sobre los parámetros sanguíneos y el comportamiento termorregulador de *Sardinops sagax caeruleus*.

Objetivos Específicos

- Caracterizar la preferencia térmica de *S. sagax caeruleus* aclimatada a diferentes fluctuaciones térmicas.
- Caracterizar las temperaturas de evitación superior e inferior de la sardina.
- Caracterizar las temperaturas letales incipientes superior e inferior de *S. sagax caeruleus*.
- Establecer las temperaturas críticas máxima y mínima de *S. sagax caeruleus*.
- Evaluar el intervalo térmico al cual éstos organismos pueden aclimatarse.
- Estimar la localización de la zona térmica óptima para esta sub-población con base en los límites térmicos.

- Evaluar el efecto de las fluctuaciones térmicas sobre los parámetros sanguíneos de la sardina para conocer su estado de estrés y condición fisiológica.

Capítulo II

Materiales y Métodos

II.1 Obtención y manejo de organismos

Las sardinas se obtuvieron de la pesca comercial de Ensenada, B.C durante la época de Agosto-Septiembre de 2007 y 2008. Estos organismos pertenecían a la subpoblación templada según el estudio de Felix-Uraga *et al.* (2004). Los organismos fueron transportados en bolsas de plástico con 30 L de agua (25 peces/bolsa) a una temperatura de 21 °C. Previo al transporte, el agua de las bolsas fue sobresaturada de oxígeno ($> 7.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y cerradas herméticamente. Una vez en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, los organismos fueron colocados en estanques de 1500 L para administrarles un tratamiento con tetraciclina ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante tres días para eliminar posibles parásitos y patógenos, seguido de un tratamiento de “melafix” ($0.3 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) que promueve la reparación del daño en el tejido y las aletas.

Posteriormente, los organismos fueron aclimatados durante 15 días a condiciones de laboratorio a una temperatura de $20 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, oxígeno disuelto (OD) $5.79 \pm 0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, fotoperiodo 12:12, recambio de agua 300 %, pH 7.9 ± 0.1 ,

$\text{NH}_3\text{-NH}_4$: $0.2 \pm 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y alimentación *ad libitum* tres veces al día con un alimento para trucha con un 42 % de proteína (Silvercup).

II.2 Aclimatación

Para iniciar con los tratamientos de aclimatación, los organismos fueron transferidos a estanques circulares con una capacidad de 380 L; se utilizaron cuatro tanques por tratamiento y se colocaron 40 sardinas por cada estanque. Los peces fueron aclimatados a un ciclo simétrico de verano (CS-Ver) y otro de invierno (CS-INV) durante 20 días. En el CS-Ver la temperatura fluctuó de 18 a 23 °C en un período de 24 horas, manteniéndose durante siete horas a 18 °C, después aumentaba hasta 23 °C en cinco horas y se mantenía constante durante siete horas, finalmente disminuía hasta 18 °C en cinco horas (7-5-7-5). El CS-INV se diseñó de la misma manera, con la diferencia de que la temperatura fluctuó de 13 a 18 °C (Fig. 4).

Un segundo grupo de peces fue aclimatado a un ciclo asimétrico de verano (CA-Ver, 18 - 23 °C) e invierno (CA-INV, 13 - 18 °C) en donde la temperatura permanecía en el punto más alto durante cuatro horas y en el punto más bajo durante diez horas (10-5-4-5) (Fig. 4).

Adicionalmente se aclimataron sardinas a una temperatura óptima (18 °C) establecida en experimentos previos de termorregulación (Hernández *et al.*, en proceso). Este grupo de organismos se utilizó solo para comparar los valores de

los parámetros sanguíneos con las respuestas evaluadas en las fluctuaciones térmicas.

Se diseñó un sistema experimental con el objetivo de lograr las fluctuaciones térmicas deseadas (Fig. 5). Para disminuir la temperatura, se construyó un sistema de enfriamiento, el cual consistió de un reservorio externo con capacidad de 700 L, donde la temperatura del agua se mantuvo a 5 °C por dos enfriadores (Aqualogic Delta Star DS-7). Dentro del reservorio se colocó una bomba sumergible conectada a un controlador automático (Chontrol XT) programado para encender la bomba una vez que llegaba el momento de disminuir la temperatura; esta bomba suministraba agua fría a cada uno de los estanques experimentales a una tasa de 3 L·min⁻¹ hasta obtener la temperatura deseada (13 o 18 °C). Una vez que se alcanzaba la temperatura más baja de cada ciclo se inyectaba agua fría en lapsos de dos minutos cada 30 minutos, para mantener la temperatura.

Para aumentar la temperatura del agua, se colocó un calentador de titanio (1000 vatios) dentro de cada estanque, el cual se encendía una vez que el tiempo de exposición a la temperatura fría había terminado. Este calentador estaba conectado a una caja electrónica controladora de temperatura, que lo encendía o apagaba automáticamente. Cuando el agua alcanzaba la temperatura más alta, la caja controladora se encargaba de mantener la temperatura constante hasta el momento en que había que enfriar nuevamente.

La temperatura fue monitoreada cada 15 minutos durante los 20 días de aclimatación por un medidor de temperatura automático (StowAway® TidbiT™) colocado en cada estanque.

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los parámetros fisicoquímicos (OD, NAT, NO_2 , pH y salinidad) de cada tratamiento (Tabla I). La concentración de oxígeno tuvo un intervalo de 5.9 a 6.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabla I. Parámetros fisicoquímicos del agua durante la aclimatación de las sardinas a las diferentes fluctuaciones térmicas. Media \pm desviación estándar. Oxígeno disuelto (OD), nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (NO_2).

	Temperatura Óptima 18°C	Ciclo Simétrico Invierno 13-18°C	Ciclo Asimétrico Invierno 13-18°C	Ciclo Simétrico Verano 18-23°C	Ciclo Asimétrico Verano 18-23°C
OD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	6.02 \pm 0.11	6.04 \pm 0.06	6.01 \pm 0.04	5.92 \pm 0.11	5.95 \pm 0.05
NAT ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.12 \pm 0.10	0.12 \pm 0.10	0.09 \pm 0.06	0.16 \pm 0.12	0.14 \pm 0.03
NO_2 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.08 \pm 0.05	0.11 \pm 0.10	0.10 \pm 0.08	0.10 \pm 0.08	0.11 \pm 0.02
pH	7.82 \pm 0.05	7.77 \pm 0.05	7.80 \pm 0.04	7.80 \pm 0.08	7.82 \pm 0.05
Salinidad (‰)	33.5 \pm 1.0	33.6 \pm 0.5	33.1 \pm 1.6	33.6 \pm 0.6	33.6 \pm 0.5

II.3 Comportamiento termorregulador

Los estudios de comportamiento térmico se plasmaron después de 20 días de aclimatación; los organismos fueron extraídos una hora después de que el ciclo de aclimatación llegó a la temperatura más alta (18 o 23 °C).

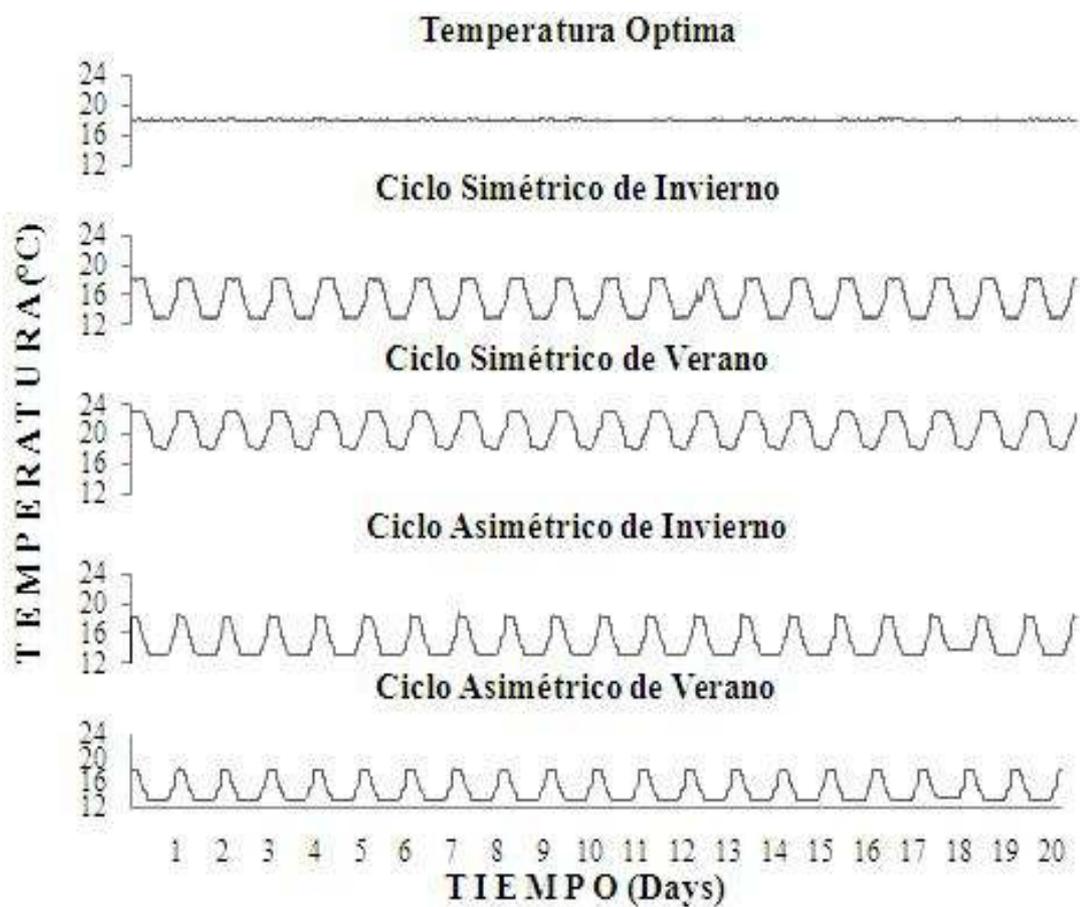
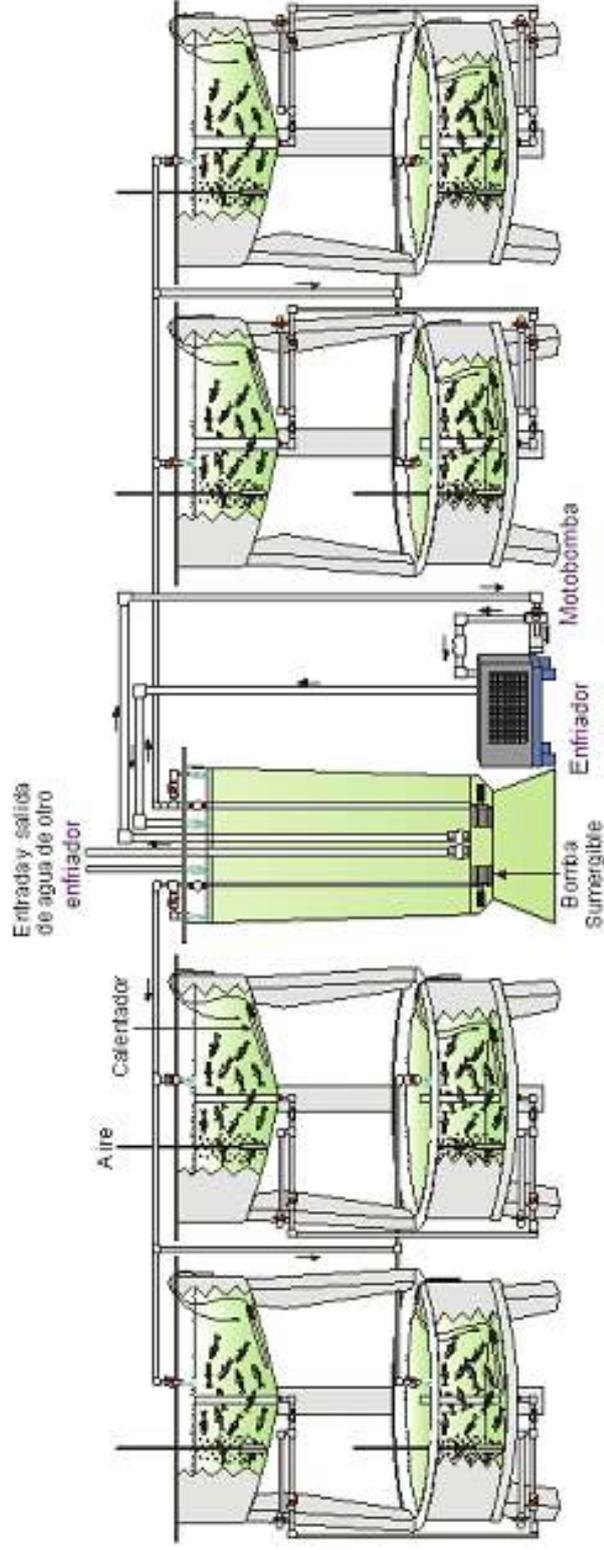


Figura 4. Fluctuación térmica de los ciclos durante los 20 días de aclimatación de las sardinas.

SISTEMA DE FLUCTUACIONES TERMICAS



Dibujo: Tec. Francisco Valenzuela Burrel

Figura 5. Sistema utilizado para la aclimatación de las sardinas a las fluctuaciones térmicas.

II.3.1 Preferencia térmica

Para evaluar la preferencia de temperatura se utilizó un gradiente térmico horizontal diseñado por Bückle *et al.* (2003). Este gradiente consta de un canal de acrílico horizontal de 3.05 m de largo, el canal está dividido en 15 cámaras virtuales; cada cámara tiene un sensor de temperatura conectado a un termógrafo (Stanford Research RS 360) que registra la temperatura cada 10 minutos. En uno de los extremos se calienta el agua con dos calentadores de titanio de 1000 vatios conectados a cajas controladoras, mientras que en el extremo opuesto el agua es enfriada a través un enfriador (Neslab HX-100). La estratificación es eliminada por una manguera de aireación colocada en la parte inferior e interior a lo largo del gradiente (Fig. 6).

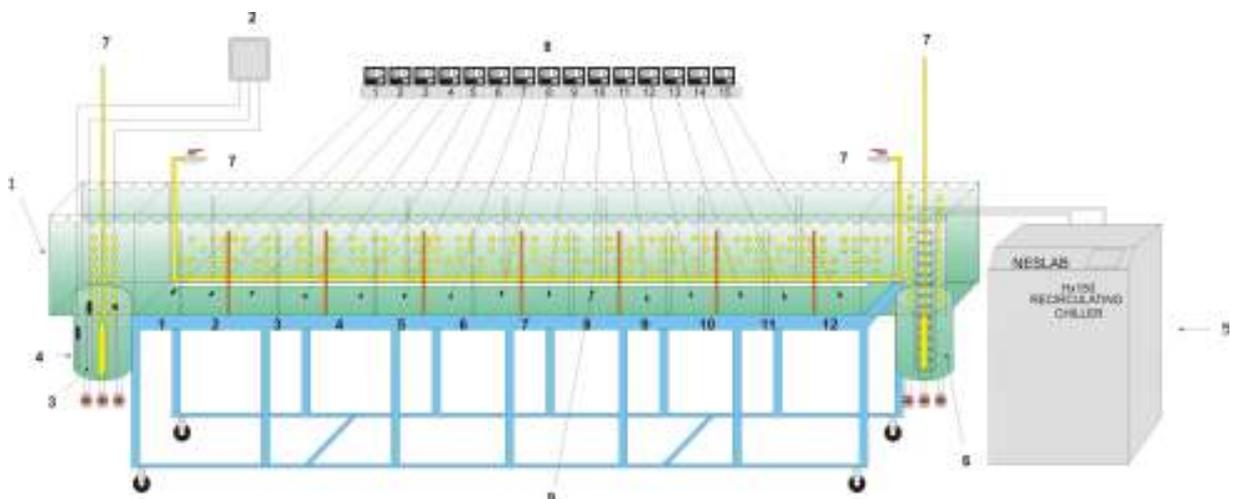


Figura 6. Gradiente térmico utilizado para evaluar la preferencia térmica de *S. sagax caeruleus*.

Cuatro sardinas fueron colocadas dentro del gradiente en la cámara que tenía una temperatura similar al momento de extraerlas del estanque de

aclimatación. Después de 30 minutos se quitaron las divisiones que mantenían las sardinas cautivas y se les dio acceso libre a todo el gradiente.

La preferencia térmica (PT) de las sardinas fue monitoreada cada hora registrando las temperaturas de las cámaras en donde se encontraban durante 24 horas. Al final del experimento, se promediaron las temperaturas y se obtuvo un valor de PT.

El intervalo de temperaturas en el gradiente fue de 10 - 21 °C para los organismos aclimatados al ciclo de invierno y para las sardinas de la fluctuación de verano fue de 15 - 26 °C.

II.3.2 Temperaturas de evitación

Las temperaturas de evitación superior (TES) e inferior (TEI) se conocieron con un histograma de frecuencias relativas de las temperatura de las cámaras que fueron menos visitadas por las sardinas a lo largo del experimento. Se realizó una repetición por cada estanque.

Los valores de las temperaturas de evitación superior e inferior se utilizaron para estimar el intervalo de preferencia térmica (IPT) de la sardina.

II.3.3 Temperaturas letales

La temperatura letal incipiente superior (TLIS) fue evaluada mediante el método de Kilgour *et al.* (1986), el cual expresa la relación entre el tiempo medio de muerte y la temperatura experimental. En cuatro acuarios de 55 litros con

aireación y recambio de agua ($1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) se establecieron diferentes temperaturas, las cuales se mantuvieron constantes con calentadores de titanio. Para los ciclos de invierno se utilizaron 24, 25, 26 and 27 °C y en los ciclos de verano fueron 25, 26, 27 y 28 °C. Se extrajeron 16 sardinas de un tanque y se distribuyeron al azar en grupos de cuatro sardinas por acuario. Se registró el tiempo en el que se colocaron los organismos y el momento en el que se produjo la muerte de cada pez hasta obtener el 50 % de mortalidad en cada temperatura. El tiempo medio de mortalidad se calculo mediante la fórmula 1:

$$1. m(t) = \frac{1}{t}$$

Donde m es el tiempo medio de muerte y t es el tiempo en el que murió el 50 % de las sardinas.

Para linealizar la curva de la tasa de mortalidad obtenida mediante la fórmula anterior, los datos fueron transformados mediante la ecuación 2:

$$2. m^{1/n}$$

Donde n es una constante derivada del modelo de Kilgour *et al.* (1986), y se estimó un valor igual a 2 con base en la recomendación del mismo autor.

Los resultados fueron graficados y linealizados para conocer el punto de intersección con el eje de las abscisas que caracteriza el valor de la TLIS estimada con el modelo.

El mismo método fue utilizado para medir la temperatura letal incipiente inferior (TLII) en donde los baños térmicos fueron de 6, 7, 8 y 9 °C para los ciclos de invierno y 7, 8, 9 y 10 °C en la fluctuación de verano; estas temperaturas se mantuvieron constantes con un enfriador (Neslab HX-100).

Los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante el método de Spearman (Trimmed Spearman-Kraber method, 340,101), que a diferencia del modelo de Kilgour y colaboradores (1986), se obtuvo la supervivencia en un período de 12 horas para obtener la TL_{50} que representó la TLIS. En el caso de la TLII el tiempo de exposición fue de una hora y posteriormente los organismos fueron colocados en estanques de 60 litros con temperatura a 18 °C por 24 horas; finalmente se obtuvo la supervivencia y los datos fueron analizados programa mencionado.

En este tipo de experimentos se requirió de un mayor número organismos, por tal motivo, solo se realizaron dos repeticiones para cada baño de temperatura.

La TLIS y TLII fueron utilizadas para estimar el intervalo de tolerancia (IT) de esta especie.

II.3.4 Temperaturas críticas

Para evaluar la temperatura crítica máxima (TCMax), se colocaron dos sardinas en un acuario de 0.5 x 0.25 x 0.3 m que contenía 25 litros de agua, una piedra de aireación y un calentador de titanio de 1000 vatios para incrementar la temperatura a una tasa constante. La temperatura del agua era similar a la del

estanque experimental al momento de ser extraídas las sardinas. Una vez que los peces estaban dentro del acuario se dejaron por un período de 20 minutos para disminuir el estrés causado por el manejo; después, la temperatura del agua se incremento a una tasa de $1.1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, hasta que se observó la respuesta de pérdida de equilibrio (PE) sin recuperación, la cual caracterizó el punto final de la TCMax. En experimentos previos en donde se observaron diferentes respuestas (tremor, espasmos musculares y PE) por estrés térmico ascendente y descendente se estableció que la PE caracteriza la TCMax y TCMIn, por ser una respuesta consistente y con menor variabilidad que las otras.

La TCMIn se realizó con un protocolo similar. La temperatura disminuyó a una tasa de $0.78\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ a partir de inyección de agua fría ($1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) en un extremo del acuario, mientras que en el lado opuesto se drenaba el mismo volumen de agua que entraba hasta registrar la respuesta de PE.

Estos experimentos se repitieron cuatro veces por cada acuario para la TCMax y TCMIn. Los valores de las temperaturas críticas fueron utilizados para estimar el intervalo de resistencia térmica (IRT) de *S. sagax caeruleus*.

II.3.5 Zonas térmicas

Las zonas térmicas se establecieron utilizando los intervalos de preferencia, tolerancia y resistencia térmica, calculando el área formada entre los ciclos de invierno y verano y expresándose en $^{\circ}\text{C}^2$.

II.4 Parámetros sanguíneos

Todos los parámetros sanguíneos a excepción de los eritrocitos fueron medidos al final de cada ciclo de aclimatación cuando la temperatura del ciclo se encontraba en el valor mínimo y en el máximo. Los eritrocitos fueron medidos cuando las sardinas se encontraban en la temperatura más alta (18 y 23 °C) debido a que la respuesta de este parámetro es mucho más lenta que las de hormonas, enzimas o químicos sanguíneos.

II.4.1 Obtención de muestra

La muestra de sangre se extrajo de 20 peces por cada estanque, de los cuales diez organismos se tomaron cuando la temperatura era de 18 y 23 °C para los ciclos de invierno y verano respectivamente. Un segundo grupo de diez organismos se extrajo cuando la temperatura disminuyó a su valor más bajo del ciclo (INV-13 y Ver-18 °C).

Las sardinas fueron anestesiadas inmediatamente con 2-fenoxietanol (0.3 mL·L⁻¹). Posteriormente a cada organismo se le extrajo un volumen de sangre de alrededor de 1 mL por medio de una punción directa al corazón con una jeringa para insulina. La sangre extraída fue transferida a tubos heparinizados (Microtainer Brand[®]) con capacidad de 1 mL. Se agitó suavemente el tubo con la muestra de sangre para que tuviera contacto con las paredes heparinizadas y evitar la formación de pequeños coágulos. Después, se centrifugó la muestra a 10000 r.p.m. por diez minutos para obtener el plasma, el cual fue colocado en

tubos de plástico (1 mL) estériles y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

Todos los métodos utilizados para medir los parámetros sanguíneos son aprobados por la Federación Internacional de Química Clínica (International Federation of Clinical Chemistry-IFCC). La funcionalidad de las pruebas de Glucosa, AST y ALT fue corroborada mediante el uso de un suero control (Randox Human Assayed Multi-Sera [Level 2], HN 1530).

II.4.2 Cortisol

Esta hormona fue determinada mediante una prueba de inmunoabsorbancia (ELISA) por medio de un kit (NEOGEN[®], #402710).

II.4.2.1 Curva patrón

Primeramente, se preparó una curva de estándares para conocer la concentración de cortisol en las muestras de plasma (Tabla II). Posteriormente se determinó el número de pozos a utilizar de la microplaca; en este caso se requirieron ocho pozos por cada curva por tres repeticiones (24 pozos).

A partir del número de pozos, se preparó una solución de “conjugado de enzima” (Cortisol Enzyme Conjugate [HRP]). Por cada pozo se agregó 1 μL de conjugado de enzima en 50 μL de buffer EIA, es decir, 24 μL de conjugado de enzima + 1200 μL de buffer EIA. De esa mezcla, se agregaron 50 μL a cada pozo más otros 50 μL de los estándares.

Después de una hora se vaciaron los pozos y se lavaron tres veces con buffer de lavado previamente diluido en agua des ionizada (1:10); para ello se agregaron 300 μL de buffer de lavado a cada pozo, se mezcló y se vació el contenido en tres ocasiones.

Tabla II. Concentración de cortisol de los estándares utilizados en la curva patrón.

Estándar	Concentración ng/mL	Buffer EIA	Estándar B (μL)	Estándar C(μL)	Estándar D (μL)
E₀	0	<i>Como está</i>	-	-	-
E₁	0.04	800	-	-	200
E₂	0.1	500	-	-	500
E₃	0.2	-	-	-	<i>Como está</i>
E₄	0.4	800	-	200	-
E₅	1	500	-	500	-
E₆	2	-	-	<i>Como está</i>	-
E₇	10	500	500	-	-

Finalmente, se añadieron 150 μL de substrato (K-Blue Substrate [TMB]) a cada uno de los pozos y se incubó la microplaca a una temperatura de 25 °C durante 30 minutos para que el substrato se uniera a los anticuerpos. Las muestras se leyeron con un lector de microplaca (Backman, AD200) a una longitud de onda de 650 nm, en donde las absorbancias se transformaron en porcentajes, tomando como 100% la absorbancia de E₀ y posteriormente fueron ajustados a una curva logarítmica (Fig. 7).

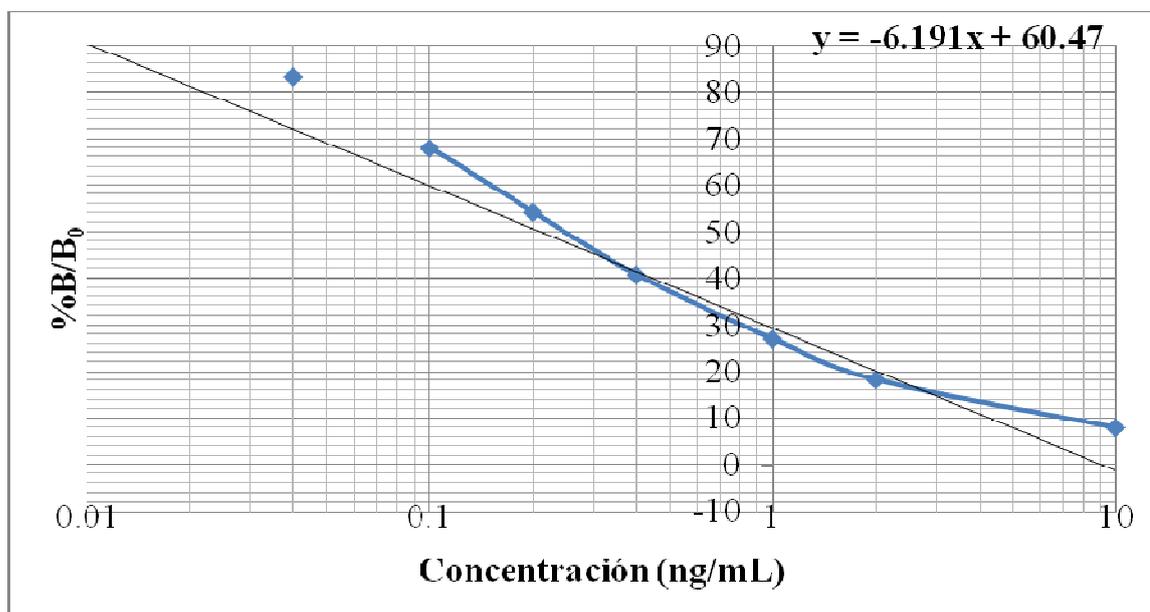


Figura 7. Curva patrón para determinar la concentración de cortisol en el plasma.

II.4.2.2 Análisis de muestras

Para conocer la concentración de cortisol de cada muestra, se utilizó el siguiente protocolo:

1. En un tubo de vidrio, se mezclaron 100 μ L de plasma con 1 mL de éter etílico. Se agitó la mezcla vigorosamente por 30 segundos y se dejó separar la fase orgánica de la inorgánica.
2. El sobrenadante fue transferido a un tubo de vidrio y se evaporó el solvente con N_2 . El residuo fue disuelto en 100 μ L de buffer de extracción previamente diluido con agua des ionizada (1:5).

3. El extracto se diluyó 100 veces, tomando 10 μL de la mezcla anterior y agregándolo a 990 μL de buffer de extracción. La mezcla resultante se dividió en dos muestras de 50 μL cada una.

Una vez obtenidas las muestras de 50 μL , se agregaron a los pozos de la microplaca para añadir 50 μL del conjugado de enzima. Después de una hora, se vaciaron los contenidos de los pozos de la microplaca y se lavaron tres veces con 300 μL de buffer de lavado.

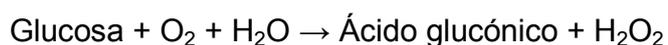
Para finalizar el proceso, se agregaron 150 μL de sustrato a cada pozo y se incubó a 25 °C por 30 minutos para posteriormente leer la absorbancia de cada pozo a 650 nm. Al igual que en la curva patrón, la absorbancia de cada muestra se transformó a porcentaje ($\%B/B_0$); finalmente el porcentaje de absorbancia fue identificado en el eje de las ordenadas (Y) y la concentración fue obtenida en el eje de las abscisas (X). El resultado obtenido fue multiplicado por 100, tomando en cuenta la dilución 1:100.

En presencia de cortisol, el sustrato reacciona con la muestra y se presenta un color claro, mientras que en ausencia de cortisol, el sustrato que no reacciona se torna de un color azul, lo cual incrementa la absorbancia e indica que hay ausencia o poco cortisol en la muestra.

II.4.3 Glucosa

La determinación de este carbohidrato se realizó mediante el método “glucosa-oxidasa” a través de un kit (RANDOX[®] Gluc-Pap, GL 1021), en el cual la

cantidad de glucosa se determina mediante la oxidación enzimática de glucosa en presencia de glucosa oxidasa. De esta reacción se forma peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con fenol y 4-aminofenazona bajo la catálisis de la enzima peroxidasa, formando un complejo colorimétrico.



Para llevar a cabo esta prueba, se preparo un blanco reactivo, un estándar y las muestras, como se indica en la Tabla III.

Después de preparar las muestras y reactivos, se incubaron los tubos por 25 minutos a 25 °C; posteriormente se procedió a leer las muestras en un espectrofotómetro (HACH DR-4000) a una absorbancia de 500 nm, tomando como cero el blanco reactivo.

Adicionalmente se preparó una curva estándar diluyendo el estándar original (100 mg·dL⁻¹) en diferentes concentraciones (75, 50 y 25 mg·dL⁻¹; r² = 0.977) para cuantificar los resultados.

Tabla III. Preparación de muestras y reactivos para determinar la glucosa.

	Muestra (μL)	Estándar (μL)	Blanco Reactivo (μL)
Muestra	10	-	-
Estándar	-	10	-
Reactivo (Gluc-Pap)	1000	1000	1000

La concentración de las muestras en mg/L fue calculada mediante la fórmula 3:

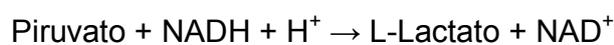
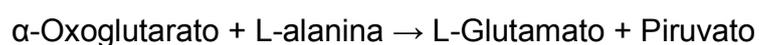
$$3. \text{ Conc. (mg / dl)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{estándar}}} \right) (\text{Conc.} - \text{est. (mg / dl)})$$

Abs= Absorbancia

est= estándar.

II.4.4 Alanina Aminotransferasa (ALT)

La cuantificación de esta enzima se efectuó *in vitro* por el método ultravioleta descrito por Sizer y Jenkins (1962). Se utilizó un kit (RANDOX®, ALT EC 2.6.1.2, Método UV). La enzima ALT presente en el plasma cataliza la reacción de α -Oxoglutarato y L-alanina, del cual se forma piruvato, NADH e hidrógeno y finalmente se forma Lactato mediante la catálisis de la enzima Lactato deshidrogenasa.



En 1 mL de reactivo reconstituido (R1. Enzima/coenzima/ α -oxoglutarato) se mezclaron 0.1 mL de plasma, y después de 1 minuto se leyó la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm, tomando como blanco una celda con agua tri-distilada. Se midió el cambio de absorbancia (Δ Abs) cada

minuto durante cinco minutos, se obtuvo un promedio y se calculó la concentración de ALT mediante la fórmula 4.

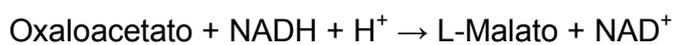
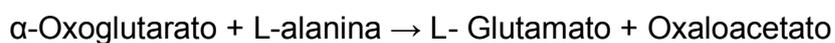
$$4. \text{ U/L} = \Delta\text{Abs} \times 1746$$

Donde: U/L= unidades de enzima por litro de plasma y 1746 es un factor previamente calculado para obtener la concentración de enzima a partir de la absorbancia.

A medida que se desprotonaba el NADH y el piruvato se transformaba en lactato, la absorbancia disminuía, de tal manera que a mayor cantidad de enzima mayor tasa de desprotonación de NADH y transformación de piruvato en lactato; como consecuencia de este proceso, la absorbancia disminuyó a una tasa constante (ΔAbs).

II.4.5 Aspartato Aminotransferasa (AST)

Al igual que para ALT, se utilizó el método UV (RANDOX[®], GOT/ASAT, ALT EC 2.6.1.2, AL 1200). La enzima AST catalizó la reacción de α -Oxoglutarato y L-alanina del cual se forma oxaloacetato, que después reacciona con NADH e hidrógeno mediante la catálisis de la enzima malato deshidrogenasa para formar L-Malato.



El protocolo fue el mismo al utilizado para medir ALT. La presencia de AST promovía la formación y desprotonación de NADH y la transformación de

oxaloacetato en L-Malato, lo cual provoca una disminución en la absorbancia de la muestra.

II.4.6 Número de Eritrocitos

Para llevar a cabo el recuento de los eritrocitos se extrajo la sangre de cinco sardinas de cada estanque, la cual fue colocada en los tubos heparinizados; inmediatamente después de agitar el tubo suavemente para evitar el rompimiento de las células, se procedió a contar los eritrocitos o glóbulos rojos.

Una pequeña muestra de sangre se diluyó con solución de Hendrick's (Hendricks, 1952) en una proporción 1:200. Con una pipeta para dilución de sangre (Thoma, Propper) se tomó la muestra hasta la marca de "0.5"; con la misma pipeta se tomó la solución de Hendrick's hasta la marca de "101" y se agitó suavemente durante dos minutos.

Antes de colocar la muestra en el hematocitómetro se desecharon las tres primeras gotas y se colocó una gota dentro de la cámara. Posteriormente se colocó en el microscopio y se enfocó con el objetivo de 40 X, se contaron las células en el cuadro de en medio en las subdivisiones de las cuatro esquinas y en la del centro (Fig. 8). El número de células por mililitro se determinó con la fórmula 5:

$$5. \text{ Cel/mL} = \text{Número total de eritrocitos} \times 200 \times 10000$$

Donde:

Factor de dilución = 200

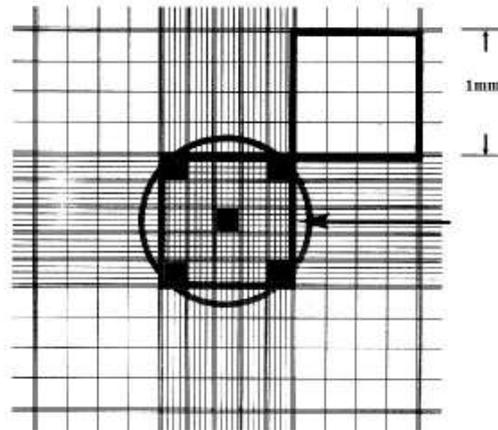


Figura 8: Hematocitómetro. Los cuadros negros dentro del círculo central indican el área en donde se contó el número de células rojas.

II.5 Análisis estadístico

A los datos de parámetros fisicoquímicos, comportamiento termorregulador y parámetros sanguíneos se les aplicaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene). Si se cumplían ambos supuestos se evaluaban mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía tomando como factor los ciclos de aclimatación para las variables de comportamiento térmico y parámetros fisicoquímicos y en el caso de los parámetros sanguíneos se tomó como factor las temperaturas altas y bajas de cada ciclo. En caso de los que los datos no cumplieran con los supuestos, fueron transformados por raíz cuadrada y posteriormente analizados por medio de ANOVA. Las diferencias significativas fueron identificadas mediante una prueba a posteriori de Tukey. Los datos de temperatura preferida y de evitación se evaluaron con un análisis de varianza de medidas repetidas. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de

significancia de $P = 0.05$.

Capítulo III

Resultados

III.1 Comportamiento termorregulador

III.1.1 Preferencia térmica

La fluctuación térmica no tuvo un efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la preferencia térmica (PT) de las sardinas expuestas a distintos ciclos térmicos, es decir, los peces eligieron temperaturas entre 17.5 y 19.5 °C independientemente del ciclo de invierno o verano al que fueron aclimatadas. Tampoco hubo un efecto del tiempo de exposición a temperaturas elevadas, ya que la PT de las sardina de los ciclos simétricos fue similar a la observada en los ciclos asimétricos (Fig. 8, Tabla IV).

Tomando en cuenta todos los datos de las temperaturas elegidas por las sardinas aclimatadas a los diferentes ciclos, se obtuvo una distribución normal, con la mayor frecuencia en el intervalo de 17 a 20 °C. Esto indica que esta subpoblación tiene una marcada tendencia a buscar situarse en temperaturas alrededor de los 18 °C independientemente de su historia térmica (Fig. 10).

III.1.2 Temperaturas de evitación

Las temperaturas de evitación fueron afectadas por los diferentes regímenes térmicos de los ciclos de invierno y verano, pero no por el tipo de ciclo

simétrico o asimétrico (Tabla IV). Las sardinas aclimatadas a los ciclos de invierno evitaron temperaturas alrededor de los 13.3 (TEI) y 19.5 °C (TES), mientras que el intervalo de evitación de las sardinas aclimatadas a los ciclos de verano se desplazó hacia temperaturas más altas (\approx TEI-16.5 - TES-22.5 °C). Estas temperaturas son similares a las obtenidas cuando se graficaron las temperaturas durante 24 horas de observación (Fig. 11). Los resultados muestran que la sardina tiene la capacidad de modificar su zona de preferencia térmica en un intervalo de 13.5 a 22.5 °C.

Los intervalos de evitación térmica de las sardinas aclimatadas a los ciclos de invierno y verano no fueron significativamente diferentes ($P = 0.51$), siendo en promedio de 6.1 y 5.7 °C para CS y CA de invierno y verano. Estos resultados indican que probablemente las sardinas permanecen en intervalos térmicos de alrededor de 6 °C, los cuales pueden ser desfasados por su historia térmica.

III.1.3 Temperaturas letales

La temperatura letal de los organismos aclimatados a los ciclos de verano fue alrededor de 1 °C más alta ($P < 0.05$) que la de las sardinas aclimatadas a los ciclos de invierno (Tabla IV). Los organismos aclimatados a los ciclos de verano fueron más resistentes a las temperaturas altas que las sardinas aclimatadas a bajas temperaturas (CS y CA-INV). En contraste, los peces de ambos ciclos de invierno fueron más resistentes a las temperaturas frías (6.1 - 6.9 °C).

PREFERENCIA TERMICA

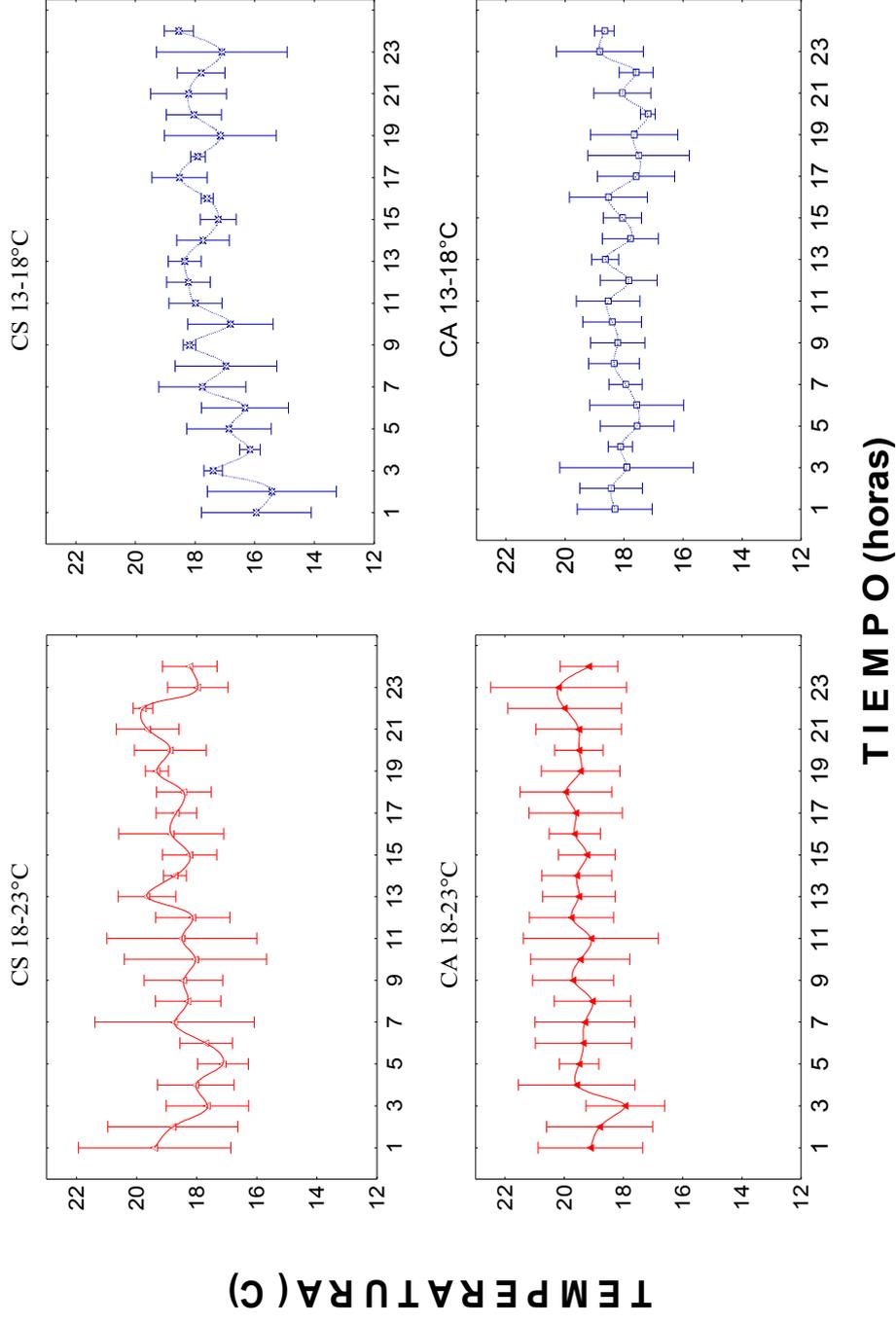


Figura 9. Preferencia térmica de *Sardinops sagax caeruleus* acclimada al ciclo simétrico (CS) y asimétrico (CA) de verano (18-23 °C) e invierno (13-18 °C). Media \pm desviación estándar.

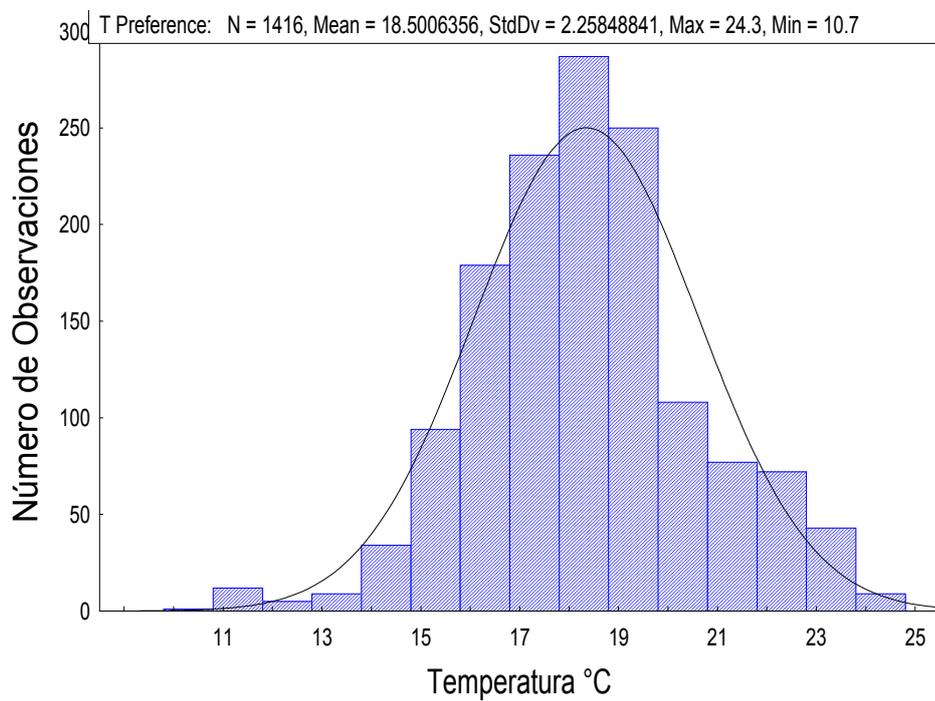


Figura 10. Distribución de los datos de preferencia térmica de las sardinas expuestas a las diferentes fluctuaciones térmicas.

TEMPERATURAS DE EVITACION

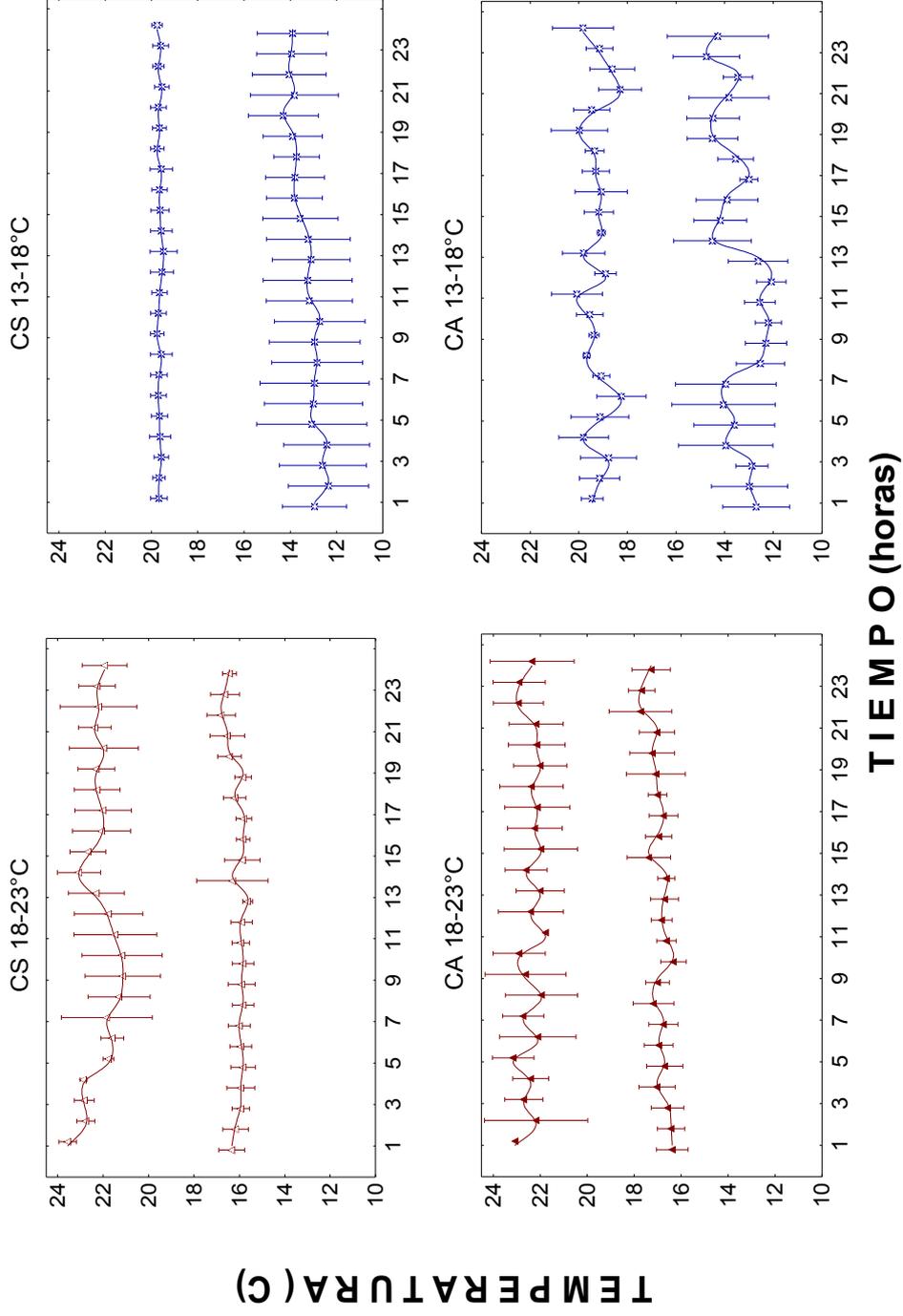


Figura 11. Temperaturas de evitación de *S. sagax caeruleus* aclimatada a los ciclos simétrico (CS) y asimétrico (CA) de verano (18 - 23 °C) e invierno (13 - 18 °C). Media \pm desviación estándar.

Aunque los organismos expuestos a los ciclos de verano experimentaban temperaturas más elevadas (18 - 23 °C) que aquellos de los ciclos de invierno (13 - 18 °C), la TLIS del CS-Ver solamente incrementó 1.3 °C en promedio con respecto al CS-INV, mientras que en los ciclos asimétricos la TLIS incrementó 1.2 °C.

La TLII de las sardinas del CS y CA-INV fueron un 0.8 y 1.4 °C menores que la registrada para los organismos de los respectivos ciclos de verano. La TLII más baja (6.1 °C) se registró en el CA-INV, en el cual las sardinas experimentaron diariamente el mayor tiempo (10 horas) a la temperatura más baja (13 °C) de la fluctuación.

Al igual que en las temperaturas de evitación, los intervalos de tolerancia térmica de la sardina delimitados por la TLIS y la TLII, fueron similares y se mantuvieron en el intervalo de 17.4 a 18.0 °C en los diferentes ciclos de las fluctuaciones de aclimatación.

III.1.4 Temperaturas críticas

Las fluctuaciones de verano e invierno tuvieron un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre los límites críticos de *S. sagax caeruleus*. Las temperaturas críticas de las sardinas expuestas a los CA y CS de verano fueron 1.4 a 1.8 °C mayores que en los ciclos de invierno respectivamente. Sin embargo, estadísticamente el tipo de ciclo (simétrico o asimétrico) no tuvo un efecto sobre esta respuesta.

La TCM_{in} indicó que los organismos expuestos al CS-INV tuvieron una mayor resistencia a las bajas temperaturas (5.5 °C) y difiere en 1.6 °C de los que experimentaron el CS-Ver (7.1 °C). De manera similar, en las sardinas del CA-INV, la TCM_{in} (5.3 °C) difiere en 1.3 °C a la registrada en los peces del CA-Ver (Tabla IV). Es decir, que las sardinas aclimatadas a los ciclos de invierno tuvieron una mayor resistencia a temperaturas por debajo de los 6 °C que aquellas expuestas a los ciclos de verano.

III.1.5 Zonas térmicas

Las zonas establecidas por los límites térmicos fueron similares entre las sardinas expuestas a los ciclos simétricos o asimétricos (Tabla V); debido a que a excepción de la TLII, no se encontraron diferencias significativas entre los límites térmicos de las sardinas expuestas a los ciclos simétricos y asimétricos. Por ejemplo; los organismos expuestos a los ciclos asimétricos y simétricos de ambas fluctuaciones tuvieron una zona de resistencia (ZR) de 126.3 °C² y de 125.0 °C² respectivamente.

Tabla IV. Límites térmicos de *S. sagax caeruleus* aclimatada a ciclos simétricos y asimétricos de invierno (13 – 18 °C) y verano (18 – 23 °C). Temperatura crítica máxima y mínima (TCMax y TCMIn), temperatura letal incipiente superior e inferior (TLIS y TLII), temperatura de evitación superior e inferior (TES y TEI), preferencia

	Simétrico 13 - 18 °C	Asimétrico	Simétrico 18 - 23 °C	Asimétrico
TCMax	30.4 ± 0.3 ^a	30.5 ± 0.3 ^a	32.2 ± 0.2 ^b	31.9 ± 0.1 ^b
TLIS	24.3 ± 0.0 ^a	24.1 ± 0.3 ^a	25.6 ± 0.2 ^b	25.3 ± 0.4 ^b
TES	19.6 ± 0.4 ^a	19.3 ± 0.9 ^a	22.1 ± 1.2 ^b	22.4 ± 1.3 ^b
PT	17.4 ± 1.4 ^a	18.1 ± 1.1 ^a	18.5 ± 1.4 ^a	19.4 ± 1.4 ^a
TEI	13.3 ± 1.7 ^a	13.4 ± 1.5 ^a	16.1 ± 0.6 ^b	16.9 ± 0.8 ^b
TLII	6.9 ± 0.1 ^a	6.1 ± 0.1 ^b	7.7 ± 0.2 ^c	7.5 ± 0.1 ^c
TCMin	5.5 ± 0.1 ^a	5.3 ± 0.2 ^a	7.1 ± 0.1 ^c	6.6 ± 0.1 ^b

térmica (PT). Media ± desviación estándar

*Diferentes superíndices en la misma línea indican diferencias significativas (P < 0.05).

Tabla V. Zonas de preferencia (ZP), tolerancia (ZT) y resistencia (ZR) térmica de *S. sagax caeruleus* expuesta a las fluctuaciones térmicas de verano e invierno y a los ciclos simétrico y asimétrico. El área de las zonas se expresa en grados centígrados cuadrados (°C²).

Ciclos	ZP	ZT	ZR
Simétrico	31.5 °C ²	87.8 °C ²	125.0 °C ²
Asimétrico	28.5 °C ²	89.5 °C ²	126.3 °C ²

III.2 Parámetros sanguíneos

III.2.1 Cortisol

Los niveles de cortisol en el plasma estuvieron directamente relacionados con la temperatura del ciclo térmico a la que se encontraban los peces al momento de extraer la muestra. La concentración de esta hormona en las sardinas fue estadísticamente similar ($\approx \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $P = 0.9$) entre los tratamientos (CS-INV, CA-INV, CS-Ver o CS-Ver) cuando los organismos experimentaban 18°C , independientemente del ciclo térmico. Los valores también fueron similares a los encontrados en las sardinas expuestas a la temperatura constante de 18°C .

Los niveles de cortisol disminuyeron significativamente ($P = 0.03$) cuando la temperatura descendió a 13°C en el CS-INV, mientras que la concentración de esta hormona se incrementó en un 74.6 % y 55.6 % con respecto a los obtenidos en la TO, cuando la temperatura aumentó de 18 a 23°C en los CS y CA de verano respectivamente (Fig. 12).

III.2.2 Glucosa

La concentración de glucosa plasmática tuvo una tendencia similar a la observada en el cortisol. En los organismos aclimatados a la fluctuación de invierno en ambos ciclos (CS, CA), la concentración de glucosa fue similar ($\approx 100 \text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) no se encontraron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) con respecto a los organismos expuestos a la TO (18°C) (Fig. 13). En las sardinas expuestas a la fluctuación de verano de ambos ciclos, también se obtuvieron valores similares en

la concentración de glucosa cuando la temperatura disminuía de 23 a 18 °C y no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) con respecto a la encontrada en los organismos expuestos a la temperatura óptima. Los niveles de glucosa se incrementaron en un 58 y 25 % en las sardinas del CS-Ver y CA-Ver respectivamente cuando la temperatura se encontraba en 23 °C (Fig. 13).

III.2.3 Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanina aminotransferasa (ALT)

Los niveles de enzima AST fueron similares (≈ 100 U/L) entre las sardinas expuestas a la TO:18°C y aquellas aclimatadas a los ciclos de invierno (CS y CA). En las sardinas de los ciclos de verano, los niveles incrementaron significativamente en un 64 % y 36 % con respecto a la concentración de los organismos de la TO (Fig. 14).

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el CS y CA de verano, sin embargo, el promedio de los niveles de la enzima fue más alto en el CS-Ver, en el cual las sardinas estuvieron expuestas por mayor tiempo (140 h) a la temperatura de 23 °C en comparación con el CA-Ver (80 h) durante el período de aclimatación (20 días). Estos resultados indican que el tiempo de exposición a la temperatura más alta tuvo un efecto sobre los niveles plasmáticos de AST. Las altas concentraciones de AST detectan una relación directa con la mortalidad de los organismos durante la aclimatación. Por ejemplo, en la TO:18°C se obtuvo la menor concentración de AST (100 U/L) y la menor mortalidad (4 %), mientras que en el tratamiento del CS-Ver se registro la mayor concentración (164 U/L) y el 32 % de mortalidad.

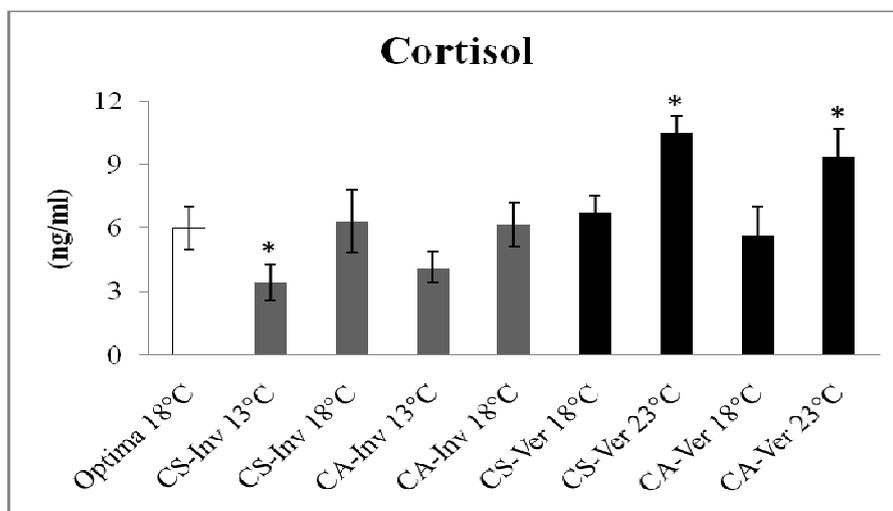


Figura 12. Concentración de cortisol en el plasma de las sardinas aclimatadas a temperatura óptima (18 °C), a los ciclos simétricos de invierno y verano (CS-INV y CS-Ver) y asimétricos (CA-INV y CA-Ver). Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a la temperatura óptima se encuentran representadas por un asterisco (*).

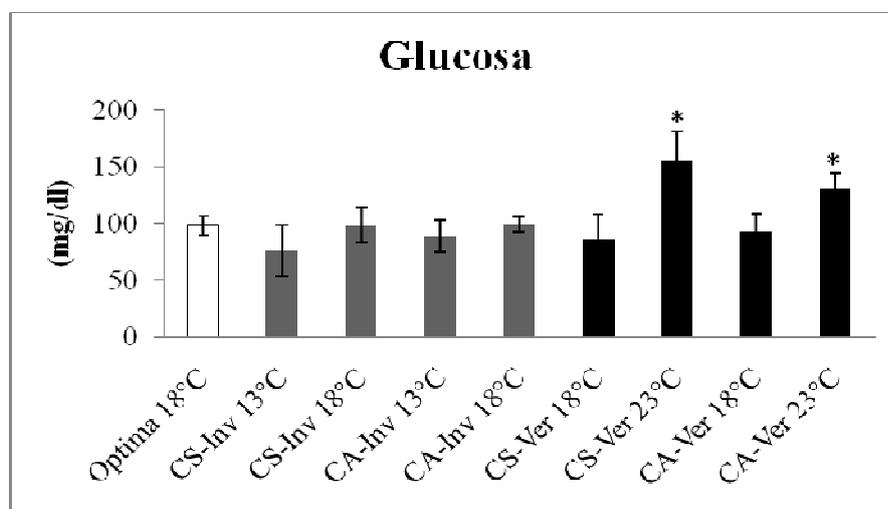


Figura 13. Concentración de glucosa en el plasma de las sardinas aclimatadas a la temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos de invierno y verano (CS-INV y CS-Ver) y asimétricos (CA-INV y CA-Ver). Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a la temperatura óptima se encuentran representadas por un asterisco (*).

La respuesta de ALT fue muy variable (CV = 0.7) y no se detectaron diferencias significativas (P = 0.93) entre los tratamientos, excepto en el CS-Ver en el cual los niveles incrementaron en un 83 % con respecto a la TO:18 °C. En las sardinas de ambos ciclos de verano, la concentración de ALT se incrementó a 29 U/L (CS-Ver) y 20 U/L (CA-Ver) comparado con la encontrada en los peces expuestos a la TO de 18 °C (10 U/L) (Fig. 15).

La alta variabilidad en la concentración de esta enzima se debe a que no se detectó su presencia en algunos organismos de los diferentes tratamientos, posiblemente debido al elevado número de revoluciones por minuto en el proceso de centrifugación (10000 RPM) y a que aparentemente no es una enzima que se presente en altas concentraciones en esta especie. Al igual que en AST, los niveles de ALT fueron mayores en los organismos del CS-Ver (15 - 40 U/L) en comparación con los del CA-Ver (10 - 30 U/L) en donde las sardinas experimentaron menor tiempo de exposición a la temperatura de 23 °C.

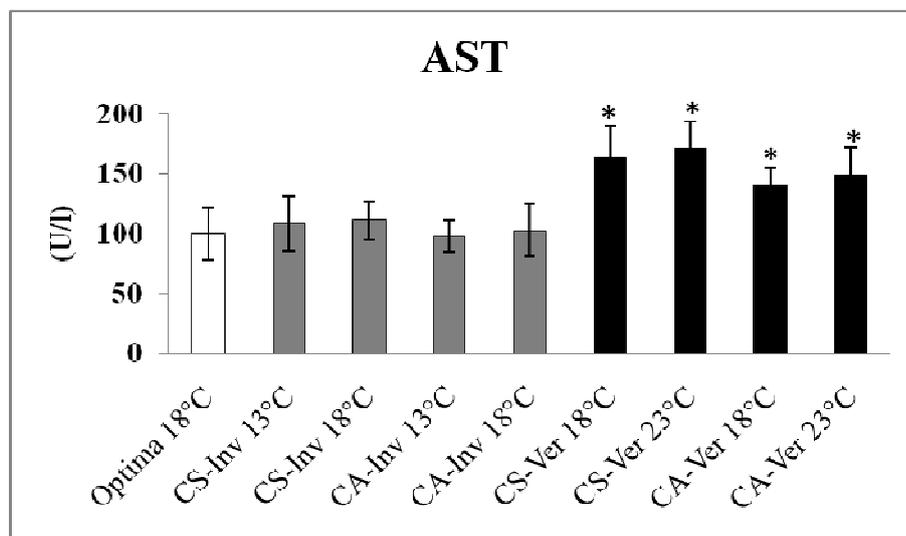


Figura 14. Concentración plasmática de aspartato aminotransferasa (AST) en sardinas aclimatadas a la temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos (CS-INV y CS-Ver) y asimétricos (CA-INV y CA-Ver) de invierno y verano. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a la temperatura óptima se encuentran representadas por un asterisco (*).

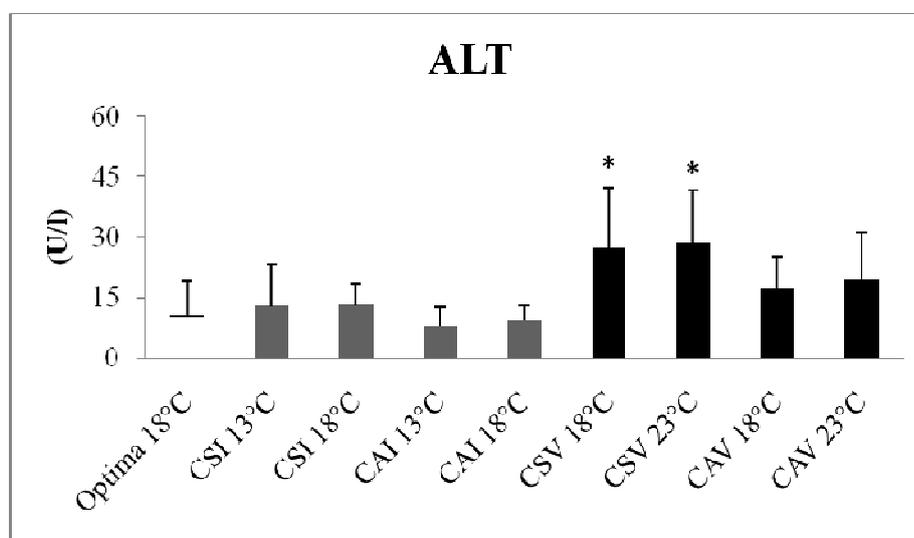


Figura 15. Concentración plasmática de alanina aminotransferasa (ALT) en sardinas aclimatadas a la temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos (CS-INV y CS-Ver) y asimétricos (CA-INV y CA-Ver) de invierno y verano. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a la temperatura óptima se encuentran representadas por un asterisco (*).

III.2.4 Eritrocitos

En las sardinas de los ciclos de verano, el número de eritrocitos fue más alto en comparación con los peces de la TO. Al igual que para las enzimas aminotransferasas, el nivel más alto de eritrocitos se encontró en el CS-Ver en comparación con el CA-Ver, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($P = 0.13$). En el caso de los organismos de los ciclos de invierno, la concentración de células rojas fue menor con respecto a la TO, aunque las diferencias solo fueron significativas ($P = 0.001$) para el CS-INV (Fig. 16).

III.3 Supervivencia

La supervivencia de los organismos fue afectada por las altas temperaturas. Los mayores porcentajes de mortalidad durante los 20 días de aclimatación, fueron de 32 % y 20 % para los ciclos simétrico y asimétrico de verano. En las sardinas aclimatadas a la TO:18°C y los ciclos de invierno, la supervivencia fue superior al 90 % (Fig. 17). En los ciclos de la fluctuación de verano se obtuvo la menor supervivencia y entre ambos ciclos simétrico y asimétrico, la más baja (68 %) fue en el CS, lo cual está relacionado con el número de horas (7 h) que las sardinas permanecieron a la temperatura más alta.

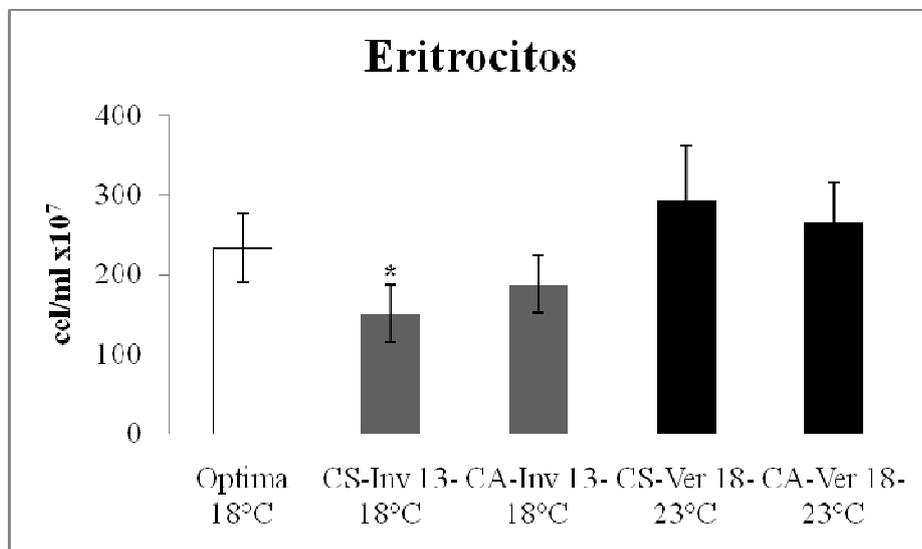


Figura 16. Número de eritrocitos en sardinas aclimatadas a la temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos (CS-INV y CS-Ver) y asimétricos (CA-INV y CA-Ver) de invierno y verano. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a la temperatura óptima se encuentran representadas por un asterisco (*).

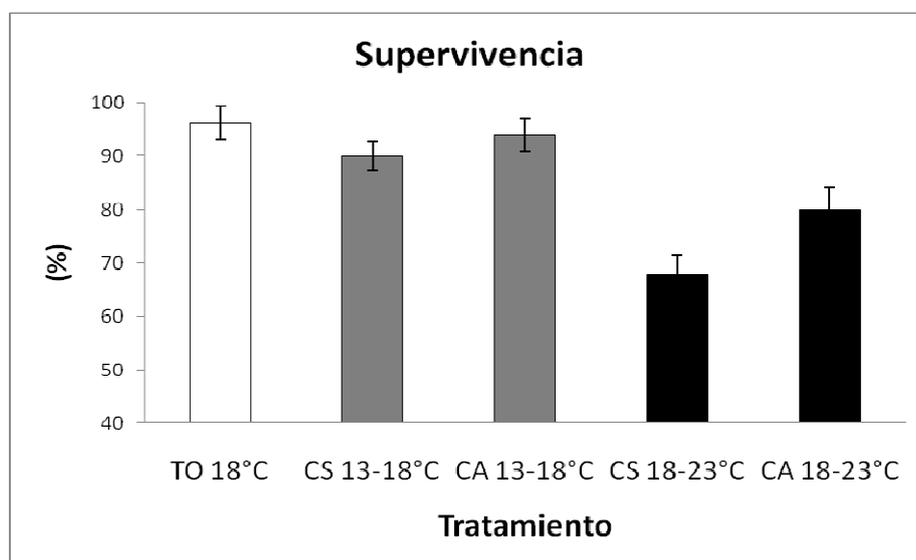


Figura 17. Supervivencia de *S. sagax caeruleus* aclimatada a temperatura óptima (18 °C), ciclos simétricos (CS:13-18 °C y CS:18-23 °C) y asimétricos (CA:13-18 °C y CA:18-23 °C) de la fluctuación invierno y verano.

Capítulo IV

Discusión

La temperatura ambiental uno de los factores que limita la distribución de los organismos acuáticos y es determinante en sus patrones de actividad (Prosser y Health, 1991). La migración y abundancia de los organismos en determinadas zonas, dependen en gran medida de la estación del año, lo que a su vez implica condiciones térmicas específicas.

IV.1 Termorregulación por comportamiento

Los estudios del comportamiento termorregulador se han utilizado con diferentes enfoques, como por ejemplo para predecir el efecto de las plantas termoeléctricas sobre las comunidades de peces que habitan en la zona costera, como modelos de predicción de ausencia o presencia de peces, para establecer las condiciones térmicas óptimas de cultivo, conocer los efectos de la temperatura en el hábitat y la capacidad de ajuste los organismos en sus límites de preferencia, tolerancia y resistencia, entre otros (Ferguson, 1958; Beitinger y Fitzpatrick, 1979).

En especies de importancia económica como la sardina del Pacífico, su distribución y migración se ha relacionado con la abundancia de alimento,

períodos de reproducción, pero principalmente con el cambio climático estacional (Ahlstrom, 1960; Llunch-Belda *et al.*, 1991; Félix-Uraga *et al.*, 2004). Las investigaciones relacionadas sobre el comportamiento termorregulador de la sardina podrían complementar los estudios de dinámica poblacional de las diferentes subpoblaciones de esta especie, ya que permiten conocer su preferencia y sus límites térmicos. Los resultados de preferencia térmica de sardinas de la subpoblación templada expuestas a temperaturas constantes demostraron que buscan situarse en temperaturas alrededor de los 18 °C independientemente de su aclimatación previa (Hernández *et al.*, en proceso). En este estudio, esta misma tendencia se observó en las sardinas aclimatadas a las fluctuaciones de invierno y verano. La razón principal de esta preferencia térmica puede ser que en esa temperatura la sardina encuentra su óptimo donde los quizás los procesos fisiológicos serían más eficientes. La temperatura preferida es aquel punto térmico en donde el funcionamiento de los peces es óptimo para llevar a cabo su ciclo de vida, asegurando la permanencia de su especie (Jobling, 1981; Das *et al.*, 2005). Con respecto a esto último, las sardinas expuestas a la temperatura constante de 18 °C tuvieron el promedio más alto de supervivencia (> 90 %).

Los estudios de la preferencia térmica de organismos del género *Sardinops* son escasos. El único trabajo fue hecho por Tsuchida (1995), quien observó que la sardina japonesa (*Sardinops sagax melanostictus*), que se distribuye en latitudes similares a *S. sagax caeruleus*, prefería temperaturas alrededor de los 20 °C. En

la subpoblación templada de *S. sagax caeruleus* se observó que el intervalo de temperatura preferencial oscila entre los 17 y los 20 °C independientemente de la historia térmica. Estos resultados coinciden con el intervalo encontrado para la misma subpoblación por Hernández-Rodríguez y colaboradores (en proceso) con sardinas aclimatadas a temperaturas constantes. También encontraron que la sardina recién recolectada y expuesta a un gradiente térmico por 24 horas elige temperaturas en el intervalo de 18 a 20 °C.

Aunque la preferencia térmica de la subpoblación templada no es afectada significativamente por la historia térmica, existen diferentes respuestas del comportamiento térmico que son influenciadas por la historia térmica de aclimatización o aclimatación. Específicamente, las temperaturas de evitación (TES y TEI) de la sardina fueron modificadas por las fluctuaciones térmicas (13 - 18 °C y 18 - 23 °C), pero no por el tipo de ciclo (simétrico o asimétrico). Los intervalos de evitación fueron de 13.3 a 19.6 °C para la fluctuación de invierno y de 16.1 a 22.4 °C en verano. Estos resultados permiten inferir la plasticidad térmica de la subpoblación muestreada, e implica que les es posible modificar el intervalo de temperaturas de evitación en respuesta al ambiente térmico. Esta respuesta ha sido observada en otros peces teleósteos; por ejemplo, McMahon *et al.* (2008) aclimataron dos especies de truchas (*Oncorhynchus clarkii lewisi* y *Oncorhynchus mykiss*) a diferentes temperaturas y observaron que la aclimatación tenía un efecto sobre el desplazamiento de la zona de preferencia térmica.

En la subpoblación templada de *S. sagax caeruleus*, el efecto de la temperatura sobre el desplazamiento de las temperaturas de evitación, indican que la sardina puede aclimatarse y sobrevivir en un intervalo térmico que abarca aproximadamente desde los 13.5 °C hasta los 22 °C. Se ha documentado que algunos teleósteos tienen la capacidad de ejecutar ajustes internos (bioquímicos y fisiológicos) que les permiten sobrevivir en diferentes zonas térmicas y que sistemas biológicos continúan funcionando de sin alteración alguna, manteniendo un estado de homeóstasis, aún cuando su temperatura corporal se modifica. Estos cambios ocurren después de cierto período en el que el pez ha experimentado nuevas condiciones térmicas (Angilletta *et al.*, 2002), tal como pudo ser el caso de la sardina.

El desplazamiento de la zona de preferencia térmica de la sardina ocasionada por la exposición a fluctuaciones de temperatura también fue observado en la modificación de los límites térmicos letales, lo cual permite inferir el grado de plasticidad fisiológica de esta especie y su capacidad de ajuste para aclimatarse a diferentes ambientes térmicos. Los peces tuvieron la capacidad para aclimatarse a un amplio intervalo de temperaturas. Sin embargo, los datos de temperaturas letales sugieren que la subpoblación muestreada posee una alta resistencia a condiciones de baja temperatura ($\approx 6 - 7$ °C) pero poca resistencia hacia temperaturas altas ($\approx 24 - 25$ °C). En esta misma especie Hernández-Rodríguez y colaboradores (en proceso) mencionan que la TLIS de las sardinas aclimatadas a temperaturas constantes de 15 a 26 °C tuvieron una diferencia

térmica de +2 a +4 °C con respecto a la temperatura de aclimatación. Los autores también se refieren a que la TLII se observó en el intervalo de 8 a 15 °C, siendo más tolerantes al frío las sardinas aclimatadas a bajas temperaturas, lo cual también se documentó en las sardinas aclimatadas a la fluctuación de invierno. Según el trabajo de Tsuchida (1995), la TLIS de la sardina japonesa (25 °C) es muy similar al de la subpoblación templada de *S. sagax caeruleus*. En experimentos previos realizados por Hernández-Rodríguez y colaboradores (*en proceso*), se observó que no es posible aclimatar sardinas de la sub-población templada a temperaturas mayores de 25 °C, ya que la mortalidad fue mayor al 50 %, lo cual se refleja en un efecto letal acumulativo. Con respecto a la modificación de temperaturas letales de teleósteos, Lyytikäinen *et al.* (1997) encontraron que la tolerancia térmica del salmón del Ártico (*Salvelinus alpinus*, L.) tenía una relación directa con su temperatura de aclimatación. De manera similar, la tolerancia térmica de las sardinas estudiadas fue afectada por la aclimatación térmica previa.

Además de los límites de tolerancia, la estimación de los límites críticos ha sido utilizada para evaluar la resistencia térmica de los peces. Lutterschmidt y Hutchison (1997) plantearon que las temperaturas críticas eran un “*excelente índice y estándar para la evaluación de los requerimientos térmicos y fisiológicos de un organismo*”, aunque también son útiles para comparar entre especies similares de distintas localidades, diferentes líneas genéticas, entre otros.

En los estudios de resistencia térmica, se observó que la sardina posee plasticidad para modificar su intervalo de resistencia. Sin embargo, el tipo de ciclo

(simétrico o asimétrico) no tuvo un efecto sobre la TCMax o TCMIn, lo cual sugiere que la resistencia de estos organismos es afectada por su historia térmica y no por el tiempo que experimentan en una u otra temperatura. Al igual que en las temperaturas letales, se observó un incremento ($> 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) en la resistencia a temperaturas frías cuando las sardinas fueron aclimatadas a los ciclos de invierno. La modificación de la TCMax y la TCMIn es una respuesta común en los teleósteos que experimentan diversos ambientes térmicos (Hutchison y Maness, 1979; Reber y Bennett, 2007), ya sea por aclimatización o aclimatación. Hernández-Rodríguez y colaboradores (*en proceso*) evaluaron la TCMax y la TCMIn en *S. sagax caeruleus* aclimatada a temperaturas constantes de 15 a 26 $^{\circ}\text{C}$, y observaron los espasmos musculares en el intervalo de 26.8 a 32.4 $^{\circ}\text{C}$ y la pérdida del equilibrio sin reincorporación de 27 a 33.9 $^{\circ}\text{C}$. La TCMIn de la sardina, la cual corresponde al momento en que se observa la respuesta de pérdida del equilibrio sin reincorporación, se registró en el intervalo de 6.2 a 10.3 $^{\circ}\text{C}$. Al igual que en la presente investigación, estas respuestas fueron afectadas por la historia térmica, con la mayor resistencia a la disminución de la temperatura por debajo de los 10 $^{\circ}\text{C}$ en las sardinas aclimatadas a 15, 18, 21 y 24 $^{\circ}\text{C}$.

Los estudios demuestran que las sardinas no modifican su preferencia a pesar de la previa aclimatación térmica. Por otro lado, sus límites térmicos son modificados por el efecto de la historia térmica, como consecuencia de la plasticidad fisiológica de las sardinas para aclimatarse a diversos ambientes térmicos. Sin embargo, las sardinas evitaron temperaturas elevadas y mostraron

ser susceptibles (23 y 25 °C, respectivamente), aunque no es posible conocer el efecto fisiológico que estas temperaturas ejercen sobre la sardina por medio de estos estudios, ya que sirven para establecer límites, pero no son capaces de identificar el estado de estrés o fisiológico de los peces ante determinada temperatura. Es por ello que el análisis de los parámetros sanguíneos representa un complemento ideal para este tipo de estudios, debido a que la alteración de muchos procesos biológicos de los peces se manifiesta en la modificación de algunos componentes sanguíneos (Öner *et al.*, 2008).

IV.2 Parámetros Sanguíneos

Algunos componentes y compuestos químicos de la sangre han sido utilizados para evaluar y monitorear la condición o estatus fisiológico de los organismos acuáticos como los peces (Hattingh, 1977; Wells *et al.*, 1984; Morales *et al.*, 2004; Öner *et al.*, 2008). Los peces son particularmente susceptibles a los cambios en la temperatura ambiental, debido a que la mayor parte de las especies son incapaces de controlar su temperatura interna (Brett, 1979).

El incremento en la concentración de componentes químicos como la glucosa y el cortisol son indicadores del estrés en los peces cuando son expuestos a diferentes temperaturas sub-óptimas (Thomas *et al.*, 1986; Lowe y Davison, 2005; Lima y Ribeiro, 2006; King *et al.*, 2006). El hecho de que se hayan obtenido valores similares de glucosa y cortisol a 18 °C independientemente del

tratamiento (CS-Ver, CS-INV, CA-Ver, CA-INV o TO:18 °C) puede indicar que los organismos estudiados no se encontraban bajo estrés en este punto térmico en particular; además, la constancia de esta respuesta a 18 °C puede explicar la preferencia térmica observada en las sardinas, debido a que en todos los tratamientos las sardinas buscaban situarse en la zona del gradiente térmico que registraba temperaturas alrededor de los 18 °C.

En situaciones de estrés prolongado o crónico, los organismos pueden llegar a sufrir daños internos en diferentes órganos. Se ha documentado la presencia de células lisadas que liberan las enzimas aminotransferasas hacia el torrente sanguíneo, incrementando sustancialmente su concentración (Ciereszko, *et al.*, 1998; Oluah, 1999). Aunque la temperatura puede tener un efecto sobre la concentración de algunos parámetros sanguíneos debido al incremento en la tasa metabólica, la concentración plasmática de aminotransferasas no es afectada directamente por este factor, debido a que estas enzimas se encuentran contenidas principalmente dentro de las células, donde participan en el metabolismo de carbohidratos (Ciereszko, *et al.*, 1998). El aumento en la concentración plasmática de aminotransferasas en la sardina se debe probablemente a una lisis celular o rompimiento de tejido interno causado por una exposición crónica a temperaturas elevadas.

Las concentraciones más bajas de enzimas aminotransferasas (AST y ALT) y la mayor supervivencia fueron encontradas en sardinas expuestas a la temperatura constante de 18 °C. Esto indica que probablemente la sardina a 18 °C

no se encuentra estresada y también encuentra su óptimo fisiológico. Choi *et al.* (2007) registraron incrementos de ALT y AST en *Acanthopagrus schlegeli* después de haberlos expuesto a altas temperaturas, y lo atribuyeron a lesiones o daños de tejidos.

En la sardina estudiada, los parámetros sanguíneos variaron poco (< 15 %) a 18 °C, donde coincidieron las diferentes respuestas medidas. Esto podría explicarse como la condición de óptimo desempeño fisiológico. Con base en estos resultados y los de preferencia térmica (18 °C), se podría concluir que 18 °C es el valor del preferendum final y que su intervalo de preferencia oscila en ± 2 °C para la subpoblación templada.

En el caso de las temperaturas superiores e inferiores (13 y 23 °C), los resultados observados en los parámetros sanguíneos reforzaron el intervalo térmico de 13.5 a 22 °C propuesto a partir de las temperaturas de evitación ya que los niveles de los parámetros medidos se incrementaban a 23 °C y permanecían constantes a 13 °C. Las concentraciones de cortisol y glucosa se incrementaron en más del 40 % cuando la sardina experimentaba 23 °C en la fluctuación térmica de verano, lo que podría explicar que las sardinias aclimatadas a estos ciclos evitaran incursionar en temperaturas mayores a 22 °C dentro del gradiente térmico. El incremento en los niveles de glucosa y cortisol a 23 °C podría atribuirse a un aumento en la demanda energética, provocada por una tasa metabólica elevada asociada a un posible estado de estrés por efecto de la temperatura. La respuesta de glucosa fue muy similar a la del cortisol, debido a

que la síntesis y liberación de glucosa hacia el torrente sanguíneo tiene una relación directa con los niveles de cortisol en la sangre y otros tejidos (Iwama *et al.*, 1999). Lowe y Davison (2005) encontraron que el pez *Pagothenia borchgrevinki* se estresaba al ser expuesto a una temperatura sub-óptima y que la concentración de glucosa plasmática se incrementó en un 55 %. Aunque no se ha evaluado el efecto de la temperatura sobre el estrés en sardinas, Marçalo *et al.* (2006) observaron que cuando la sardina (*Sardina pilchardus*) era estresada por el efecto del transporte y la manipulación, la concentración de glucosa aumentaba en un 50 % y la de cortisol en 260 %.

Los valores de AST y ALT en las sardinas indicaron un posible deterioro interno de los tejidos, ya que la concentración de estas enzimas se incrementó desde un 40 % hasta un 170 % en ambos ciclos de verano (CS y CA) en comparación con la temperatura óptima. El incremento en los niveles de AST y ALT se ha registrado en los teleósteos con tejidos internos dañados (Wells *et al.*, 1986; Choi *et al.*, 2007; Poledník *et al.*, 2008).

El daño en los tejidos causado por el efecto del estrés se puede evaluar utilizando otras herramientas como la histología. En este sentido, Hernández-López (2006) expuso a la sardina del Pacífico a temperaturas sub-letales (25 °C) y describió el daño en las células hepáticas. Además, aunque no fue parte del estudio, se observó la presencia de petequias abdominales en algunas sardinas aclimatadas a los ciclos de verano lo cual pudo deberse a derrames internos; no obstante, es necesario realizar futuros estudios en los órganos y tejidos internos

para corroborar este planteamiento. La concentración de células rojas también puede ser un indicador de una alteración metabólica en las sardinas, ya que la demanda energética y de oxígeno del pez se incrementan bajo condiciones de estrés, para lo cual se requiere de un mayor número de células rojas que contribuyan a incrementar el transporte de oxígeno a los tejidos para cubrir su demanda energética (Wittenberg y Wittenberg, 1989). Leckin *et al.* (1995) aclimataron a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a diferentes temperaturas (4, 11 y 18 °C) y observaron que la concentración de células rojas se incrementaba en función de la temperatura (0.71, 0.77 y 1.07 x10⁹ células·mL⁻¹ respectivamente).

En ocasiones el incremento en algunos parámetros sanguíneos puede deberse a la modificación homeostática de los organismos cuando experimentan cambios en los factores ambientales como la temperatura. Sin embargo, Iwama *et al.* (1999) mencionan que para tener un conocimiento más completo del estado de estrés de los peces es necesario complementar los estudios con distintas respuestas bioquímicas y observaciones, ya que la medición de solo uno o dos parámetros podría generar resultados erróneos ya que existe una amplia gama de factores ajenos a los estudios que pueden tener un efecto sobre las respuestas que se pretende monitorear. En este trabajo, los valores de todos los parámetros sanguíneos que se evaluaron incrementaron significativamente cuando los peces experimentaban 23 °C, además de que en los ciclos de verano se obtuvieron menores supervivencias (64 % y 80 % para CS-Ver y CA-Ver respectivamente) en

comparación con los demás tratamientos (> 90 %). En este caso, la respuesta de todos los parámetros mostró un comportamiento similar, por lo que en base a estos resultados se puede aseverar si las sardinas se encontraban afectadas fisiológicamente.

Parece ser evidente que las sardinas expuestas a las diferentes fluctuaciones térmicas, evitan temperaturas mayores a 22 °C, debido a que experimentan una serie de alteraciones en su sistema fisiológico, lo cual se refleja en los cambios de la concentración de sus componentes sanguíneos. En cuanto al límite inferior (13.5 °C) del intervalo establecido (13.5 – 22 °C), se observó que bajo estas temperaturas los organismos no revelan síntomas de estrés o deterioro fisiológico, ya que por una parte, los niveles de glucosa, cortisol, AST y ALT a los 13 °C en los ciclos de invierno no se incrementaron y tampoco se observaron Petequias abdominales. La disminución del cortisol, la glucosa y las células rojas indicó una desaceleración de la tasa metabólica de estos organismos debido a un ajuste homeostático y no necesariamente un estado de estrés, ya que contrariamente se han observado incrementos de la glucosa y el cortisol en los peces que han sido expuestos a temperaturas bajas estresantes (Le-Morvan *et al.*, 1995). La concentración de las células rojas indica que hubo una disminución en la tasa metabólica, en respuesta a las bajas temperaturas de los ciclos de invierno ya que se obtuvieron menores concentraciones de células rojas (150 y 188 cel·mL⁻¹ X 10⁷ para CS-INV y CA-Ver respectivamente). Esto se debe a que al disminuir la tasa metabólica en función de la temperatura los peces disminuyen su actividad,

y requerimientos energéticos. En este sentido, Chudkiz y Houston (1983) documentaron que la eritropoyesis o formación de nuevos eritrocitos en el pez dorado (*Carassius auratus*) tenía una relación directa con su historia térmica, ya que a menor temperatura disminuía la tasa metabólica. La disminución en la tasa metabólica puede ser la razón por la cual las sardinas evitaban incursionar en temperaturas menores a 13 °C, en donde posiblemente habría un efecto negativo que se vería reflejado en su crecimiento y capacidad natatoria.

En los estudios de temperaturas letales se observó que las sardinas eran muy tolerantes a temperaturas bajas, pero susceptibles a las altas. Esto también se reflejó en la respuesta de los parámetros sanguíneos, donde los valores de cortisol, glucosa, AST, ALT y las células rojas no se incrementaron a 13 °C, además de que la supervivencia en las fluctuaciones de invierno fueron similares a la obtenidas en la TO:18 °C; pero cuando los peces experimentaban los ciclos de verano a 23 °C, los valores de todos los parámetros sanguíneos se incrementaron (de 30 a 100 %).

Los resultados obtenidos de los parámetros sanguíneos de la sardina del Pacífico complementan y son concordantes con el comportamiento térmico.

IV.3 Aspectos Biológico-Pesqueros

Los estudios de comportamiento térmico y fisiología de la sardina del Pacífico pueden llegar a complementar trabajos realizados sobre la distribución y

el comportamiento migratorio de esta especie. Smith (2005) argumentó la importancia de estudiar la distribución de las diferentes subpoblaciones de sardina, utilizando distintas herramientas que complementen los estudios ya realizados.

El hecho de que las sardinas hayan elegido temperaturas similares en todos los tratamientos y que bajo tales condiciones los parámetros sanguíneos no se hayan alterado, podría reflejar la razón del comportamiento migratorio de esta subpoblación, ya que estas temperaturas se desplazan de Sur a Norte durante el verano. De acuerdo con este planteamiento, las sardinas migran hacia el Norte durante el verano y al Sur durante el invierno (COSEWIC, 2002).

El intervalo térmico establecido con base en las temperaturas de evitación (13.5 – 22 °C) es de 8.5 °C y sólo difiere en 1.5 °C del intervalo establecido con base en las temperaturas en las cuales se han registrado los mayores volúmenes de captura (14 - 21 °C) para las subpoblaciones fría y templada (Félix-Uraga *et al.*, 2004).

Con base en los datos de temperatura de diferentes localidades del Pacífico Norte documentados por Lynn *et al.* (1982), el intervalo de 13.5 a 22 °C implica una zona térmica óptima de miles de kilómetros. Por ejemplo, durante el primer trimestre del año este intervalo abarca desde Bahía Magdalena, Baja California hasta San Pedro, California, desde la superficie hasta una profundidad de 15 metros. En el tercer trimestre la zona térmica se desplaza hacia el norte, abarcando desde Isla Cedros hasta San Francisco (Fig.18). No obstante, la

localización y el tamaño de ésta zona térmica puede verse afectada por ciclos estacionales o por fenómenos climatológicos (Brosnan y Becker, 1998). Tomando en cuenta las temperaturas superficiales a lo largo del Pacífico norte durante todo el año (Lynn *et al.*, 1982) esta zona térmica se desplaza dentro de la zona geográfica que abarca desde la parte central de Baja California Sur hasta la parte central de California (Fig. 15). Clark y Janssen (1945) capturaron y marcaron organismos en San Sebastián Vizcaíno, Baja California Sur; después de liberarlos nuevamente al medio observaron que estos organismos migraron hasta la Bahía de San Francisco, California.

Es importante mencionar que aunque la zona de temperatura óptima tiene una extensión tan grande, ello no implica que sea seguro encontrar sardina en dichos lugares, ya que también existen otros factores que pueden influir en la distribución de estos organismos, tales como: intensidad de luz, presencia de alimento, presencia de depredadores, corrientes, salud del pez, compuestos químicos, entre otros (Emmett *et al.*, 2005; Lluch-Belda *et al.*, 1991; Misund *et al.*, 2003; Butler *et al.*, 1993).

Félix-Uraga *et al.* (2004) formularon un modelo de la distribución de las sardinas con base en los datos de captura y la temperatura superficial del mar (TSM), en el cual se propuso la existencia de tres distintas subpoblaciones, localizadas desde el Golfo de California hasta California. Según este modelo la subpoblación fría y la templada se desplazan dentro de la zona de Bahía Magdalena a California en un intervalo de temperatura superficial del mar de 13 a

22 °C. En congruencia, los resultados obtenidos en este trabajo fueron muy similares al intervalo que experimenta la sardina de la sub población fría y templada, ya que la zona de preferencia térmica de esta subpoblación puede ser modificada dentro de un intervalo de 13.5 a 22 °C. Estos resultados, sugieren que la sub-población templada tiene posibilidades de experimentar el ambiente térmico que habita la subpoblación fría (al menos hasta los 13 °C) sin tener algún efecto sobre su funcionamiento fisiológico.

Las investigaciones realizadas en el área de genética destacan que aunque hasta el momento no se han detectado diferencias, existen varias diferencias fenotípicas entre distintas subpoblaciones distribuidas a lo largo del Pacífico Norte, estas diferencias se acentúan hacia los extremos (Golfo de California y Washington) y son casi imperceptibles entre las sub-poblaciones localizadas en la parte central (Baja California y California). Contrastando estos resultados con el estudio de Félix-Uraga *et al.* (2005) sobre la morfometría de otolitos de sardina de California, Bahía Magdalena y el Golfo de California, se refuerza lo encontrado en los estudios de fisonomía y se complementa con los resultados del comportamiento termorregulador de esta especie, donde se observa una mayor similitud entre las sardinas de California y Bahía Magdalena en comparación con las del Golfo de California.

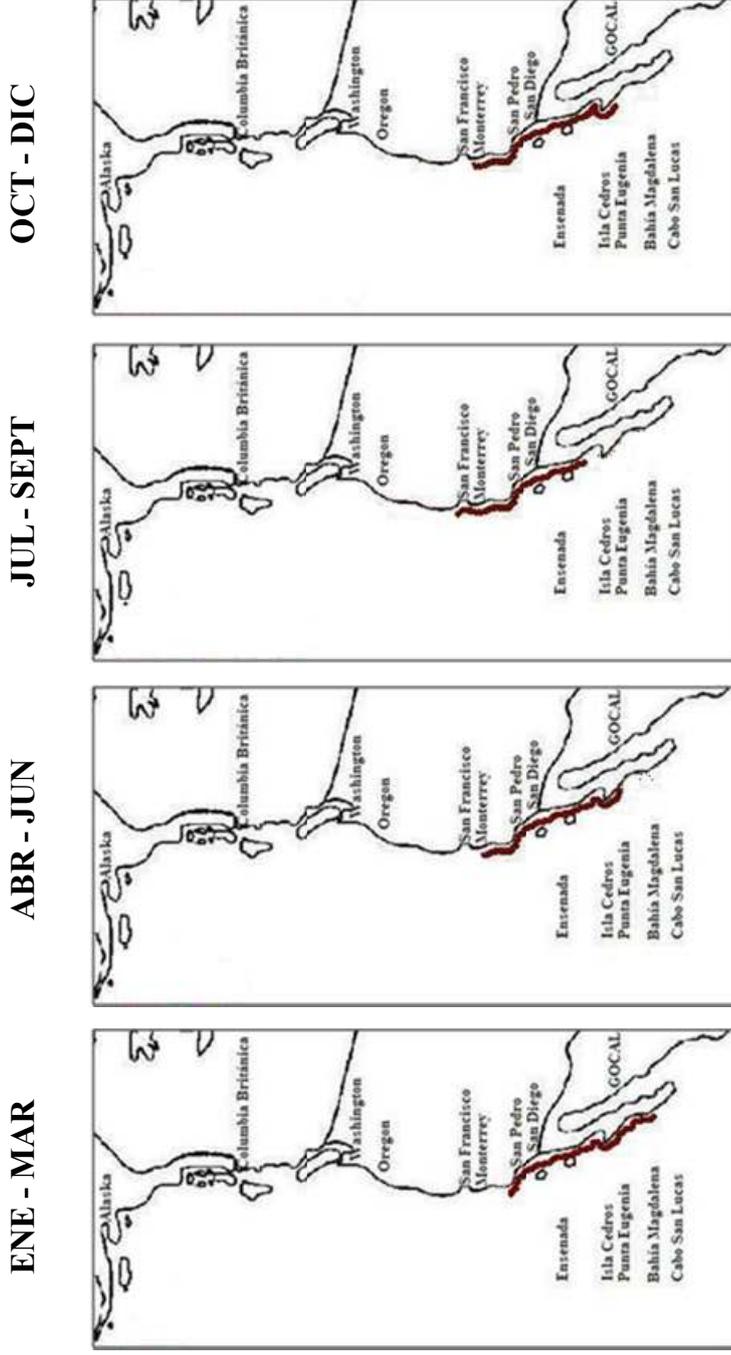


Figura 18. Zona geográfica que contiene las temperaturas óptimas para la subpoblación templada de *S. sagax caeruleus* a lo largo del año, con base en las temperaturas de evitación.

Aunque los resultados de la preferencia y evitación térmica de la sardina así como la respuesta en los parámetros sanguíneos sugieren la subpoblación templada posee la capacidad de explotar ambientes térmicos más fríos, lo cual incrementa las posibilidades de interacción con subpoblaciones más norteñas, es necesario realizar estudios con organismos de localidades más frías como Monterrey o San Francisco para corroborar esta aseveración.

Otros estudios importantes que pueden ser utilizados para determinar que zonas geográficas poseen temperaturas superficiales de mar que serían letales para las distintas subpoblaciones de sardina, son los de tolerancia térmica, donde se establecen las temperaturas letales de diferentes especies o subpoblaciones. Las temperaturas letales se han utilizado para establecer los límites de la zona de tolerancia de varias especies de peces teleósteos. Tsuchida (1995), encontró el valor de la TLIS para la sardina japonesa (*S. sagax melanostictus*) en 25 °C, el cual es similar al encontrado para la sardina del Pacífico en esta investigación. La sardina japonesa habita aguas subtropicales al igual que *S. sagax caeruleus* y experimenta temperaturas similares a la subpoblación muestreada (Whitehead, 1985). Las temperaturas letales superiores son menores a las que se registran durante el verano en las aguas superficiales de lugares sureños como: Bahía Magdalena, Cabo San Lucas, Guaymas y Mazatlán, donde la temperatura es superior a los 25 °C e incluso por encima de los 30 °C como ha sucedido en Guaymas y Mazatlán. En estos lugares, se ha documentado la presencia de sardinas y de la existencia de datos de captura en aguas con temperatura de 28

°C (datos no publicados) (Lluch-Belda *et al.*, 1991). Además mencionan que una subpoblación de sardina migraba de Guaymas a Topolobampo en invierno, e incluso se les llegaba a encontrar hasta las costas de Mazatlán en años fríos (La Niña) (Lluch-Belda *et al.*, 1986).

La presencia de *S. sagax caeruleus* en temperaturas superiores a los 25 °C (Félix-Uraga *et al.*, 2005) podría ser una evidencia de que se trata de subpoblaciones diferentes a la muestreada, la cual se encuentra adaptada o aclimatizada a temperaturas más elevadas, ya que con base en las TLIS, tales condiciones térmicas resultarían ser letales para los organismos de la subpoblación templada utilizados en este experimento. Además con base en los porcentajes de supervivencia de las sardinas aclimatadas a temperaturas constantes, 25 °C es una condición sub-letal (Hernández-Rodríguez y colaboradores, en proceso). La adaptación de la subpoblación sureña puede ser el producto de algún efecto de la temperatura en el desarrollo ontogénico o temprano de *S. sagax caeruleus*. Diversos autores han mencionado que las diferencias fenotípicas de las sardinas de localidades norteñas con respecto a las del Golfo de California podrían ser explicadas por el efecto de factores ambientales sobre el desarrollo ontogénico, ya que estas diferencias no han logrado ser explicadas por medio de estudios genéticos (Vrooman 1964; Hedgecock *et al.*, 1989; Lacomte *et al.*, 2004; De la Cruz-Agüero y García Rodríguez, 2005; Gutiérrez-Flores, 2007; Ríos-Vargas, 2007). Sin embargo, aunque no hay diferencias genéticas, las sardinas de lugares fríos poseen un mayor número de vértebras y tasas de

crecimiento más elevadas que las sardinas de lugares cálidos (Clark, 1936, 1947; Phillips 1948). Hernández-Rodríguez y colaboradores (*en proceso*) con base en los estudios de termorregulación por comportamiento en las sardinas aclimatadas a temperaturas constantes, plantean que la fisiología podría ser la herramienta que explique las diferencias entre las subpoblaciones tomando en cuenta que la interacción organismo-ambiente produce respuestas específicas en organismos de una misma especie que viven en diferentes localidades y que se encuentran sujetas a diferentes presiones de selección ambiental, produciendo lo que se conoce como razas fisiológicas.

A excepción del experimento de Tsuchida (1995), no existen otros estudios de la TLIS o TLII para ningún organismo del género *Sardinops*. El estudio de los límites de tolerancia de las demás subpoblaciones de sardina aportaría datos relevantes para establecer los límites geográficos de su distribución y las posibles interacciones entre ellas.

Tomando en cuenta las TCM_{max} y TCM_{min} que comúnmente se utilizan como indicadores de estrés y de adaptación (Paladino *et al.*, 1980) y la temperatura superficial del mar, es posible conocer si la sardina de la subpoblación templada experimenta el proceso conocido como endurecimiento térmico por los cambios de temperatura del agua. Aunque las sardinas pueden encontrarse incluso a profundidades de más de 100 metros, los estudios han demostrado que la mayor parte del tiempo se les encuentra en la superficie, dentro de los primeros 20 a 30 metros (Emmett *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006) e incluso durante la noche

pueden llegar a distribuirse horizontalmente en los primeros 10 metros en donde se alcanzan temperaturas cercanas a los 0 °C en lugares como Alaska y 30 °C en lugares como Guaymas. Tomando en cuenta las temperaturas superficiales (10 - 15 m) a lo largo del Pacífico Norte y los resultados del estrés térmico descendente en las sardinas de todos los tratamientos sugieren que los organismos muestreados podrían llegar a resistir temperaturas presentes en lugares como Oregón, pero morir en aguas como las de Alaska (Lynn *et al.*, 1982).

Los resultados de estrés térmico ascendente de la sardina permiten inferir que temperaturas superficiales como las presentes en algunos lugares del sur de la Península de Baja California (> 29 °C) podrían matar rápidamente a un cardumen de esta subpoblación. Aunque en estos lugares las sardinas podrían migrar hacia mayor profundidad para evitar un daño fisiológico, no podrían visitar la superficie como comúnmente lo hacen los cardúmenes de este género (Giannoulaki *et al.*, 1999; Emmett *et al.*, 2005).

Los resultados de tolerancia y resistencia de la sardina, demuestran que existen muy pocas probabilidades de que la subpoblación muestreada esté presente en lugares sureños como Bahía Magdalena, Los Cabos y el Golfo de California durante la época de verano.

En cuanto a los límites térmicos inferiores (TLII y TCMIn), el hecho de que esta subpoblación posea una alta resistencia hacia bajas temperaturas, no necesariamente significa que habite en lugares norteños como Oregón y Washington, ya que como se observó en este estudio, estos peces sólo

incursionan en aguas con temperaturas mayores a los 13 °C, aun cuando en el gradiente térmico la temperatura alcanzaba los 10 °C. Sin embargo, el hecho de que temperaturas como 13 °C no afecten fisiológicamente a las sardinas muestreadas, aunado a su alta resistencia a bajas temperaturas, hace factible el hecho de considerar que podría haber una elevada interacción de éstas sardinas con subpoblaciones más norteñas (de Oregón y Washington) lo cual significaría un alto intercambio genético entre organismos de distintas localidades. Por el contrario, el flujo genético entre la subpoblación muestreada y subpoblaciones sureñas como la de Bahía Magdalena o el Golfo quizás sea menor, debido a la susceptibilidad de estos peces a las temperaturas altas (> 23 °C), de tal manera que el flujo podría ocurrir solo si en cierta época del año hubiera una zona en donde se traslapen los límites térmicos de ambas sub-poblaciones, lo cual aparentemente ocurre durante el proceso de migración. Aunque no existen diferencias genéticas significativa entre las distintas subpoblaciones, se ha enfatizado que las diferencias son menores entre subpoblaciones norteñas (California hasta Canadá) en comparación con las sureñas (Bahía Magdalena hasta Golfo de California) (Lacomte *et al.*, 2004; Gutiérrez-Flores, 2007), lo cual implicaría un menor flujo genético hacia éstas últimas. No obstante, es necesario estudiar los límites térmicos de las subpoblaciones restantes, para saber si existen diferencias, lo cual podría esperarse, y de esta manera fortalecer aún más la teoría de que el ambiente tiene un efecto sobre el desarrollo ontogénico de éstos organismos y que por tal razón existen diferencias fenotípicas pero no genéticas.

Los resultados de la presente investigación explican que la subpoblación muestreada posee límites térmicos y fisiológicos específicos donde se puede inferir que estos organismos son altamente susceptibles a las temperaturas altas, lo que no solamente se vio reflejado en el comportamiento térmico como la evitación de temperaturas dentro del gradiente (23 °C) y una TLIS de 25 °C, sino también en la alteración de todos los parámetros sanguíneos monitoreados en 23 °C. Con base en esto, la hipótesis de que estos organismos puedan ser los mismos que los encontrados en Bahía Magdalena o el Golfo de California durante la época de verano es poco probable, ya que bajo tales condiciones el estado fisiológico de las sardinas puede ser afectado.

Con base en los resultados del presente trabajo, surge la importancia de continuar con este tipo de investigaciones considerando las sub-poblaciones de la parte fría y cálida para profundizar en los efectos de la temperatura sobre la fisiología de *S. sagax caeruleus*. Finalmente, el conocimiento de los límites térmicos y de las respuestas reflejadas en los parámetros sanguíneos de la sardina pueden contribuir como base para establecer condiciones óptimas en estudios enfocados a la reproducción, fisiología y en un futuro al cultivo de éstos organismos.

Capítulo V

Conclusiones

La sardina del Pacífico (*Sardinops sagax caeruleus*) tiene un preferendum final térmico de 18 °C que no fue afectado por la historia térmica ya que en esta temperatura al parecer la sardina encuentra su óptimo fisiológico.

La sardina tiene la capacidad de modificar su intervalo de preferencia térmica (13.5 – 22.5 °C), lo cual le permite aclimatizarse a diferentes condiciones de temperatura y con ello explotar una amplia zona geográfica a lo largo de la Península de Baja California y California. En el mismo contexto, el desplazamiento geográfico de esta zona térmica ocasionado por el cambio climático estacional o por fenómenos climatológicos podría explicar el comportamiento migratorio de la sub-población templada de sardina.

La preferencia térmica (13.5 – 22.5 °C) indica que la sardina de la subpoblación templada podría distribuirse en la zona ocupada por la subpoblación fría, por lo que se podría pensar que son dos sub-poblaciones con un alto grado de interacción.

Las sardinas fueron resistentes a las bajas temperaturas, por lo cual podrían ser capaces de explotar el hábitat de la sub-población fría. Por el contrario, estos peces son susceptibles a las altas temperaturas (≥ 23 °C). Con base en estos resultados y asumiendo que fuera la temperatura la que determina

el patrón de distribución de esta especie se podría pensar que las temperaturas en donde se encuentran los organismos de la subpoblación cálida ($> 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) afectan el estado fisiológico de las sardinas de la sub-población templada, incluso aquellas temperaturas que experimentan las sardinas dentro del Golfo de California pueden llegar a ser letales para los organismos estudiados.

El comportamiento térmico de la sardina podría ser una herramienta para inferir sobre su distribución geográfica, lo cual concuerda con lo documentado en estudios de campo. Además, permite inferir sobre su desplazamiento en el caso de que ocurran fenómenos climatológicos.

La temperatura arriba de los $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, estresa a los peces y deteriora su condición fisiológica, lo cual se vio reflejado en la alteración de los parámetros sanguíneos, afectando su supervivencia. Además el tiempo de exposición a temperatura sub-óptimas tiene un efecto directamente proporcional al nivel de estrés, el deterioro de la condición fisiológica y la supervivencia de la sardina.

La temperatura de aclimatación afectó los parámetros sanguíneos de la sardina de la subpoblación templada. El cortisol y la glucosa mostraron ser una herramienta útil para monitorear el estado de estrés de la sardina; mientras que la enzima AST demostró ser un indicador sensible y efectivo de su estado fisiológico. Por el contrario, aunque la enzima ALT mostró la misma tendencia de los demás parámetros sanguíneos, su variabilidad es muy alta como para ser un indicador confiable para esta especie.

Capítulo VI

Recomendaciones

Es necesario estudiar el comportamiento térmico de sub-poblaciones de *S. sagax caeruleus* que habitan lugares norteños como Oregón y Columbia Británica, así como aquellas de zonas sureñas como Bahía Magdalena y el Golfo de California. Esto ayudará a tener un panorama más amplio en el conocimiento de la migración e interacción de las distintas sub-poblaciones de sardina.

Es recomendable evaluar el efecto de los diferentes factores (además de la temperatura) extrínsecos e intrínsecos sobre la fisiología de esta especie. Por ejemplo, la luz, presencia de alimento, presencia de depredadores, mareas rojas, talla, estado nutricional, entre otros. Además, es necesario estudiar el efecto de la temperatura sobre el desarrollo ontogénico y el comportamiento térmico de la sardina.

Los programas de pesca podrían considerar el comportamiento térmico de la sardina para establecer medidas más adecuadas en cuanto a la explotación de este importante recurso.

Es importante seguir estudiando la fisiología de esta especie y establecer un mayor número de indicadores fisiológicos de la sardina, tanto de sangre como a nivel de tejido, ya que no existen estudios que permitan determinar la condición

fisiológica de una determinada sub-población ante un evento climático o algún otro factor ambiental.

Literatura citada

Ahlstrom, E.H. 1960. Synopsis on the biology of the Pacific sardine (*Sardinops caerulea*), p. 415-451. En: Proceedings of the World Scientific Meeting on the biology of sardines and related species. Vol. 3. FAO, Rome.

Allocation of the Pacific Sardine Guideline-Regulatory Amendment for the Coastal Pelagic Species Fishery Management Plan. 2003. (Document prepared by the Pacific Fishery Management Council for the Department of Commerce National Marine Fisheries Service Southwest Region). Pacific Fishery Management Council, 7700 NE Ambassador Place, Suite 200, Portland, Oregon 97220-1384.

Alpaugh, W.C. 1972. High lethal temperatures of golden shiners (*Noteomigonus crysoleucas*). Copeia. 1:181-185.

Angilletta, M.J.Jr., Niewiarowski, P.H. y Navas, C.A. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. Journal of Thermal Biology. 27:249-268.

Aragão, C., Corte-Real, B., Cosas, B., Dinis, M.T. y Conceição, L.E.C. 2008. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Amino Acids. 34:143-148.

- Armour, C.L. 1991. Guidance for Evaluating and Recommending Temperature Regimes to Protect Fish. U.S. Fish Wild. Serv., *Biol. Rep.* 90(22). 13pp.
- Begg K. and Pankhurst N.W. 2004. Endocrine and metabolic responses to stress in a laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *Journal of Fish Biology*. 64:133-145.
- Beitinger T.L. y Fitzpatrick L.C. 1979. Physiological and ecological correlates of preferred temperature in fish. *American Zoologist*. 19:319-329.
- Benfley, T.J., McCabe, L.E. y Pepin, P. 1997. Critical thermal maxima of diploid and triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Environmental Biology of Fishes*. 49:259-264.
- Brett, J.R. 1946. Rate of gain of heat tolerance in goldfish. University of Toronto Stud. Biol. Series 53. Pub. Ont. Fish. Res. Lab., 64:21 pp.
- Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth. 599-675 p. En.: Hoar, W.S., Randall, D.J. y Brett, J.R. (eds). *Fish physiology*, Vol 8. Academic Press, New York.
- Brosnan, D.M. y Becker, C.J. 1998. El Nino southern oscillations (ENSO) and their Impacts on marine populations. Public Review Draft, Section 6, part B. 60p.
- Butler, J.L., Smith, P.E. y Lo, C-H. 1993. The effect of natural variability of life-history parameters on anchovy and sardine population growth. *CalCOFI*. 34:104-111.

- Bückle, L.F., Barón, B., Hernández, M., Ledo, A., Solís, R., Pérez, B. y Hernández, A. 2003. Sistema de temperatura oxígeno y salinidad para la experimentación en ecofisiología. *Hidrobiológica*. 13:277-287.
- Carveth, J., Widmer, A.M., Bonar, S.A. y Simms J.R. 2007. An examination of the effects of chronic static and fluctuating temperature on the growth and survival of spikedace, *Meda fulgida*, with implications for management. *Journal of Thermal Biology*. 32:102-108.
- Choi, C.Y., Min, B.H., Jo, P.G. y Chang, Y.J. 2007. Molecular cloning of PEPCK and stress response of black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) to increased temperature in freshwater and seawater. *General and Comparative Endocrinology*. 152:47-53.
- Chudzik, J. y Houston, A.H. 1983. Temperature and erythropoiesis in goldfish. *Canadian Journal of Zoology*. 61:1322-1325.
- Ciereszko, A., Liu, L. y Dabrowski, K. 1998. Optimal conditions of determination of aspartate aminotransferase activity in rainbow trout and whitefish. *Journal of Applied Ichthyology*. 14:57-63.
- Cifuentes-Lemus, J.L., Torres-Garcia, P. y Frias, M.M. 1995. II. La pesca en México. En: Cifuentes-Lemus, J.L., Torres-Garcia, P. y Frias, M.M. *El Océano IX. La Pesca. Ciencias del Mar: Oceanografía Biológica*. Segunda Edición.

- Cifuentes-Lemus, J.L., Torres-Garcia, P. y Frias, M.M. 1997. Comportamiento de los organismos marinos frente a la temperatura y a la salinidad. En: Cifuentes-Lemus, J.L., Torres-Garcia, P. y Frias, M.M. El Océano y sus Recursos IV. Ciencias del Mar: Oceanografía Biológica.
- Cincotta, D.A. y Stauffer Jr., J.R. 1984. Temperature preference and avoidance studies of six North American freshwater fish species. *Hydrobiologia*. 109:173-177.
- Clark, F.N. 1936. Variations in the number of vertebrae of the sardine, *Sardinops caerulea* (Girard). *Copeia*. 3:147-150.
- Clark, F.N. y Janssen Jr., J. F. 1945. Movements and abundance of the sardine as measured by tag returns. *Calif. Div. Fish Game Fish Bulletin*. 61:7-42.
- Clark, F.N. 1947. Analysis of populations of the Pacific sardine on the basis of vertebral counts. *Calif. Div. Fish Game, Fish Bulletin* 65, 26 p.
- Cook, A.M., Duston, J. y Bradford, R.G. 2006. Thermal tolerance of a northern population of striped bass *Morone saxatilis*. *Journal of Fish Biology*. 69:1482-1490.
- Cooke, S.J., Suski, C.D., Danylchuk, S.E., Danylchuk, A.J., Donaldson, M.R., Pullen, C., Bulté, G., O'toole, A., Murchie, K.J., Koppelman, J.B., Shultz, A.D., Brooks, E., Goldberg, T.L. 2008. Effects of different capture techniques on the physiological condition of bonefish *Albula vulpes* evaluated using field diagnostic tools. *Journal of Fish Biology*. 73:1351-1375.

- 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 pp.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, T.M. y Conceição L.E.C. 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research*. 39:1-9.
- Cox, D.K., 1974. Effect of three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill. In *Thermal ecology*. Edited by J.W. Gibbons and R.R. Sharitz. Atomic Energy Commission Symposium Ser. (CONF-730505), USAEC Technical Information Center, Oak Ridge, Tenn. Pp. 158-163.
- Culley, M. 1971. *The pilchard—biology and exploitation*. Pergamon Press Limited. Oxford.
- Currie R.J., Bennett W.A. y Beitinger T.L. 1998. Critical thermal minima and maxima of three freshwater game-fish species acclimated to constant temperatures. *Environmental Biology of Fishes*. 51:187-200.
- Currie, R.J., Bennett, W.A., Beitinger, T.L. y Cherry, D.S. 2004. Upper and lower temperature tolerances of juvenile freshwater game-fish species exposed to 32 days of cycling temperatures. *Hydrobiologia*. 523:127-136.
- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K. y Das, B.K. 2004. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic

- parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Aquaculture Research. 35:134-143.
- Das T, A.K. Pal, S.K. Chakraborty, S.M. Manush, N.P. Sahu y Mukherjee, S.C. 2005. Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. Journal of Thermal Biology. 30:378-383.
- De la Cruz-Agüero, J. y García-Rodríguez, F.J. 2005. Morphometric stock structure of the Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) off Baja California, México. Capítulo 9, 115-125. En: Elewa AMT (ed). Morphometrics: Applications in Biology and Paleontology. Springer, Netherlands.
- Del Rio Zaragoza, O., Hernández-Rodríguez, M. y Bückle-Ramirez, L.F. 2008. Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. 41:79-89.
- Dickhoff, W.W. 1989. Salmonids and annual fishes: Death after sex. En: Schreibman, M.P. y Scanes, C.G. (eds). Development, maturation, and senescence of neuroendocrine systems: A comparative approach. 253-266. Academic press, New York.
- Elliott, J.M. y Elliott, J.A. 1995. The effect of the rate of temperature increase on the critical thermal maximum for parr of Atlantic salmon and brown trout. Journal of Fish Biology. 47:917-919.

- Emmett, R.L., Brodeur, R.D., Miller, T.W., Pool, S.S., Krutzkowsky, G.K., Bentley, P.J. y Mc Crae, J. 2005. Pacific sardine (*Sardinops sagax*) abundance, distribution, and ecological relationships in the Pacific Northwest. *CalCOFI*. 46:122-143.
- Fagundes, M. y Urbinati E.C. 2008. Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures. *Aquaculture*. 276:112-119.
- Félix-Uraga, R., Alvarado-Castillo, K.M. y Carmona-Piña, R. 1996. The sardine fishery along the western coast of Baja California, 1981 to 1994. *CalCOFI*. 37:188-193.
- Félix-Uraga, R., Gómez-Muñoz, V.M., García-Franco, W., Quiñonez-Velazquez, F.C. y Melo-Barrera, F.N. 2004. On the existence of Pacific sardine groups off the West coast of Baja California and southern California. *CalCOFI*. 45:146-151.
- Félix-Uraga, R., Gómez-Muñoz, V.M., Quiñonez-Velázquez, C., Melo-Barrera, F.N. y García-Franco, W. 2005. Pacific sardine (*Sardinops sagax*) stock discrimination off the west coast of Baja California and southern California using otolith morphometry. *CalCOFI*. 46:113:121.
- Ferguson RG. 1958. The preferred temperature of fish and their midsummer distribution in temperate lakes and streams. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 15:607-624.
- Fletcher, W.J. 1999. Vertical distribution of pilchard (*Sardinops sagax*) eggs and larvae off southern Australia. *Marine and Freshwater Research*. 50:117-122.

- FAO. 2008. The state of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome. 176pp.
- Frimodt, C., 1995 Multilingual illustrated guide to the world's commercial coldwater fish. Fishing News Books, Osney Mead, Oxford, England. 215 p.
- Fry, F.E.J., Brett, J.R. y Clawson, G.H. 1942. Lethal limits of temperature for young goldfish. *Revista Canadiense de Biología*. 1:50-56.
- Fry, F.E.J. 1947. Effects of the environment on animal activity. Univ. Toronto Studies, Biol. Ser. 55, Ontario Fish. Res. Lab. Publ. 68:1-62.
- Gené, J.A. y Robles, A. 1987. Determinación de la dosis letal 50 por el método de Spearman-Kärber. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños. Costa Rica*. 1:35-40.
- Giannoulaki, M., Machias, A. y Tsimenides N. 1999. Ambient luminance and vertical migration of the sardine *Sardina pilchardus*. *Marine Ecology Progress Series*. 178:29-38.
- Gil-Barcellos, L.J., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Fagundes, M., de Almeida-Lacerda, L. y Terra, S. 2003. Hematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rahmdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. *Aquaculture Research*. 34:1465-1469.

- Gilmour, K.M., DiBattista, J.D. y Thomas, J.B. 2005. Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. *Integrative and Comparative Biology*. 45:263-273.
- Gutierrez-Flores, C. 2007. Estructura genética poblacional de la sardina del Pacífico Nororiental *Sardinops sagax caeruleus*. Tesis de Maestría. CICESE. 106pp.
- Hammann, M. G., Baumgartner, T. R. y Badan-Dangon, A. 1988. Coupling of the Pacific sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) life cycle with the Gulf of California pelagic environment. Pacific sardine in the Gulf of California. *CalCOFI Rep.* 29:102-109.
- Hanna, S.K., Haukenes, A.H., Foy, R.J. y Buck, S.L. 2008. Temperature effects on metabolic rate, swimming performance and condition of Pacific cod *Gadus macrocephalus* Tilesius. *Journal of Fish Biology*. 72:1068-1078.
- Hart, J.L. 1938. A brief account of the life-history of the pilchard. Pages 50-56 in Report of the British Columbia Fisheries Department 1937.
- Hart, J.L. 1943a. Tagging experiments of British Columbia pilchards. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 6:164-181.
- Hart, J.L. 1943b. The pilchard *Sardinops caerulea* (Girard) on the Canadian fishing grounds with special reference to an unusual abundance of young fish. *Transactions of the Royal Society of Canada Series*. 3:55-73.

- Hart, J.L., 1973 Pacific fishes of Canada. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada. 180:740 p.
- Hattingh, J. 1977. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater fish, *Labeo capensis* (Smith). Journal of Fish Biology. 10:191-195.
- Hedgecock, D., Hutchinson, E.S., Li, G., Sly, FL. y Nelson, K. 1989. Genetic and morphometric variation in the Pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*: Comparisons and contrasts with historical data and with variability in the northern anchovy, *Engraulis mordax*. Fishery Bulletin. 87:653-671.
- Hendricks L.J. 1952. Erythrocyte counts and hemoglobin determinations for two species of suckers, genus *Catostomus*, from Colorado. Copeia. 1952:265-266.
- Hernández-López, R. 2006. Efecto de la temperatura crítica máxima y la letal superior sobre el tejido hepático y renal de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax*, (Jenyns, 1842). Tesis de Maestría. 75p. CICESE, Baja California.
- Hill, K. T., N. C. H. Lo, B. J. Macewicz, and R. Felix-Uraga. 2005. Assessment of the Pacific sardine (*Sardinops sagax caerulea*) population for U.S. management in 2006. Pacific Fishery Management Council, Agenda Item D.1.a, Supplemental Attachment 1. 141 p.

- Hill, K. T., Dorval, E., Lo, N. C. H., Macewicz, B. J., Show, C. y Felix-Uraga, R. 2008. Assessment of the Pacific sardine resource in 2008 for U.S. management in 2009. Agenda Item G.2.b. 52p.
- <http://www.fishbase.ca/tools/aquamaps/search.php>. Consultado en Septiembre de 2009
- Huey, R.B. y Bennett, A.F. 1990. Physiological adjustments to fluctuating thermal environments: An ecological and evolutionary perspective. *Stress proteins in biology and medicine*. 37-59 p.
- Hutchison, V.H. y Maness, J.D. 1979. The role of behavior in temperature acclimation and tolerance in ectotherms. *American Zoologist*. 19:367-384.
- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B. y Ackerman, P.A. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*. 39:901-909.
- Jobling, M. 1981. Temperature tolerance and the final preferendum – rapid methods for the assessment of optimal growth temperatures. *Journal of Fish Biology*. 19:439-455.
- Johnson, J.A. y Kelsch, S.W. 1998. Effects of evolutionary thermal environment on temperature-preference relationships in fishes. *Environmental Biology of Fishes*. 53:447-458.
- Kilgour, D.M. y McCauley, R.W. 1986. Reconciling the two methods of measuring upper lethal temperatures in fishes. *Environmental Biology of Fishes*. 17:281-290.

- King, W., Buckley, L.J. y Berlinsky, D.L. 2006. Effect of acclimation temperature on the acute stress response in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* L., and haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquaculture Research*. 37:1685-1693.
- Konecki, J.T., Woody, C.A. y Quinn, T.P. 1995. Temperature preference in two populations of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Environmental Biology of Fishes*. 44:417-421.
- Konstantinov, A.S. y Zdanovich, V.V. 2007. Influence of temperature oscillations on some hematological values and metabolism of fish. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 62:59-64.
- Lacomte, F., Grant, W.S., Dodson, J.J., Rodríguez-Sánchez, R. y Bowen, B.W. 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology*. 13:2169-2182.
- Lasker, K. 1961. An experimental study of the effect of temperature on the incubation time, development, and growth of Pacific sardine embryos and larvae. *Copeia*. 1964:399-106.
- Le-Morvan, C., Troutaud, D. y Deschaux, P. 1995. Effects of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and non-specific cytotoxic activity. *Developmental and Comparative Immunology*. 19:87-95.

- Lecklin, T., Nash, G.B. y Egginton, S. 1995. Do fish acclimated to low temperature improve microcirculatory perfusion by adapting red cell rheology?. *The Journal of Experimental Biology* 198:1801-1808.
- Lehninger, A.L. 1995. *Bioquímica*. Segunda Edición. Ediciones Omega S.A. de C.V. Barcelona, España. 1117 pp.
- Lima, L.C. y Ribeiro, L.P. 2006. Effects of temperature on performance characteristics and the cortisol stress response of surubim *Pseudoplatystoma sp.* *Journal of the World Aquaculture Society*. 37:90-95.
- Lluch-Belda, D., Magallón, F.J. y Schwartzlose, R.A. 1986. Large fluctuations in the sardine fishery in the Gulf of California: Possible causes. *CalCOFI*. 27:136-140.
- Lluch-Belda, D., Cota, D.B., Hernandez-Vazquez, S., Salinas-Zavala, A. y Schwartzlose, R.A. 1991. Sardine and anchovy spawning as related to temperatura and upwelling in teh California Current System. *CalCOFI Rep.* 32:105-111.
- Lo, N.C.H., Green-Ruiz, Y.A., Jacob-Cervantes, M., Moser, H.G. y Lynn, R.J. 1996. Egg production and spawning biomass of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) in 1994, determined by the daily egg production method. *CalCOFI Rep.* 37:160-174.

- Lowe, C. J. y Davison, W. 2005. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. *Journal of Fish Biology*. 67:752-766.
- Lucas, A. 1996. Physical concepts of bioenergetics. In: Lucas A, *Bioenergetics of aquatic animals*. English edition, Taylor & Francis.
- Lutterschmidt, W. I. y Hutchison, V. H. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*. 75:1561-1574.
- Lynn, R.J., Bliss, K.A. y Eber, L.E. 1982. Vertical and horizontal distributions of seasonal mean temperature, salinity, sigma-t, stability, dynamic height, oxygen, and oxygen saturation in the California current, 1950-1978. *CalCOFI Atlas*, No. 30. 432p.
- Lyytikäinen, T., Koskela, J. y Rissanen, I. 1997. Thermal resistance and upper lethal temperatures of underyearling Lake Inari Arctic charr. *Journal of Fish Biology*. 51:515-525.
- Mahoney, J.J. y Hutchison, V.H. 1969. Photoperiod acclimation and 24-hour variations in the critical thermal maxima of a tropical and a temperate frog. *Oecologia*. 2:143-161.
- Makarieva, A.M., Gorshkov, V.G., Li, B.A.I.-L. y Chown, S.L. 2006. Size- and temperature-independence of minimum life-supporting metabolic rates. *Functional Ecology*. 20:83-96.
- Mandelman, J.W. y Farrington, M.A. 2007. The physiological status and mortality associated with otter-trawl capture, transport, and captivity of an exploited

- elasmobranch, *Squalus acanthias*. ICES Journal of Marine Science. 64:122-130.
- Marçalo, A., Mateus, L., Duarte-Correia, J.H., Serra, P., Fryer, R. y Stratoudakis, Y. 2006. Sardine (*Sardina pilchardus*) stress reactions to purse seine fishing. Marine Biology. 6:1509-1518.
- Matthews, W.J. y Maness, J.D. 1979. Critical thermal maxima, oxygen tolerances and success of Cyprinid fishes in a southwestern river. American Midland Naturalist. 102:374-377.
- McMahon, T.E., Bear, E. y Zale, A.V. 2008. Use of an annular chamber of testing thermal preference of westlope cutthroat trout and rainbow trout. Journal of Freshwater Ecology. 23:55-63.
- McFarlane, G.A. y Beamish, R.J. 2001. The re-occurrence of sardines off British Columbia characterizes the dynamic nature regimes. Progress in Oceanography. 49:151-165.
- McFarlane, G.A., Schweigert, J., MacDougall, L. y Hrabok, C. 2005. Distribution and biology of Pacific sardines (*Sardinops sagax*) off British Columbia, Canada. Pacific sardine distribution and biology. CalCOFI Rep. 46:144-160.
- Misund, O.A., Coetzee, J.C., Fréon, P., Gardener, M., Olsen, K., Svellingen, I. y Hampton, I. 2003. Schooling behaviour of sardine *Sardinops sagax* in False Bay, South Africa. African Journal of Marine Sciences. 25:185-193.

- Morales, A.E., Cardenete, G., Abellán, E. y García-Rejón, L. 2004. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex*, Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*. 36:33-40.
- Morrisey, M.B., Susuki, C.D., Esseltine, K.R. y Tufts, B.L. 2005. Incidence and physiological consequences of decompression in smallmouth bass after live-release angling tournaments. *Transactions of the American Fisheries Society*. 143:1038-1047.
- Nelson, C.L. y Prosser, D.O. 1981. The role of nervous systems in temperature adaptation of poikilotherms. *Annual Reviews of Physiology*. 43:281-300.
- Nelson DL, Cox MM. 2005. *Principles of biochemistry*. 4th ed. W.H. Freeman & Co. New York.
- Nikinmaa, M. y Huests W.H 1984. Adrenergic swelling of nucleated erythrocytes: cellular mechanisms in a bird, domestic goose, and two teleosts, striped bass and rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*. 113:215-224.
- Oluah, N.S. 1986. Plasma aspartate aminotransferase activity in the catfish *Clarias albopunctatus* exposed to sublethal zinc and mercury. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63:343-349.
- Öner, M., Atli, G. y Canli, M. 2008. Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:360-366.

- Paladino, F.V., Spotila, J.R., Schubauer, J.P., Kowalski, K.T. 1980. The critical thermal maximum: a technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fish. *Rev. Can. Biol.* 39:115–122.
- Pérez-Casanova, J.C., Rise, M.L., Dixon, B., Afonso, L.O.B., Johnson, S.C. y Gamperl, A.K. 2008. The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature. *Fish and Shellfish Immunology*. 24:600-609.
- Phillips, J. 1948. Growth of the sardine *Sardinops caerulea*, 1941-42 trough 1946-47. *Fish Bulletin*. 71:33.
- Pickering, A.D. y Pottinger, T.G. 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *Journal of Fish Biology*. 30:701-712.
- Poledník, L., Řehulka, J., Kranz, A., Poledníková, K., Hlaváč, V. y Kazihnitková, H. 2008. Physiological responses of over-wintering common carp (*Cyprinus carpio*) to disturbance by Eurasian otter (*Lutra lutra*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 34:223-234.
- Primett, D.R.N., Randall, D.J., Mazeaud, M. y Boutlier, R.G. 1986. The role of catecholamines in erythrocyte pH regulation and oxygen transport in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exercise. *Journal of Experimental Biology*. 122:139-148.
- Prosser, C.L. y Nelson, D.O. 1981. The role of nervous systems in temperature adaptation of poikilotherms. *Annual Reviews of Physiology*. 43:281-300.

- Prosser, C.L. 1986. Adaptational biology: Molecules to organisms. John Wiley, New York.
- Radovich, J. 1982. The collapse of the California sardine fishery: what have we learned?. CalCOFI Rep. 23:56-78.
- Reber, C.M. y Bennett, W.A. 2007. The influence of thermal parameters on the acclimation responses of pinfish *Lagodon rhomboides* exposed to static and decreasing low temperatures. Journal of Fish Biology. 71:833-841.
- Rios-Vargas, Y. 2007. Evaluación genética de las etapas tempranas de vida de *Sardinops sagax caeruleus*. Tesis de Maestría. CICESE. 67pp.
- Rome, L.C., Choi, I-H., Lutz, G. y Sosnicki, A. 1992. The influence of temperature on muscle function in the fast swimming scup. I. Shortening velocity and muscle requirement during swimming. Journal of Experimental Biology. 163:259-279.
- Roots, B.I. y Prosser, C.L. 1962. Temperature acclimation and the nervous system in fish. Journal of Experimental Biology. 39:617-629.
- Santos, A.M.P., Dos Santos, A. y Peliz, A. 2006. Vertical distribution of the European sardine (*Sardina pilchardus*) larvae and its implications for their survival. Journal of Plankton Research. 28:253-532.
- Schweigert, J.F. 2002. Update COSEWIC status report on the *Sardinops sagax* in Canada. En: COSEWIC assessment and update status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. 19pp.

- Shi, X., Li, D., Zhuang, P., Nie, F. y Long, L. 2006. Comparative blood biochemistry of Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii* , and Chinese surgeon, *Acipenser sinensis*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 32:63-66.
- Shreck, C.B. y Moyle P.B. (eds).1990. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 684p.
- Sizer, I.W., y Jenkins, W.T. 1962. Glutamic aspartic transaminase from pig ventricles. *Methods in Enzymology*. 5:677–684.
- SIAP-SAGARPA. 2004. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, con datos de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Sardina: Volumen de la producción pesquera en peso vivo y principales entidades el pacífico en la producción.
- Smith, P. y Fisheries Research Division. 2005 A history of proposals for subpopulation structure in the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) population off western North America. *CalCOFI Rep*. 26:76-82.
- Stenevik, E.K., Sundby, S. y Cloete, R. 2001. Influence of buoyancy and vertical distribution of sardine (*Sardinops sagax*) eggs and larvae on their transport in the Northern Benguela upwelling system. En: *A Decade of Namibian Fisheries Science*. A.I.L Payne, S.C. Pillar y R.J.M. Crawford (eds). *South African Journal of Marine Sciences*. 23:85-97.
- Thomas, R.E., Gharrett, J.A., Carls, M.G., Rice, S.D., Moles, A. y Korn, S. 1986. Effects of fluctuating temperature on mortality, stress, and energy reserves

- of juvenile coho salmon. Transactions of the American Fisheries Society. 115:52-59.
- Tiwari, S. y Singh, A. 2004. Piscidal activity of alcoholic extract on *Nerium indicum* leaf and their biochemical stress response on fish metabolism. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 1:15-29.
- Tsuchida, S. 1995. The relationship between upper temperature tolerance and final preferendum of Japanese marine fish. Journal of Thermal Biology. 20:35-41.
- Trenzado, C.E., Morales, A.E. y De la Higuera, M. 2006. Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. Aquaculture. 258:583-593.
- Valenzuela, A.E., Silva, V.M. y Klempau, A.E. 2008. Effects of different artificial photoperiods and temperatures on haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry. 2:159-167.
- Venkateswara Rao, J. 2006. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. Chemosphere. 65:1814-1820.
- Vrooman, A. M. 1964. Serologically differentiated subpopulations of the Pacific sardine, *Sardinops caerulea*. Journal of Fisheries Research Board of Canada. 21:691-701.

- Ware, D.M. 2001. Forecasting the time of arrival and availability of Pacific sardine in British Columbia. Manuscrito no publicado, preparado para el departamento de pesquerías y océanos, 22pp.
- Watts, R.D. y Watts, D.C. 1974. En: chemical Zoology (M. Florkin and B.T. Scheer Eds.) Volume VIII. Deuterostomians. Cyclostomes and fishes. Academic press, New York.
- Wells, R.M.G., McIntyre, R.H., Morgan, A.K. y Davie, P.S. 1986. Physiological stress responses in big gamefish after capture: Observation on plasma chemistry and blood factors. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 84:565-571.
- Whitehead, P.J.P. 1985. FAO species catalogue. Vol. 7. Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 1 - Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. *FAO Fish. Synop.* 125(7/1):1-303.
- Wilson, S.M. y Nagler, J.J. 2006. Age, but not salinity, affects the upper lethal temperature limits for juvenile walleye (*Sander vitreus*). *Aquaculture*. 257:187-193.
- Wittenberg, B.A. y Wittenberg, J.B. 1989. Transport of oxygen in muscle. *Annual Reviews of Physiology*. 51:857-878.

Ziegeweid, J.R., Jennings, C.A. y Peterson, D.L. 2008. Thermal maxima for juvenile shortnose sturgeon acclimated to different temperatures. *Environmental Biology of Fishes*. 82:299-307.