

**Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada**



**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  
MAESTRIA EN CIENCIAS**

**JUANA RAQUEL HERNANDEZ LOPEZ**

**ENSENADA BAJA CFA, MEXICO AGOSTO DE 2006**

TESIS DEFENDIDA POR  
**Juana Raquel Hernández López**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



---

Dra. Mónica Hernández Rodríguez  
*Director del Comité*



---

Dr. Benjamin Baron Sevilla  
*Miembro del Comité*



---

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera  
*Miembro del Comité*



---

Dr. Luis Alberto Delgado Argote  
*Miembro del Comité*



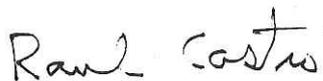
---

M. en C. Magali del Rosario  
Zacarias Soto  
*Miembro del Comité*



---

Dr. Alexei Federovish Licea Navarro  
*Coordinador del programa de  
posgrado en Ciencias con  
orientación en Acuicultura.*



---

Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla  
*Director de Estudios de Posgrado*

01 de Agosto de 2006

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



**CICESE**

---

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

---

**EFFECTO 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

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

Presenta:

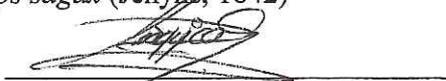
**JUANA RAQUEL HERNÁNDEZ LÓPEZ**

Ensenada, Baja California, México, Agosto de 2006.

**RESUMEN** de la tesis de **Juana Raquel Hernández López** presentado como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California, México. Agosto de 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)

Resumen aprobado por:

  
Dra. Mónica Hernández Rodríguez

El efecto del estrés térmico agudo y crónico sobre el tejido hepático y renal de *Sardinops sagax*, se evaluó mediante la temperatura crítica máxima (TCMax) y la temperatura letal incipiente superior (TLIS). Los peces se aclimataron durante 20 días a 19, 21, 23 y 25 °C.

Durante la exposición al estrés térmico agudo, en donde el incremento de la temperatura fue de 1 °C por minuto, se observaron las respuestas de aumento de actividad (AA), espasmos musculares (EM) y pérdida del equilibrio (PE). Los valores de TCMax fueron de 30.7, 31.5, 32.0 y 32.2 en 19, 21, 23 y 25 °C, respectivamente. Los valores de la TLIS observada de los organismos aclimatados a 19 °C fue de 23.3 °C, y para los aclimatados a 21, 23 y 25 °C fue de 25.3, 26.2 y 27.1 °C respectivamente.

Las modificaciones encontradas en el tejido hepático de los organismos expuestos al estrés térmico agudo fueron en el tamaño de los hepatocitos, los más pequeños se observaron en la TA de 19 °C (diámetro de 11.5 µ), así como hepatocitos vacíos y presencia de células sanguíneas. Se observaron infiltraciones de células sanguíneas, sin delimitación celular y necrosis en los cortes de hígado de la sardina aclimatada a 25 °C, Se encontraron nucleolos grandes (3.5 µ) que no se observaron en las otras temperaturas de aclimatación.

En el tejido renal de los organismos expuestos al estrés térmico agudo se observaron centros melanomacrófagos, el espacio de la cápsula de Bowman y el glomérulo eran más grandes comparado con el de los organismos del grupo control (19°C), también se identificaron glomérulos retraídos (21 °C), glomérulos con restos celulares y cápsulas de Bowman vacíos (23 y 25 °C).

Las modificaciones encontradas en el tejido hepático de los organismos expuestos a estrés térmico crónico fueron vacuolización, cambios en el tamaño del hepatocito, picnosis, apoptosis, necrosis y focos de infección bacteriana. En el riñón se observó degeneración tubular y glomerular, centros melanomacrófagos, apoptosis, glomérulos retraídos y vacíos y focos de infección bacteriana. En general las alteraciones se acentúan conforme aumenta la temperatura experimental y el tiempo de exposición.

Con los resultados de este trabajo, la conclusión es que *Sardinops sagax* es poco tolerante a los cambios de temperatura y debido a las alteraciones en los tejidos hepático y renal ocasionadas por este factor, se propone el uso de la histopatología como un indicador del efecto del estrés térmico agudo y crónico.

*Palabras clave: Sardinops sagax, estrés térmico, histopatología*

**ABSTRACT** of the Thesis of **Juana Raquel Hernández López**, presented as partial requirement to obtain the **MASTER IN SCIENCES** degree with orientation in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, Mexico, August 2006.

Effect of the critical thermal maximum and upper lethal on the liver and renal tissue of sardine of the Pacific, *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842)

The effect of the acute and chronic thermal stress on the hepatic and renal tissue of *Sardinops sagax*, was evaluated by means of the critical thermal maximum (CTMax) and the upper incipient lethal temperature (UILT). The fish were acclimated during 20 days at 19, 21, 23 and 25 °C.

During the exposure to the acute thermal stress, where the increment of temperature was 1 °C per minute, the responses of increase activity (IA), muscular spasms (MS) and loss of balance (LB) were observed. CTMax values were 30.7, 31.5, 32.0 and 32.2 at 19, 21, 23 and 25 °C, respectively. The UILT value of the organisms acclimated at 19 °C was 23.3 °C, and for those acclimated at 21, 23 and 25 °C, were 25.3, 26.2 and 27.1 °C, respectively.

The modifications found in the liver tissue of the organisms exposed to the acute thermal stress were in the size of the hepatocytes, the smallest observed at 19 °C acclimation temperature (diameter of 11.5  $\mu$ ), as well as empty hepatocytes and presence of sanguine cells. Infiltrations of sanguine cells, without cellular delimitation and necrosis were observed in the liver histological sections cuts of the sardine acclimated at 25 °C. Big nucleolus (3.5  $\mu$ ) was found that were not observed in the other acclimation temperatures.

Melanomacrophage aggregates were observed in the renal tissue in organisms exposed to the acute thermal stress, the space of the Bowman capsule and the glomerulus were bigger compared with that of control group (19°C), retracted glomerulus (21 °C), glomerulus with cellular remains and empty Bowman capsules (23 and 25 °C) were identified.

The modifications found in the hepatic tissue of the organisms exposed to chronic thermal stress were vacuolization, changes in the size of the hepatocyte, piknosis, apoptosis, necrosis and focus of bacterial infection. Tubular and glomerular degeneration, melanomacrophage aggregates, apoptosis, retracted and empty glomerulus and focus of bacterial infection were observed in the kidney. In general the alterations are accentuated while the experimental temperature and the exposure time increases.

With the results of this work, the conclusion is, that *Sardinops sagax* does not tolerate ample temperature changes due to the alterations in the hepatic and renal tissue caused by this factor. The use of the histopathology as an indicator of the effect of the acute and chronic thermal stress is proposed.

Key words: *Sardinops sagax*, thermal stress, histopathology.

## DEDICATORIAS

A mis Padres: Guillermo Hernández Pérez y Juana López Hernández por su amor y comprensión.

A mis Hermanos: Carlos y David por el apoyo que siempre me dan.

A mis sobrinos: Lili, Ferceci, Almu y Juan Carlos por todo su cariño y por la alegría que dan a mi vida.

A todos ustedes muchas gracias por apoyarme una vez más en la realización de una meta y por entender mi ausencia en muchos momentos, pero esa ausencia solo es física porque siempre los llevo en mi pensamiento y en mi corazón.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por la beca otorgada para continuar con mi preparación académica.

A CICESE, por la oportunidad de realizar la maestría y por la beca otorgada para la conclusión de la misma.

Al proyecto: El comportamiento termorregulador de los organismos acuáticos: una herramienta para predecir el efecto del cambio climático. PROYECTO CONACYT-46060

A mi directora de tesis, Dra. Mónica Hernández Ramírez por proporcionarme todo lo necesario para la elaboración de la tesis, por exigirme cada día lo mejor en mi trabajo, y por sus consejos no solo como directora sino como persona.

A todo el comité de tesis por el apoyo y sugerencias en la realización de la tesis.

Dr. Benjamín Baron Sevilla

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Dr. Luis Alberto Delgado Argote

M. en C. Magali del Rosario Zacarias Soto

A Michael Richardson Bayne por la donación de los organismos para la realización de la tesis.

Al Dr. Jorge A. Cáceres Martínez, por facilitarme las instalaciones del laboratorio de patología durante el procesamiento histológico.

A la Dra. Patricia Rivas del Laboratorio de Reproducción, por su asesoría en la parte histológica de mi trabajo y por todas sus atenciones durante mis estancias en la Facultad de Ciencias de la UNAM, México.

Al Dr. Luis Fernando Bucle Ramírez, por su apoyo durante la realización de la tesis.

Al técnico Francisco Valenzuela Buriel por su ayuda en las instalaciones durante la fase experimental.

Al técnico Luis Alberto Murillo Valenzuela, por su asistencia en los momentos requeridos.

A todo el grupo de técnicos en general: Guillermo, Adrián, Janet, por su amistad y por hacer más amena mi estancia.

A Instituto de Sanidad Acuícola AC. por facilitarme el equipo para la digitalización de imágenes.

A todos mis compañeros de generación: Pablo, Ruth, Jaime, por todos los buenos y malos momentos compartidos. En especial a: Ricardo por apoyarme y alentarme a seguir adelante, a Samuel por compartir sus conocimientos de histología con migo, pero sobre todo por sus bromas con las que recordaba a mis hermanos y alegraba los días de trabajo en el laboratorio, a Marcela por apoyarme en momentos difíciles tanto personales como académicos y tolerar mis frustraciones y mal humor en la etapa final de la tesis, y a Lety no solo por el apoyo y consejos cuando los necesite sino también por compartir a su hermosa familia que me a ayudado a no estar sola y sentirme parte de ella.

A las personas de administración, biblioteca y secretarias, por su amabilidad en los trámites que en su momento solicite.

## CONTENIDO

### Página

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<i>III.1. Objetivo general.....</i>	17
<i>III.2. Objetivos específicos.....</i>	17
<b>IV. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>18</b>
<i>IV.1 Obtención de la muestra.....</i>	18
<i>IV.2 Mantenimiento y Aclimatación.....</i>	18
<i>IV.3 Temperatura Crítica Máxima (TCMax).....</i>	19
<i>IV.4 Temperatura Letal Incipiente Superior (TLIS).....</i>	20
<i>IV.5 Histología.....</i>	22
<i>IV.6 Procesamiento de datos.....</i>	23

## CONTENIDO (Continuación)

	<b>Página</b>
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<i>V.1 Supervivencia .....</i>	<i>24</i>
<i>V.2 Temperatura Crítica Máxima (TCMax).....</i>	<i>24</i>
<i>V.3 Temperatura Letal Incipiente Superior (TLIS).....</i>	<i>25</i>
<i>V.4 Histología de Hígado y Riñón.....</i>	<i>30</i>
V.4.1 Estrés Térmico Agudo.....	31
V.4.2 Estrés Térmico Crónico.....	32
<b>VI. DISCUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
1	Sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax</i> , Hart (1973).....	2
2	Distribución de la sardina del Pacífico, sus principales áreas de desove, de crianza y de pesca (Tomado de Culley, 1971). .....	4
3	Respuestas de estrés térmico en las sardinas aclimatadas a diferentes temperaturas. (◇, EM) espasmos musculares y (□, PE) pérdida del equilibrio. Media ± desviación estándar.....	25
4	Temperatura letal incipiente superior de <i>S. sagax</i> aclimatado a 19 °C y determinada con el modelo de Kilgour <i>et al.</i> (1985), con el valor de linealización de 1.8.....	27
5	Temperatura letal incipiente superior de <i>S. sagax</i> aclimatado a 21 °C y determinada con el modelo de Kilgour <i>et al.</i> (1985), con el valor de linealización de 1.8. ....	28
6	Temperatura letal incipiente superior de <i>S. sagax</i> aclimatado a 23 °C y determinada con el modelo de Kilgour <i>et al.</i> (1985), con el valor de linealización de 2.7. ....	28
7	Temperatura letal incipiente superior de <i>S. sagax</i> aclimatado a 25 °C y determinada con el modelo de Kilgour <i>et al.</i> (1985), con el valor de linealización de 1.8.....	29
8	Corte transversal de hígado de <i>S. sagax</i> aclimatada a diferentes temperaturas. A) se observa la formación de cordones hepaticos (H), sinusoides (S), 500X; B) se observan hepatocitos (H) y células sanguíneas (CS), 500X y C) se observan hepatocitos vacíos (HV), 1250X H-E. ....	36
9	Corte longitudinal de riñón de <i>S. sagax</i> aclimatada a diferentes temperaturas. A) se observa el tejido hematopoyético (TH), túmulos renales (T) y centros melanomacrófagos (CM), B) se observan vacuolas en túmulos renales (VT), centros melanomacrófagos (CM) y C) se observan túmulos renales (T), glomérulos (G) y tejido hematopoyético (TH), 500X H-E.....	37

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Corte transversal de hígado de <i>S. sagax</i> expuesta a estrés térmico agudo. A) se observan hepatocitos vacíos (HV), células sanguíneas (CS); B) desarreglo de hepatocitos (DH); C), hepatocitos vacíos (HV), células sanguíneas (CS), 500X y D) zonas de necrosis (NT), infiltración de células sanguíneas (IC), así como pérdida de delimitación celular (PDC), 1250X H-E.....	38
11	Corte longitudinal de riñón de <i>S. sagax</i> expuesta a estrés térmico agudo. A) se observan centros melanomacrófagos (CM), la luz de túmulos renales (LT) y el espacio intercapsular (EB) en el glomérulo aumenta; B) glomérulo retraído (GR), núcleos picnoticos (NP) y restos celulares; C) glomérulo retraído, con restos celulares (RC) y Capsula de Bowman vacía (GV) y D) núcleos picnoticos, glomérulo retraído y centro melanomacrófono, 500X H-E.....	39
12	Corte transversal de hígado de <i>S. sagax</i> aclimatada a 19 °C y expuestas 23.3 °C. A) se observa hepatocito con núcleos apoptoticos (A), vacuolas (V); B) foco de infección bacteriana (FIB) y C) hepatocito con núcleo picnotico (NP), 1250X H-E.	40
13	Corte transversal de riñón de <i>S. sagax</i> aclimatada a 21 °C y expuesta 25.3 °C. A) se observan foco de infección bacteriana (FIB), desorganización celular (DC); B) núcleos apoptoticos (A) y núcleos picnoticos (P) y C) necrosis (N) y núcleos apoptoticos, 1250X H-E.....	41
14	Corte transversal de hígado de <i>S. sagax</i> aclimatada a 23 y 25 °C y expuesta a 26.2 y 27.1 °C. A) se observa desorganización celular (DC), núcleos grandes (NG); B) foco de infección bacteriana (FIB); C) apoptosis (A) y D) apoptosis, área de tejido necrótico (N) y vacuolas (V), 1250X H-E.....	42
15	Corte longitudinal de riñón de <i>S. sagax</i> aclimatada 19 y 21 °C expuesta a 23.3 y 25.3 °C, respectivamente. A) se observa centro melanomacrófono (CM), restos celulares (RC) y foco de infección bacteriana (FIB); B) centros melanomacrófonos y restos celulares, C) glomérulos retraídos (GR), núcleos picnoticos (NP) y D), áreas necróticas de todo el tejido (NT), 1250X H-E.....	43

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

*Figura*

**Página**

- 16 Corte longitudinal de riñón de *S. sagax* aclimatada 23 y 25 °C y expuesta a 26.2 y 27.1 °C, respectivamente A) núcleos apoptóticos (A), restos celulares (RC); B) pérdida del tejido hematopoyético (PTH), glomerulo vacío (GV) y centros melanomacrofagos (CM), C) núcleos picnóticos, centros melanomacrofagos y D) áreas necróticas (NT), 1250X H-E.....

44

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Valores de la temperatura y concentración de oxígeno registrados durante el período de aclimatación de <i>Sardinops sagax</i> . Media $\pm$ desviación estándar.	19
II	Temperaturas experimentales a las cuales se expuso abruptamente <i>S. sagax</i> , para conocer el valor de la TLIS. (TA, temperatura de aclimatación).	20
III	Serie de alcoholes utilizados en el proceso de deshidratación de los tejidos hepático y renal de <i>S. sagax</i> .	23
IV	Tiempo (min) donde el 50% de la muestra experimental de <i>S. sagax</i> murió después de ser expuesta a diferentes temperaturas.	26
V	Valores de temperatura letal obtenidos por el método SPEARMAN-KARBER para <i>Sardinops sagax</i> aclimatada y expuesta a diferentes temperaturas.	30
VI	Alteraciones en el tejido hepático de <i>S. sagax</i> aclimatada a cuatro temperaturas y expuesta a estrés térmico crónico. TA, temperatura de aclimatación; TE, temperatura experimental.	35
VII	Alteraciones en tejido renal de <i>S. sagax</i> aclimatada a cuatro temperaturas y expuesta a estrés térmico crónico. TA, temperatura de aclimatación; TE, temperatura experimental.	36

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA CRÍTICA MÁXIMA Y LA LETAL SUPERIOR  
SOBRE EL TEJIDO HEPÁTICO Y RENAL DE LA SARDINA DEL PACÍFICO,  
*Sardinops sagax* (Jenyns, 1842)**

**I. INTRODUCCIÓN**

Las sardinas pertenecen a la familia Clupeidae y como grupo, se clasifica dentro de tres géneros y alrededor de 18 especies en el mundo. Históricamente su nombre común fue pilchard, pero el término sardina es el que prevalece actualmente. La Sardina del Pacífico fue registrada por Clemens y Wilby (1946) como *Sardinops caerulea* (Girard) y por muchos otros autores como *Sardina caerulea* o *Sardinops sagax* (Hart, 1973, Schweigert, 2002).

La sardina en edad adulta tiene una longitud total de 394 mm, es de color azul metálico oscuro o verde en la superficie dorsal, con pigmentación negra en el dorso y motas negras de distintos tamaños en los costados. Se caracteriza por tener un cuerpo alargado, delgado y moderadamente comprimido, la cabeza comprende la cuarta parte de la longitud estándar, la boca es de talla moderada, sin dientes y está dirigida hacia arriba. Tiene una sola aleta dorsal que es corta y se localiza sobre el centro del cuerpo (Hart, 1973). Las aletas pélvicas se encuentran en posición abdominal, no tiene línea lateral, ni escamas en la cabeza. En la parte ventral tienen una serie de quillas que le dan una apariencia de vientre aserrado (Fig. 1) (Torres *et al.*, 1986).

La estructura de su boca es flexible, con numerosas y finas branquiespinas que le permiten abrirla ampliamente, por lo que es un filtroalimentador muy eficiente de fito y zooplancton, principalmente de nauplios de copépodos (Artur, 1976). Además, es capaz de capturar partículas de tamaño menor a 17  $\mu\text{m}$  y maximiza su energía a través de

tiempos de filtración mayores (Van der Lingen, 1994, 1995). Por ser organismos fitoalimentadores son más abundantes en aquellos lugares donde las condiciones naturales influyen positivamente en la disponibilidad de alimento, el cual está en forma permanente o esporádica debido a las afloraciones fitoplanctónicas (Hand y Berner, 1959; Alhstrom, 1960; Grahame, 1987). Van Der Lingen (1998), menciona que *Sardinops sagax* es capaz de utilizar mejor el zooplancton que el fitoplancton, lo que sugiere que los requerimientos nutricionales de esta especie de hábitos omnívoros son más de carnívoro que de herbívoro (López-Martínez, 1991).

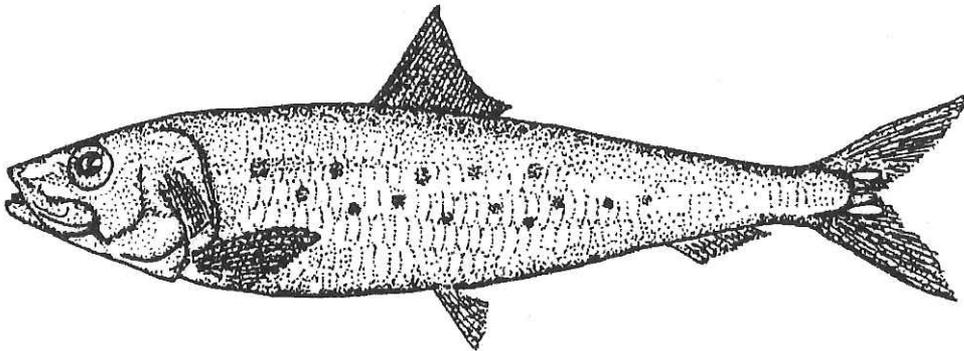


Figura 1. Sardina del Pacífico, *Sardinops sagax*. Tomado de Schweigert (2002).

La sardina del Pacífico es una especie con hábitos migratorios, se agrupa en grandes cardúmenes y habita en aguas de la costa del Pacífico de Norteamérica desde el sur de Alaska hasta Cabo San Lucas y en el Golfo de California (Fig. 2). Las principales áreas de concentración están en el sur y norte de California, Estados Unidos y al sur de Columbia Británica, Canadá (Hand y Berner, 1959; Schweigert, 2002).

La sardina tiene maduración sexual asincrónica por lo que es un desovador parcial con fertilización externa (Torres *et al.*, 1986). Las hembras maduran por primera vez cuando tienen una longitud aproximada de 240 mm, desovan a temperaturas entre 15 y 18 °C y se inhibe cuando la temperatura es menor a 13 °C. Cada hembra produce de 30 000 hasta 65 000 huevos

por desove y alrededor de 200 000 por estación (Hart, 1973). El período de reproducción está asociado con los eventos de surgencias, tanto para proveer de alimento a los adultos desovantes, como a las larvas (Lasker, 1985; Grahame, 1987).

Sokolov y Wong (1973) estudiaron la migración de la sardina en el Golfo de California con base en los procesos físicos que predominan en esta región y que influyen en la distribución de los juveniles y los adultos de esta especie. En invierno y principios de la primavera la sardina adulta migra del Alto Golfo hacia la cuenca de Guaymas para desovar cuando predominan los vientos del noroeste y se registran surgencias a lo largo de la margen oriental. Las corrientes de agua fría que se forman en la extensión de los cabos proporcionan el medio de transporte para huevos y larvas hacia las costas de Baja California donde se concentran los juveniles. Las condiciones de verano con vientos del sureste coinciden con la migración de los juveniles hacia las regiones donde se alimentan en su etapa adulta, cerrando así el ciclo migratorio (Hammann *et al.*, 1988).

La sardina es una de las especies más importantes de las capturas mundiales de peces pelágicos menores; a inicio de la década de los años 90 dominó las pesquerías a lo largo del oriente de la costa de Norteamérica (Schweigert, 2002). Esta especie fue explotada comercialmente en las costas de California, EUA, con una captura máxima de 800 mil toneladas en 1936 y a partir de ese año se observó una rápida disminución de los rendimientos, hasta que en 1967 se prohibió su pesquería (Randovich, 1982).

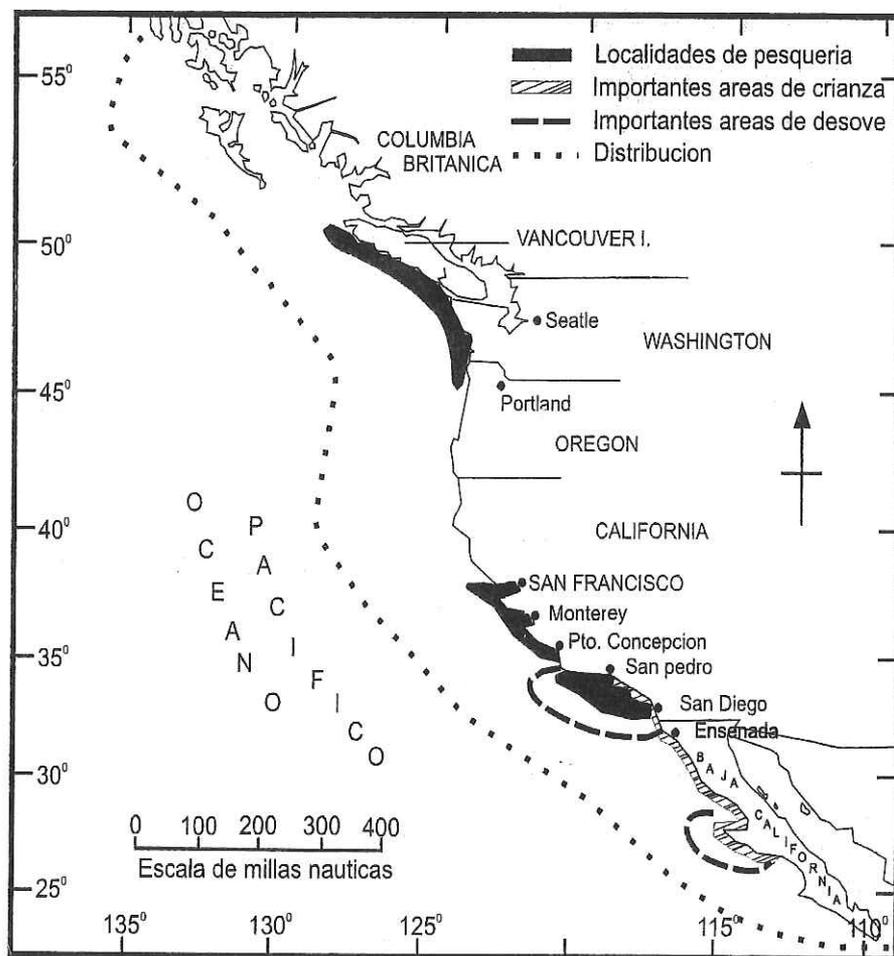


Figura 2. Distribución de la sardina del Pacífico, donde se indican sus principales áreas de desove, de crianza y de pesca (Tomado de Culley, 1971).

La pesquería a nivel comercial se inició a partir de 1919; las zonas de captura estuvieron entre el sur de Canadá en la Columbia Británica y Washington, Oregon, San Francisco, San Pedro y San Diego en Estados Unidos (Lyle-Fritch, 1995). La intensa explotación de este recurso está fundamentada en la obtención de proteína de bajo costo, tanto para el consumo humano en forma de producto fresco, seco, salado, ahumado, enlatado, como materia prima para la elaboración de alimentos balanceados para animales (Cisneros *et al.*, 1995). Recientemente la producción pesquera de sardina desde la costa del Pacífico, Golfo y Mar Caribe es de 147391

ton, de las cuales a Baja California le corresponde el 70% y es la especie más importante por el volumen capturado en el estado, seguido por el sargazo, los túnidos y, con volumen menor, las algas (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2003).

El tamaño de las poblaciones de sardina del norte de Baja California y California ha fluctuado ampliamente. La pesquería en Norteamérica fue de aproximadamente 800,000 TM durante el mayor pico de producción, pero con los cambios en la abundancia de la población se llegó a estimar una biomasa menor a 5000 TM (Wolf, 1992). A mediados de 1970 la población de sardina se incrementó y durante 1990 la biomasa se estimó entre 2000 a 214000 TM (Barnes *et al.*, 1992). A partir de estas fluctuaciones se plantearon dos hipótesis: la primera supone que el mecanismo que afectó la abundancia de la población de sardina fue la sobreexplotación; la segunda sugiere un problema de reclutamiento, al atribuir que la diferencia en la sobrevivencia de la etapa de huevo a larva determina la medida del reclutamiento y, por consiguiente, la abundancia de la sardina en los siguientes años. Las fluctuaciones en la abundancia de la sardina se han relacionado con variaciones ambientales como el fenómeno de El Niño; este planteamiento ha sido llamado “problema régimen”, y hace referencia a una sincronía entre la variabilidad climática y las variaciones de la abundancia de la especie (Lluch-Belda *et al.*, 1992).

Debido a la importancia que representa la sardina en las capturas a nivel mundial, en las últimas décadas se han intensificado los estudios sobre los peces pelágicos menores. El reclutamiento de estos organismos está asociado fuertemente a las condiciones ambientales, principalmente al alimento, la depredación y la temperatura superficial del mar (De Anda *et al.*, 1994).

Las especies como la sardina y la anchoveta se ven afectadas cuando disminuye la biomasa del plancton, su principal fuente de alimento, debido a la interrupción de las corrientes de surgencia que impulsan la producción frente a las costas de Perú y de Baja California. La falta de

alimento aunado a las variaciones drásticas en los cambios de temperatura y la circulación del océano, resulta ser catastrófico para estas especies (Lizárraga, 2002).

Las variaciones en las condiciones ambientales provocan cambios en el estado estable de los organismos y, en algunas ocasiones, un estado de estrés que se define como la suma de todas las respuestas fisiológicas que presentan los animales por el efecto ambiental que prolonga el proceso de estabilización homeostático fuera de sus límites normales (Adams, 1990).

Los factores ambientales se han clasificado de acuerdo al efecto sobre los organismos como a) letal, al delimitar el medio ambiente en donde el organismo puede existir, fuera de este límite el metabolismo falla; los factores: b) controlador y c) limitante, influyen las reacciones químicas, es decir, controlan la tasa metabólica; d) el enmascarador, modifica a un segundo factor y e) el directriz hace referencia a la respuesta de un organismo relacionada a un gradiente de cualquier factor en espacio y tiempo. Por ejemplo la temperatura se considera un factor enmascarador, controlador, limitante y/o letal, porque puede influir en la migración, en la maduración sexual, en el desove, en el proceso de incubación, en el crecimiento, en la capacidad competitiva inter e intraespecífica, así como en la resistencia a parásitos, a enfermedades y contaminantes (Hoar y Randall, 1971).

En el medio natural, los organismos acuáticos reaccionan a las variaciones térmicas para evitar las temperaturas que puedan influir en su sobrevivencia y reproducción. Mediante un modelo gráfico que representa las respuestas de los organismos a la temperatura, se han caracterizado las zonas de preferencia, de tolerancia y de resistencia térmica de muchas especies acuáticas (Brett, 1956; Fry, 1964). La resistencia térmica de un organismo se puede conocer al exponerlo a incrementos de temperatura y observar una secuencia de respuestas de comportamiento, hasta identificar el valor térmico del comportamiento que caracteriza a la temperatura crítica máxima (TCMax), que se define como la media aritmética de los puntos térmicos en los que la actividad

locomotora se desorganiza y el organismo pierde la capacidad de escapar de la condición que lo llevará rápidamente a la muerte, al incrementar la temperatura del agua 1 °C/min (Cox, 1974).

En los estudios del comportamiento termorregulador, la temperatura es un factor letal y se conoce como la temperatura letal incipiente superior (TLIS), la cual limita la zona de tolerancia donde el 50% de los organismos de una población o de la muestra mueren cuando son expuestos de 48 a 96 h a temperaturas letales (Brett, 1956; Fry, 1964).

Las respuestas de comportamiento termorregulador se utilizan como herramientas para conocer las condiciones ambientales en las que un organismo puede llevar a cabo sus funciones fisiológicas óptimamente, para establecer sus límites térmicos y como indicador de estrés y adaptación.

## II. ANTECEDENTES

La temperatura es uno de los factores ambientales importantes que regula la distribución de los organismos acuáticos. En la naturaleza constituida por ambientes heterogéneos en espacio y tiempo, los animales están expuestos a cambios térmicos frecuentes que compensan a través de ajustes bioquímicos, neuroendocrinos y de comportamiento (Huey y Bennett, 1990).

Los organismos poiquiloterms como los peces, son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura y pueden elegir o seleccionar la temperatura donde sus funciones fisiológicas operen con la eficiencia óptima (Crawshaw, 1977). Cuando los cambios de temperatura son del orden de 1°C, los procesos biológicos se modifican hasta en un 10 %, mientras que grandes fluctuaciones pueden alterar las rutas metabólicas ocasionando la muerte rápida de los organismos (Hochachka y Somero, 1984; Prosser, 1986; Cousin y Baudin, 1987).

Los organismos acuáticos compensan los efectos de la temperatura principalmente en dos etapas: la primera involucra la regulación de la temperatura corporal (termorregulación) para mantener el control de sus procesos fisiológicos, evitando temperaturas extremas; la segunda,

son las respuestas complementarias de este proceso, que involucra la reorganización de la capacidad fisiológica de un organismo a través de procesos a corto plazo por aclimatación o aclimatización, y a largo plazo a través de la adaptación evolutiva (Huey y Bennett, 1990).

La capacidad termorreguladora de un organismo puede fallar bajo ciertas circunstancias, sin embargo, los organismos pueden amortiguar los efectos de las fluctuaciones ambientales por ajuste de su sensibilidad térmica o de su capacidad fisiológica. Durante el proceso de la aclimatización, el ajuste fisiológico puede ser metabólicamente costoso y es activado sólo por fluctuaciones ambientales, como son las asociadas con los frentes climáticos o especialmente con cambios estacionales (Huey y Bennett, 1990).

En los animales mantenidos bajo ciertas condiciones de laboratorio, el proceso de aclimatación es normalmente reversible si el organismo es regresado a su temperatura original y sólo después de un periodo de reaclimatación. Los mecanismos que hacen posible la aclimatación incluyen la síntesis de diferentes isoenzimas, la utilización de diferentes rutas metabólicas, la alteración de la tasa de síntesis y degradación de proteínas, así como los cambios en la composición de la membrana celular (Huey y Bennett, 1990).

En los peces, muchos de los procesos de aclimatación ocurren en un lapso de horas hasta días e involucran una reestructuración biofísica y bioquímica de las células y de los componentes de los tejidos para operar bajo el nuevo régimen térmico (Crawshaw, 1977).

Los factores ambientales como la temperatura puede limitar la presencia de una especie, por lo que existen diferentes estudios enfocados a evaluar el efecto de las variaciones térmicas sobre aspectos biológicos, ecológicos, entre otros. Por ejemplo, Morales-Bojórquez *et al.* (2003), investigaron la relación entre el reclutamiento de la sardina en la península de Baja California y la variabilidad interanual de la temperatura superficial del mar. Los cambios temporales en la temperatura superficial del mar estuvieron asociados con los periodos de desove, así como en la sobrevivencia de los estadios tempranos afectando el tamaño de la clase anual de la especie.

Anthony y Fogarty (1985) estudiaron también el efecto del ambiente sobre el reclutamiento, crecimiento y vulnerabilidad en el arenque del Atlántico (*Clupea harengus*) en la región del Golfo de Maine; sus resultados sugieren que los efectos ocasionados por la temperatura son más importantes en el estadio larval tardío y juvenil temprano, debido a que puede afectar la distribución o abundancia por predadores, así como el tamaño de la clase anual. En este mismo sentido Alcocer y Kelly (1987), estudiaron el efecto de El Niño sobre la reproducción de la sardina *Sardinops sagax* en el norte de Chile. El análisis indicó que El Niño afectó principalmente la zona norte, durante los años 1965, 1969, 1972-73 y 1982-1983. La fluctuación de la temperatura superficial del mar afectaron negativamente el índice gonadosomático y el factor de condición causando un detrimento en las funciones reproductivas y fisiológicas del pez.

En la sardina del Atlántico de la región de Vigo, España, Álvarez y Butler (1992) determinaron el día de eclosión y su posible relación con el ambiente. En este análisis, los autores mencionan que la eclosión ocurre durante el mes de mayo cuando las variaciones de temperatura fueron de 14.7 a 16.5 °C y las condiciones ambientales fueron las apropiadas para que las larvas tuvieran suficiente alimento para poder crecer y sobrevivir.

El ambiente físico (factores bióticos y abióticos) en el hábitat de los organismos no es constante en el tiempo y ni en el espacio. Por ejemplo, un cambio en la temperatura del agua que exponga a los organismos cerca de su límite de tolerancia puede ocasionar estrés, daño o hasta la muerte, pero aún cuando la variación térmica sea menor puede influir en la capacidad fisiológica, al afectar el crecimiento, la reproducción y las interacciones sociales (Huey y Bennett, 1990).

Diferentes especies de peces prefieren temperaturas específicas donde probablemente las funciones fisiológicas se efectúan óptimamente (Fry, 1947; Brett, 1956; Crawshaw, 1977; Tsuchida, 1995). Esta temperatura preferida (preferendum final) depende del estadio del ciclo de vida y del hábitat de los organismos (Crawshaw, 1977). En este sentido Richardson *et al.*

(1994), determinaron las temperaturas preferidas y letales para ocho especies de peces de Nueva Zelanda y caracterizaron las temperaturas letales superiores en el intervalo de 28.3 y 39.9 °C, las cuales delimitan su zona de tolerancia. Tsuchida (1995), estudió la tolerancia de 14 especies de peces marinos a temperaturas altas y el preferendum final para evaluar la influencia de los efluentes térmicos en su hábitat.

Los estudios sobre la determinación de la temperatura óptima, la temperatura crítica máxima y la letal, no sólo tienen importancia a nivel biológico, sino también ecológico, debido a que un organismo vive en un hábitat que le proporciona una temperatura apropiada para desarrollarse, crecer y reproducirse. Cuando la muerte del organismo es la consecuencia de la interacción de factores limitantes, como la temperatura y otro factor que altere la tasa metabólica, las relaciones intensidad-tiempo adquieren gran importancia. En esta relación, la intensidad de los factores se puede expresar como letal o subletal y en cuanto al tiempo de exposición, puede ser aguda o crónica, es decir, de lapsos cortos o a mediano o largo plazo (Hernández, 1998).

La temperatura como estresor agudo o crónico puede ocasionar daño a diferentes niveles desde el comportamiento hasta la función de un órgano. En este sentido, Hunt y Keating (2003) observaron el efecto de la temperatura y la viscosidad del agua en la velocidad de nado de las larvas de *Melanogrammus aeglefinus*. También en *Morone saxatilis* se ha estudiado el efecto de la temperatura y el estrés por confinamiento sobre los parámetros sanguíneos tales como la presión osmótica, la concentración de cortisol y de glucosa para establecer la temperatura a la cual puede transportarse la especie (Kenneth y Parker, 1990).

Otros trabajos han destacado la capacidad de los organismos para mantener el equilibrio interno después de un cambio en la temperatura ambiental. La respuesta depende de la tasa de ventilación branquial y del flujo sanguíneo, la anatomía del sistema circulatorio, la actividad, el movimiento del agua, así como la forma y talla de los peces, entre otros (Crawshaw, 1977;

Hammann *et al.*, 1988; Huey y Bennett, 1990; Lurch-Belda *et al.*, 1992; De Anda *et al.*, 1994; Tsuchida, 1995; Lizárraga, 2002).

En otras especies se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la función cardíaca, por ejemplo, en *Lota lota* (lota), *Carassius carassius* (carpa) y *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoiris) se evaluó el efecto de los cambios agudos y crónicos de temperatura, la cual modificó la contracción cardíaca de estas especies (Titu, 2002). En *Oncorhynchus mykiss* también se estudio el desempeño cardíaco en temperaturas cercanas a su límite letal superior (Farrel *et al.*, 1996).

El estudio de los efectos de la temperatura sobre diferentes procesos bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento ha sido ampliamente documentado en diferentes especies. Aunado a lo anterior, también se ha evaluado el efecto de la temperatura a nivel celular y se ha utilizado a la histopatología como una herramienta para entender como diversos factores afectan los procesos bioquímicos, fisiológicos y cronológicos de la morfología del tejido (Hinton y Laurén, 1990). En este sentido, Ream *et al.* (2003) analizaron la influencia de la aclimatación térmica y los cambios de temperatura sobre la motilidad de las células epiteliales de *Gillichthys mirabilis*, *Cyprinodon salinus*, *Trematomus bernacchii* y *Amphiprion percula*; en estas especies el movimiento de los queratocitos incrementó a medida que aumentaba la temperatura.

Los cambios observados en los organismos que experimentan exposiciones crónicas a un estresor pueden ser en un órgano en particular o en una región específica de éste, llegando a producir necrosis evidenciada por la morfología del núcleo, así como por manchas características en el citoplasma (Hinton y Laurén, 1990). Algunos autores han podido observar alteraciones ocasionadas por diversas condiciones ambientales adversas, como la contaminación, la presencia de parásitos así como los cambios morfológicos que se llegan a producir durante las etapas de desove y posteriores a la siembra (Snieszko, 1974; Bucher y Hofer, 1993; Marty *et al.*, 1998; Domitrovic, 2000).

En los tejidos como la piel, el hígado, la branquia, el riñón y el esqueleto de los peces, se han podido caracterizar las respuestas histopatológicas ocasionadas por los agentes estresores. La piel es un órgano que forma una importante interfase entre el tejido interno y el ambiente externo, pero es muy susceptible a estresores ambientales, quizá la respuesta más característica de este órgano es la producción y secreción de mucus (Hinton y Laurén, 1990).

El hígado en los peces teleósteos tiene más de dos lóbulos hepáticos y dos conductos que comunican con el conducto cístico que a su vez termina en la vesícula biliar (Lagler *et al.*, 1984). Este órgano es alimentado por la vena y la arteria porta. La arteria hepática y la vena porta ingresan al hígado y se ramifican dentro de pequeños vasos. Los sinusoides donde se realiza un intercambio de sustancias entre la sangre y los hepatocitos; células que constituyen el 80 % de las células del hígado y llevan a cabo muchas de las funciones de esta glándula.

Los hepatocitos de los peces a diferencia de los mamíferos, están arreglados como túbulos o cordones, los hepatocitos tienen su base dirigida hacia los sinusoides para el intercambio de sustancias, así mismo contienen un núcleo con cantidades variables de heterocromatina en la periferia o dispersa y un nucleolo prominente (Takashima y Takashi 1995).

El hígado es importante en varios aspectos de la nutrición, incluyendo la síntesis de lípidos y carbohidratos, también está involucrado en las respuestas de defensa contra sustancias tóxicas, debido a que es el sitio donde se realiza el metabolismo de las toxinas que ingresan al cuerpo. Las alteraciones en la estructura del hígado pueden ser usadas como un marcador que indica una exposición a estresores ambientales, específicamente en el núcleo y en el citoplasma de los hepatocitos (Hinton y Laurén, 1990).

Naidu *et al.* (1983), encontraron las concentraciones letales y subletales de  $HgCl_2$  que producen alteraciones en el hígado de *Saroterodon mossambicus* y se caracterizan por la congestión de las células sanguíneas en los sinusoides; por la vacuolización, ruptura y la degeneración granular de hepatocitos; por el desarrollo de edemas, necrosis y por la proliferación de fibroblastos. Los

cambios degenerativos como hipertrofia de los hepatocitos y su núcleo, vacuolización del citoplasma, necrosis y desordenamiento de los cordones del hígado se describieron en *Channa punctatus* por exposición a un insecticida agrícola (Salam *et al.*, 2001). Olojo *et al.* (2005) encontraron daños similares en *Carias gariepinus* aunado a la congestión de los sinusoides y daño en el epitelio columnar biliar. La hipertrofia de los hepatocitos, vacuolización, necrosis, y reducción del diámetro de los hepatocitos y la inflamación de los sinusoides fueron observados en *Mugil sp.*, *Cyprinus carpio* y *Borbus sp.*, y se asociaron a las descargas de lindano, (el cual es un organoclorado liposoluble y se acumula en tejido con grasa como el hígado) (Ortiz *et al.*, 2003). Vaschenko *et al.* (2003), mencionaron que el hígado de *Pleuronectes pinnifasciatus*, presentó vacuolización, necrosis, reacciones inflamatorias y necrosis de los conductos biliares por exposición a distintas concentraciones de metales pesados.

Stehr *et al.* (1998), con un análisis de riesgo confirman que la vacuolización hidrópica en el epitelio biliar e hígado de *Platichthys stellatus*, *Genyonemus lineatus* y *Lepidopsetta bilineata* aumenta con la presencia de hidrocarburos aromáticos y clorinatos en sedimentos. En *Parma microlepis* se evaluó el efecto del pesticida dieldrin y los residuos de DDE sobre el hígado, donde se reporta una relación entre el porcentaje de hepatocitos con el retículo endoplásmico dilatado y con su desorganización (Tricklebank, 2000). En el hígado de *Gambusia affinis* expuesta a THIODAN® se observó degeneración, hipertrofia, ensanchamiento de sinusoides, hemorragia, núcleos picnóticos, vacuolización de células del citoplasma, infiltración de linfocitos mononucleares y congestión, alteraciones fueron dependientes del tiempo y la la concentración del químico (Cengiz *et al.*, 2001).

Las alteraciones en el hígado no sólo pueden ser causadas por contaminantes si no también por la dieta. Por ejemplo Spisni *et al.* (1998) observaron en *Sparus auratus* y *Dicentrarchus labrax* la presencia de una esteatosis extensiva (acumulación anormal de grasa mayoritariamente en

forma de triglicéridos, en el citoplasma de células parenquimatosas) y una alta tasa de mortalidad cuando fueron alimentadas con una dieta formulada. Los peces esteatóticos alimentados posteriormente con dieta natural exhibieron una regeneración del hígado y solo se observaron pocas áreas esteatóticas. Los autores mencionan que los teleósteos marinos al parecer no tienen una respuesta proliferativa de peroxisomas, lo que probablemente contribuye a la acumulación de lípidos en el hígado lo que ocasiona una esteatosis.

Los estudios además de enfocarse a conocer las causas y las histopatologías ocasionadas por alteraciones en el medio natural, también consideran las condiciones de cultivo. López *et al.* (2001), estudiaron la frecuencia y distribución de patologías hepáticas en salmónidos de la región de Chile; las lesiones diagnosticadas más predominantes fueron los trastornos degenerativos como la degeneración grasa y vacuolar, atrofia e hipertrofia de las células de Küpffer.

El riñón es otro de los órganos donde se han reportado alteraciones histopatológicas. Este órgano está compuesto morfológicamente por tres distintos tejidos: endocrino, hematopoyético y excretor. El tejido hematopoyético sirve como el primer órgano formador de sangre en teleósteos, mientras que la porción excretora está compuesta de nefronas que representan la unidad funcional individual de la parte posterior del riñón y que se encarga de la filtración del plasma. Las lesiones desarrolladas en el riñón pueden involucrar uno de los tres sistemas, la destrucción del tejido puede variar de necrosis selectiva del tejido hematopoyético a necrosis o desplazamiento de todo el riñón por proliferación de lesiones como neoplasmas o formación de granulomas (Ribelin y Migaki, 1975). En *Mugil sp.*, *Cyprinus carpio* y *Barbas sp.* se observó necrosis tubular, descamación del epitelio tubular del sistema renal e intensa vacuolización celular ocasionada por descargas de lindano (Ortiz *et al.*, 2003). Salam *et al.* (2001), observaron en *Channa punctatus* vacuolización, ruptura de vasos sanguíneos y células hematopoyéticas y picnosis, como resultado de la exposición a un insecticida agrícola.

En *Oncorhynchus tshawytscha* se observó el efecto tóxico de la eritromicina cuando fue administrada en dosis de 129 mg eritromicina  $\text{kg}^{-1}$  y 3.21 g  $\text{kg}^{-1}$ . En los peces que se inyectó una dosis de 403 y 545 mg eritromicina por  $\text{kg}^{-1}$ , se observaron vacuolas más prominentes en el túbulo distal, así como en el túbulo proximal (Kiryu y Moffitt, 2001).

El efecto de salinidad sobre algunos tejidos también fue descrito por Olivereau y Olivereau (1977), donde observaron los cambios histológicos en el riñón de la anguila. En *Gillichthys mirabilis* expuesta a 5 % de agua de mar, se han caracterizado dos tipos de células principales, las células columnares y las cuboidales localizadas en la vejiga urinaria. Al parecer la diferencia funcional entre los dos tipos de células se debe a que las columnares son responsables de activar el sodio en ambientes hipotónicos (Nagahama *et al.* 1975).

En el riñón al igual que en el hígado, también hay estudios para conocer la distribución de patologías. Wahli *et al.* (2002), realizaron una revisión sobre la distribución de la enfermedad proliferativa del riñón (PKD) en peces silvestres y cultivados en Suiza. Las especies más afectadas fueron la trucha arcoiris, la trucha café y el timalo; en estos organismos, los exámenes histológicos fueron positivos a parásitos y a PKD.

Existe una amplia información sobre los efectos de los cambios de temperatura sobre diferentes procesos biológicos en los organismos acuáticos. Kilarski *et al.* (1996), estudiaron los cambios adaptativos inducidos por aclimatación térmica a corto plazo en la membrana interna de la mitocondria del músculo esquelético de la carpa (*Carassius carassius*). También en la trucha café (*Salmo trutta f. Fario*) se han utilizado a las proteínas de shock térmico, a los cambios en la ultraestructura del hígado y a las alteraciones en el comportamiento de la especie, como biomarcadores de los efectos de la temperatura y la contaminación (Tribskorn *et al.*, 1997).

El efecto de la temperatura como estresor crónico y agudo se ha descrito ampliamente en los estudios de tolerancia y resistencia térmica de los organismos acuáticos. En la sardina muchos estudios mencionan el efecto de El Niño sobre la distribución de la especie, su reproducción y

la abundancia del alimento. Sin embargo, no se conoce cual es su tolerancia y resistencia térmica para explicar los efectos de la temperatura con base en el comportamiento termorregulador de la especie. Por la importancia que tiene conocer las variaciones de temperaturas que experimenta la sardina, es que en el presente trabajo se estudió la temperatura crítica máxima y la letal incipiente superior para caracterizar el límite de tolerancia y resistencia a temperaturas altas, y además de evaluar el efecto del estrés térmico agudo y crónico en el hígado y el riñón de la especie.

### **III OBJETIVOS**

#### **III.1 Objetivo General**

Determinar la temperatura crítica máxima y la letal incipiente superior de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax* y evaluar el efecto del estrés térmico agudo y crónico sobre diferentes tejidos.

#### **III.2 Objetivos Específico**

\* Conocer la temperatura crítica máxima de la sardina del Pacífico aclimatada a diferentes temperaturas.

\* Conocer la temperatura letal incipiente superior de la sardina y delimitar el límite de tolerancia térmica.

\* Describir y comparar la histología del hígado y el riñón de la sardina aclimatada a diferentes temperaturas y expuesta a estrés térmico agudo y crónico.

## **IV. MATERIALES Y METODOS**

### **IV.1 Obtención de la Muestra**

Se obtuvieron dos lotes de sardinas de un año de edad que fueron donadas por los pescadores que venden la carnada viva para la pesca deportiva en el puerto de Ensenada. Los organismos se colocaron en bolsas de polietileno con agua de mar saturada de oxígeno y se transportaron al Laboratorio de Ecofisiología del Departamento de Acuicultura del CICESE. La edad de los organismos se obtuvo con el análisis de los otolitos.

### **IV.2 Mantenimiento y Aclimatación**

Trecientos cincuenta y dos organismos se distribuyeron en cuatro estanques circulares de 500 L a temperatura ambiente. Inmediatamente se expusieron por tres días a un tratamiento profiláctico con oxitetraciclina, que consistió en baños a una concentración de 50 mg/L durante una hora (Noga, 2000). Previo al inicio de la aclimatación se mantuvieron por dos semanas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incrementó la temperatura 1°C por día hasta obtener las temperaturas de aclimatación (TA) de 19, 21, 23 y 25 ± 1°C, en donde permanecieron por un periodo de 20 días.

La limpieza de los estanques se realizó diariamente con la finalidad de eliminar las heces y el alimento remanente, así como los peces muertos o aquellos que presentaron algún síntoma de enfermedad. Diariamente se registró la concentración de oxígeno con un oxímetro YSI modelo 50-B. La temperatura del agua se mantuvo con un calentador de titanio de 1000 W conectado a un regulador electrónico que recibía la señal enviada por un sensor para el encendido y el apagado del calentador (Tabla I). Los organismos se alimentaron con una dieta elaborada para trucha (Purina No.2 y No.4 con 50% de proteína) a una tasa de alimentación del 2.5 % de su peso corporal dividido en dos raciones con excepción de los organismos que fueron aclimatados a 19 °C a los cuales se les suministro únicamente el 1.8 % de su peso.

Una vez concluido el periodo de aclimatación, se realizaron los experimentos de la temperatura crítica máxima (TCMax) y letal incipiente superior (TLIS), así como las disecciones de los órganos para el análisis histológico de los organismos del grupo control (peces que no experimentaron estrés térmico) y los que se expusieron al estrés térmico agudo (TCMax) y crónico (TLIS).

Tabla I. Valores de la temperatura y concentración de oxígeno registrados durante el periodo de aclimatación de *Sardinops sagax*. Media  $\pm$  desviación estándar.

Temperatura de Aclimatación (°C)	Temperatura (°C)	Concentración de Oxígeno (mg O <sub>2</sub> /l)
19	18.97 $\pm$ 0.3513	7.68 $\pm$ 0.8240
21	20.90 $\pm$ 0.4202	6.82 $\pm$ 1.1490
23	22.88 $\pm$ 0.6340	6.71 $\pm$ 1.1032
25	24.85 $\pm$ 0.6488	6.60 $\pm$ 1.0784

### IV.3 Temperatura Crítica Máxima

Entre las respuestas de estrés térmico agudo, la temperatura crítica máxima (TCMax) se ha identificado en los peces con el inicio de los espasmos musculares o con la pérdida del equilibrio (Paladino *et al.*, 1980). En este trabajo se realizaron ensayos preliminares para caracterizar las respuestas de la sardina por estrés térmico ascendente. Se registró la temperatura en la que se identificaron las respuestas de estrés térmico, aumento de actividad (AA), espasmos musculares (EM) y pérdida de equilibrio (PE). Una vez que las respuestas fueron identificadas, se utilizó un acuario de 56 L que contenía 21.5 L de agua de mar y un calentador de 1000 W sujeto a una piedra de aireación, con la finalidad de difundir el calor homogéneamente. El experimento se inició con el agua a la misma temperatura de aclimatación y con dos organismos de 16 cm de longitud total y aproximadamente 35.8 g de peso. El

incremento de la temperatura de  $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  se inició después de 20 minutos para disminuir el efecto del estrés ocasionado por el manejo. Este experimento se repitió seis veces para cada temperatura de aclimatación ( $n=12$ ). En cuatro organismos donde se observó la respuesta de PE, se disecaron el hígado y el riñón para evaluar los cambios morfológicos producidos por el efecto del estrés térmico agudo.

#### IV.4 Temperatura Letal Incipiente Superior

Para conocer la temperatura letal incipiente superior (TLIS) se utilizó el procedimiento de Kilgour *et al.* (1985). Los peces ( $n=6/\text{acuario}$ ) se colocaron en una serie de acuarios con diferentes temperaturas y se registró el tiempo en el que murió el 50% de los organismos. Las temperaturas experimentales de cada condición se establecieron con la diferencia del intervalo térmico utilizado para la aclimatación ( $19\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), es decir los  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  de diferencia se sumo a cada TA y de acuerdo a la resistencia de los organismos se decidió incrementar o disminuir  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Tabla II).

Tabla II. Temperaturas experimentales a las cuales se expuso abruptamente *S. sagax*, aclimatada a cuatro temperaturas para conocer el valor de la TLIS. (TA, temperatura de aclimatación).

TA ( $^{\circ}\text{C}$ )	Temperaturas experimentales ( $^{\circ}\text{C}$ )				
19	23	24	25	26	27
21	25	26	27	28	---
23	26	27	28	29	---
25	27	28	29	30	---

Se utilizaron cinco acuarios de 56 L con un flujo continuo de agua de  $120\text{ ml/min}$ , para que el volumen total se recambiara aproximadamente cuatro veces en 24 h. La aireación fue continua y la temperatura del agua de los acuarios se mantuvo con calentadores de inmersión de  $1000\text{ W}$  que estuvieron conectados a un regulador electrónico que fue calibrado con el flujo continuo de

agua y que mantuvo las temperaturas experimentales constantes. Además se colocó al azar un termógrafo que fue programado para que registrara la temperatura experimental cada cinco y 30 minutos, mostrando una variación de 0.1 a 0.3 °C. En cada acuario se colocaron seis organismos con un peso y longitud promedio de  $39.44 \pm 4.81$  g y  $15.74 \pm 0.51$  cm, respectivamente. En estas condiciones se mantuvieron de 48 a 96 h registrándose el tiempo inicial en el momento en que se introdujeron los organismos y el instante en el que se produjo la muerte de cada pez. La letalidad de las temperaturas experimentales en el límite superior de la zona de tolerancia, se expresó como el tiempo medio de muerte. Es importante mencionar que en estos experimentos no hubo replicas debido a que no se contaba con los peces necesarios.

La TLIS de las sardinas aclimatadas a las diferentes temperaturas se calculó con el recíproco del tiempo medio de muerte para obtener la tasa de morticidad, la cual es utilizada para predecir el efecto letal acumulativo de un régimen de temperaturas fluctuantes a partir de los resultados de experimentos a temperaturas constantes. Para la predicción de la TLIS se utilizó el modelo de Kilgour *et al.* (1985), que explica la relación entre el tiempo medio de muerte y la temperatura experimental mediante la siguiente ecuación:

$$m(T) = 1/t = k^{-1}(T-T_c)^n \dots\dots\dots (1),$$

donde  $m(T)$  es la tasa de mortalidad,  $K$  es una constante,  $T$  es la temperatura experimental,  $T_c$ , es la TLIS y  $n$  con valores de 2.7, 2.0 y 1.8, es el parámetro de linealización de la relación. La ecuación muestra que  $m(T)^{1/n}$  es el proceso de extrapolación a cero tasa de morticidad, que puede ser linealizado para conocer el valor predicho de la TLIS. A cada uno de los organismos que murieron por la exposición a las diferentes temperaturas letales se le disecó el hígado y el riñón para su análisis histológico.

#### IV.5 Histología

Para los análisis histológicos, el riñón se utilizó completo y del hígado solo la parte anterior para evitar la contaminación con la vesícula biliar y sus ductos (Lagler *et al.*, 1984).

Cada uno de los órganos disecados se colocó en una caja de plástico para histología (Tissue-Tec Fisher) previamente etiquetada. Las muestras fueron fijadas en formol al 10% por un periodo de 24 horas, posteriormente se cambiaron a alcohol al 70 %. Este proceso de fijación minimiza las alteraciones *postmortem* por precipitación o coagulación de las proteínas celulares, al mismo tiempo que endurece los tejidos (Estrada *et al.*, 1982). Después de la fijación de los órganos, éstos se expusieron a un proceso de deshidratación utilizando una serie ascendente de soluciones de alcohol en un procesador de tejidos automático ó Histokinette marca Leica (modelo TP1040) para que la sustancia de inclusión penetrara bien en los tejidos (Tabla III). El proceso de deshidratación tuvo una duración de 24 horas, posteriormente, las muestras fueron incluidas en parafina utilizando un incluidor Leica EG1160.

En un micrótopo rotatorio marca American Optical (modelo Spencer 820) se realizaron cortes de 4µm de espesor de los diferentes tejidos, colocando tres cortes en cada portaobjetos para ser teñidos con la técnica hematoxilina-eosina (H-E), que permite observar los daños en células y tejidos. El montaje permanente del tejido se hizo con resina sintética (Cytoseal). Finalmente, las láminas histológicas se revisaron en un microscopio Zeiss (modelo AXIOLAB) con el fin de evaluar y describir el daño asociado al estrés producido por la temperatura.

Tabla III. Serie de alcoholes utilizados en el proceso de deshidratación de los tejidos hepático y renal de *S. sagax*.

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

#### IV.6 Procesamiento de Datos

A los datos del estrés térmico agudo se les aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar normalidad, y un análisis de varianza (ANOVA) para conocer si el efecto de la temperatura de aclimatación sobre las respuestas medidas es estadísticamente significativo con un  $\alpha$  de 0.05 (Zar, 1984). Para el procesamiento de los datos se utilizaron los programas Statistical y Sigmastat. En el caso de los datos de estrés térmico crónico se utilizó el modelo de Kilgour *et al.* (1985) y el programa SPEARMAN-KARBER para constatar que el valor de la temperatura letal observado en la sardina pueda ser predicho con estos modelos propuestos para peces y con estudios de contaminantes.

## V. RESULTADOS

### V.1 Sobrevivencia

El porcentaje de sobrevivencia de la sardina durante el periodo de aclimatación a las temperaturas de 19, 21, 23 y 25 °C fue del 98.8, 94.3, 92.1 y 49 %, respectivamente. Para el segundo grupo de organismos que fueron aclimatados a las mismas temperaturas, la sobrevivencia fue mayor al 95 % en 19, 21 y 23 °C, excepto en 25 °C (88.9 %). En la temperatura de aclimatación más alta, la sobrevivencia fue mayor en un 39.9 % en el segundo grupo. Esto se puede atribuir a que el segundo grupo después del tratamiento profiláctico, se mantuvo por dos semanas a temperatura ambiente para que los organismos se recuperaran del estrés provocado por la colecta y el transporte, además de que durante este tiempo, los organismos aceptaron al 100 % el alimento que consistió de una dieta elaborada para trucha con un 50 % de proteína (proporcionado también al primer grupo); posteriormente se inició con la aclimatación.

### V.2 Temperatura Crítica Máxima (TCMax)

Durante el proceso de calentamiento ( $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), las respuestas de estrés térmico observadas en la sardina: fueron nado de lado (NL), aumento de actividad (AA), espasmos musculares (EM), nado vertical (NV) y pérdida del equilibrio (PE). Tomando en cuenta el criterio de Lutterschmidt y Hutchison (1997), el análisis de varianza se aplicó a los datos de la temperatura en donde se observaron las respuestas de aumento de actividad, los espasmos musculares y la pérdida del equilibrio de cada organismo; las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

Cuando se comparó la respuesta de AA de las sardinas no se encontraron diferencias significativas entre 21 y 25 °C, ni en 19 con 23 °C, la diferencia térmica fue de 0.4 y de 0.5 °C, respectivamente. En el caso de las TA de 19 y 21°C, la respuesta de AA tampoco fue diferente y están separadas por 1.7 °C. En el caso de las respuestas de los EM, las diferencias fueron

significativas solo en 19 °C con 21 y 25 °C. La tendencia de la respuesta es a incrementar en función del aumento en la TA, y este comportamiento se pudo apreciar en el intervalo de 29 a 31 °C. La PE de los peces se observó en el intervalo térmico de 30.7 a 32.2 °C y las diferencias fueron significativas, excepto entre la TA de 21 y 23 °C, con una diferencia de 0.2 °C (Figura 3). Considerando los EM y la PE puedan caracterizar a la TCMax, estas respuestas en la sardina están separadas por 1.5°C en los peces de la TA de 21°C, 1.7 °C en las TA de 19 y 25 °C y 2.3 °C en la TA de 25 °C. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que explica la relación entre la respuesta de PE que caracteriza a la TCMax y la TA fue mayor al 95%.

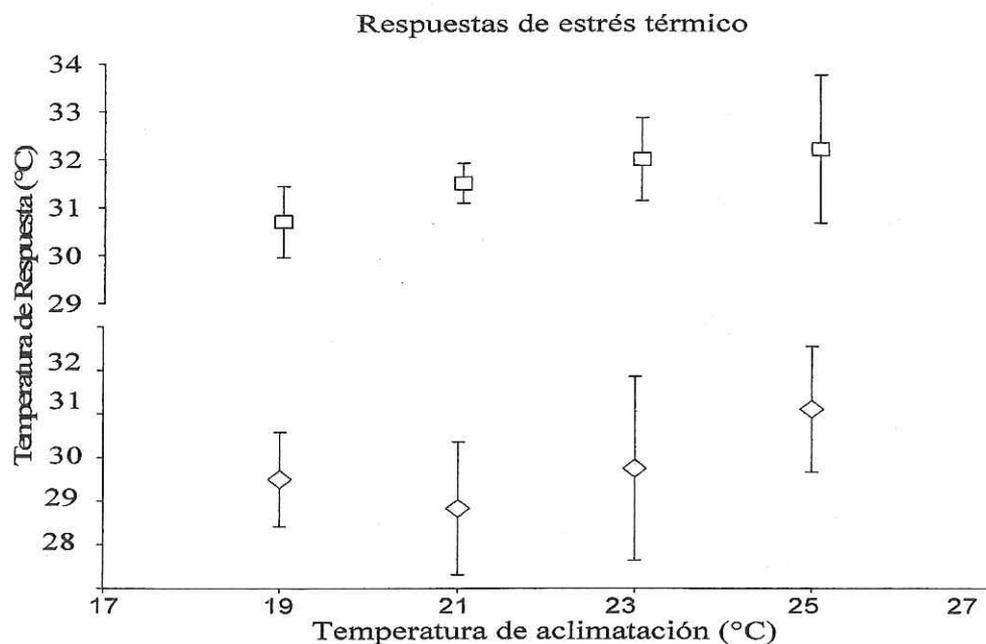


Figura 3. Respuestas de estrés térmico en las sardinas aclimatadas a diferentes temperaturas. (◇, EM) espasmos musculares y (□, PE) pérdida del equilibrio. Media  $\pm$  desviación estándar.

### V.3 Temperatura Letal Incipiente Superior (TLIS)

En los organismos que experimentaron estrés crónico se pudieron apreciar las mismas respuestas que en los peces expuestos al estrés térmico agudo. En estos experimentos, la observación de estos comportamientos varió en función de la temperatura de aclimatación y del tiempo de exposición. En los peces de todas las temperaturas experimentales se observó el

aumento de actividad, pero los espasmos musculares y la pérdida del equilibrio se apreciaron por periodos mas prolongados. Además de estas respuestas, los organismos también exhibieron mayor producción de mucus, descamación y hemorragia corporal.

En cada temperatura de exposición o experimental, el 50% de la mortalidad ocurrió en diferente tiempo. En los organismos aclimatados a 19 y 21 °C que experimentaron un shock térmico de 4 °C la mortalidad del 50 % se produjo a los 1252 y 610 min respectivamente. Al parecer los organismos aclimatados a 19 °C toleran un cambio de temperatura mayor y disminuye en función del incremento en la temperatura de aclimatación. Sin embargo las sardinas aclimatadas a 25 °C toleran la mayor temperatura de exposición (27 °C) donde el 50% de mortalidad se observó a los 216 min. (Tabla IV). Aunque estos experimentos normalmente tienen una duración de 72 a 96 horas, se pudo observar que los organismos no toleran más de 20 horas de exposición a temperaturas subletales.

Tabla IV. Tiempo (min) donde el 50% de la muestra experimental de *S. sagax* murió después de ser expuesta a diferentes temperaturas.

Temperatura de Aclimatación (°C)	Temperaturas Experimentales (°C)							
	23	24	25	26	27	28	29	30
19	1252	749	730	698	79	-----	-----	-----
21	-----	-----	610	453	454	242	-----	-----
23	-----	-----	-----	470	279	231	233	-----
25	-----	-----	-----	-----	216	215	120	92

El valor de la TLIS fue calculado utilizando la tasa de morticidad y con el recíproco del tiempo de muerte a un valor de  $n = 1.8$  y  $2.7$ , que es el parámetro de linealización. La TLIS de los organismos aclimatados a 19 °C a cero tasa de morticidad fue de 22.3 °C y para 21, 23 y 25 °C

fue de 20.2, 15.2 y 22.8 °C, respectivamente. El coeficiente de determinación de la regresión de los modelos fue del 78 % en la TA de 19 °C y mayor al 80 % para la TA de 21, 23 y 25 °C (Figuras 4 a 7).

Los valores de la TLIS estimados con el modelo de Kilgour *et al.* (1985) no se aproximan al valor encontrado experimentalmente (23, 25, 26 y 27 °C), excepto para la TA de 19 °C donde el observado fue de 23.3 °C y el predicho de 22.3 °C. La diferencia entre la TLIS observada y calculada en los organismos aclimatados a 19 °C es de 0.7 °C mientras que en la TA de 21, 23 y 25 °C es de 5.3, 11 y 4.3 °C. Considerando que la TLIS estimada con el modelo debe estar acorde al valor observado dentro de 0.5 a 1°C como se ha demostrado en varias especies de peces, para este caso en particular no se cumple, motivo por el cual es pertinente que el estudio de la temperatura letal para la sardina se fortalezca con las repeticiones necesarias para estimar la variabilidad de la respuesta dentro de la zona de tolerancia de la especie.

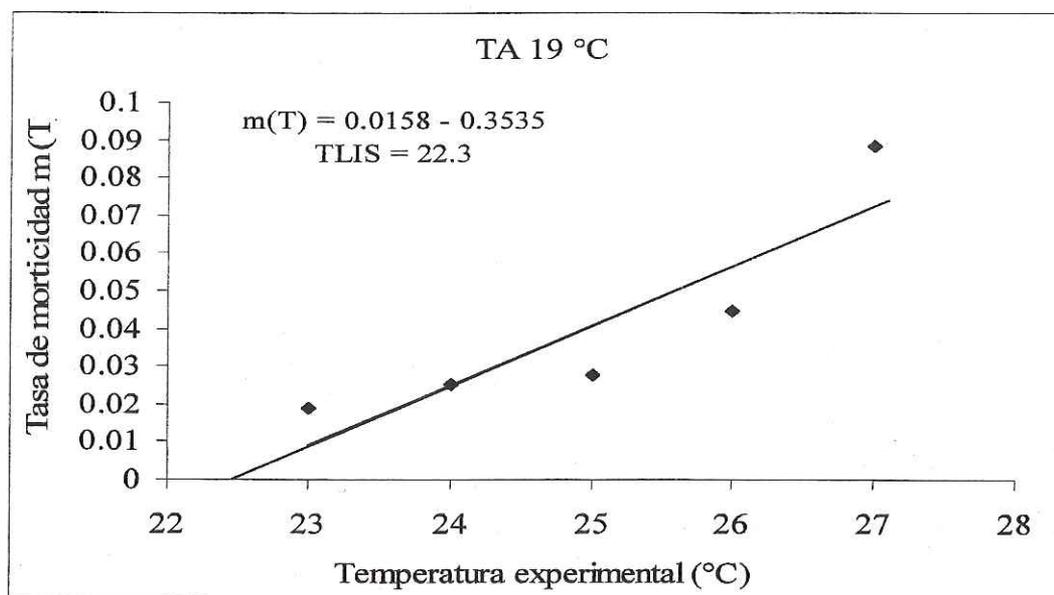


Figura 4. Temperatura letal incipiente superior de *S. sagax* aclimatada a 19 °C determinada con el modelo de Kilgour *et al.* (1985) con el valor de linealización de 1.8.

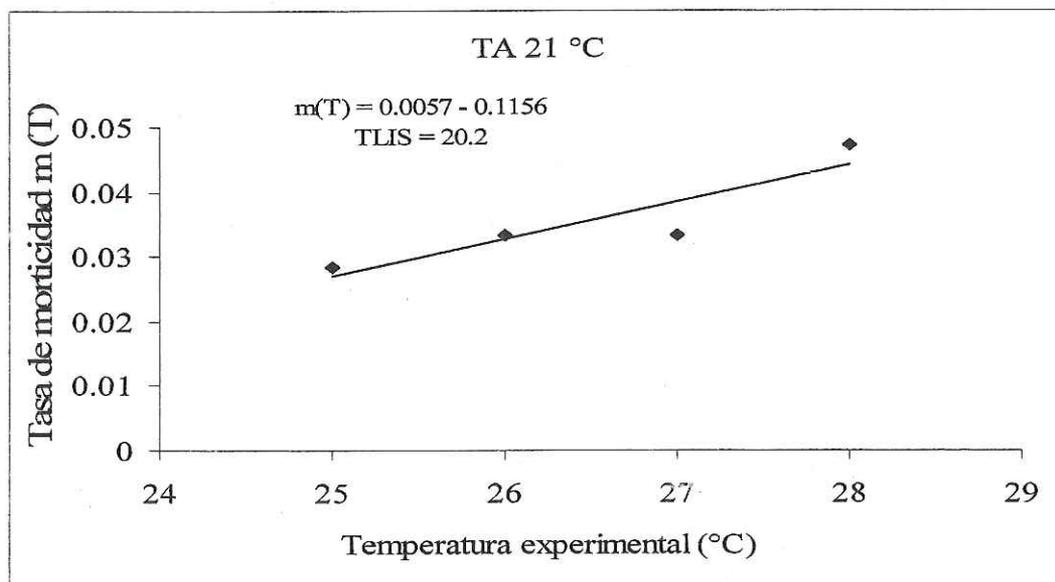


Figura 5. Temperatura letal incipiente superior de *S. sagax* aclimatada a 21 °C determinada con el modelo de Kilgour *et al.* (1985) con el valor de linealización de 1.8.

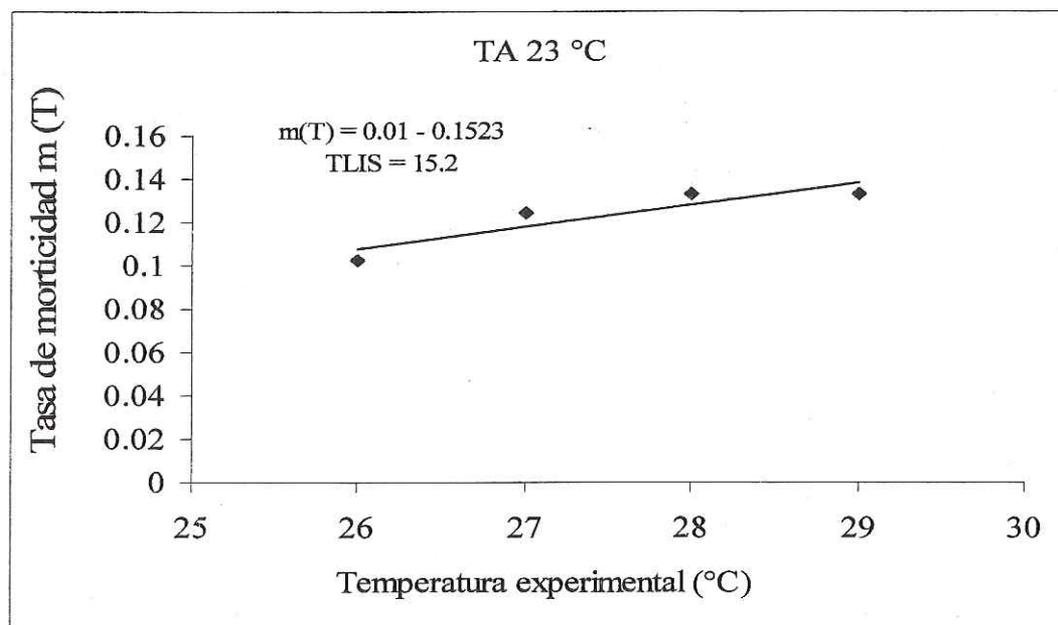


Figura 6. Temperatura letal incipiente superior de *S. sagax* aclimatada a 23 °C determinada con el modelo de Kilgour *et al.* (1985) con el valor de linealización de 2.7.

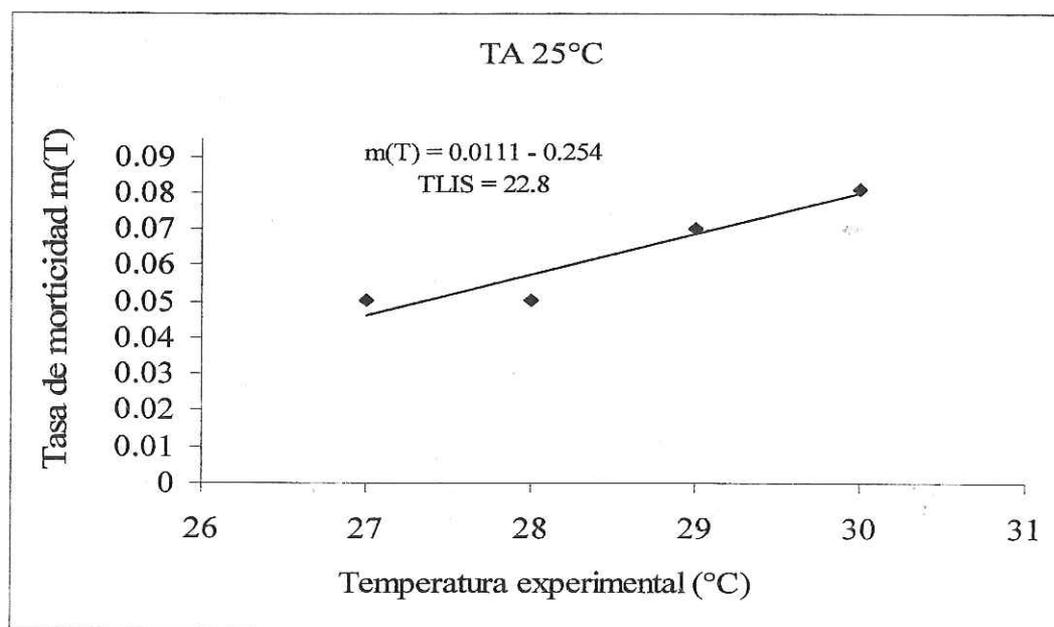


Figura 7. Temperatura letal incipiente superior de *S. sagax* aclimatada a 25 °C determinada con el modelo de Kilgour *et al.* (1985) con el valor de linealización de 1.8.

La temperatura letal también se determinó utilizando el programa SPEARMAN-KARBER (LC50) (Hamilton y Thurston, 1977), el cual se utiliza cuando se trabaja con diferentes concentraciones de compuestos químicos. En este caso como los estudios para conocer las temperaturas letales 50 tomaron como base los criterios establecidos en los experimentos de dosis letales 50 (DL50), con este programa la temperatura letal para los organismos aclimatados a 19 °C fue de 22.6 °C y, para las TA de 21, 23 y 25 °C, fue de 24.6, 25.8 y 26.6 °C, respectivamente (Tabla V).

La diferencia entre los valores de la TLIS obtenida con este método y la observada fue de 0.7, 0.4 y 0.5 °C. En los organismos aclimatados a 19 °C, el cálculo se hizo con un tiempo de 48 horas y no en las primeras 12 horas como en las TA restantes, debido a que el 50% de mortalidad en las temperaturas experimentales de 23 y 24 °C se produjo a un tiempo mayor. La comparación de la TLIS con el método de SPEARMAN para las sardinas aclimatadas a 19 °C

fue el único valor que se pudo comparar con el modelo de Kilgour *et al.* (1987) y la diferencia fue de 0.7 °C.

Tabla V. Valores de temperatura letal obtenidos por el método SPEARMAN-KARBER para *Sardinops sagax* aclimatada y expuesta a diferentes temperaturas.

Método SPEARMAN-KARBER					
Químico: Temperatura			Especie: <i>Sardinops sagax</i>		
TA (°C)	Concentración				
19	23.0	24.0	25.0	26.0	27.0
21	24.0	25.0	26.0	27.0	28.0
23	25.0	26.0	27.0	28.0	29.0
25	26.0	27.0	28.0	29.0	30.0
Número de org.	6	6	6	6	6
Duración: 12 hr.					
TA	TLO	TL50	Limite inferior 95%	Limite superior 95%	
19	23.3	25.6	25.0	26.2	
		<u>22.6</u>			
21	25.3	24.6	24.3	24.9	
23	26.2	25.8	25.4	26.2	
25	27.1	26.6	26.3	26.9	

El valor subrayado fue calculado a las 48 horas.

#### V.4 Histología de Hígado y de Riñón

En las preparaciones histológicas de cortes transversales de hígado de *Sardinops sagax*, se observó que el arreglo lobulillar característico de los vertebrados no está presente. Además de no mostrar este arreglo se encontraron diversas alteraciones las cuales fueron de menor a mayor grado, de acuerdo a la temperatura a la cual fueron expuestas.

En las preparaciones de los organismos aclimatados a 19, 21, 23 y 25 °C y que no fueron expuestos al estrés térmico ascendente, se observó el arreglo normal de los hepatocitos, así como la presencia de células sanguíneas y hepatocitos vacíos (Figura 8). En algunos casos el tamaño del núcleo aumentó de 6.8  $\mu$  (19 °C) a 7.5  $\mu$  (25 °C); en el nucleolo también se observó un aumento de 2.5  $\mu$  (19 °C) a 5  $\mu$  (25 °C).

En *Sardinops sagax* se observó la forma típica del riñón de teleósteos que consta de una parte cefálica, media y caudal. En las preparaciones histológicas de cortes longitudinales de este órgano se logró localizar la porción cefálica distinguiéndose por el tejido linfoide, mientras que la porción media se evidenció por ser la zona con la mayor presencia de glomérulos.

En las preparaciones de los organismos aclimatados a 19, 21, 23 y 25 °C y que no fueron expuestos al estrés térmico se observaron centros melanomacrófagos, y las estructuras que conforman a la nefrona como son los túmulos renales y el corpúsculo renal que está formado por el glomérulo y rodeado por la cápsula de Bowman la cual está formada por una pared de células planas (Figura 9).

#### V.4.1 Estrés Térmico Agudo

En los organismos que experimentaron el estrés térmico agudo, microscópicamente, en algunos hígados se observaron hemorragias. Así mismo, algunos hígados tenían la apariencia de estar macerados. En las preparaciones de estas muestras se encontró: a) modificación en el tamaño de los hepatocitos, los más pequeños se observaron en la TA de 19 °C (11.5  $\mu$  de diámetro), así como b) hepatocitos vacíos y presencia de células sanguíneas. En el hígado de las sardinas aclimatadas a 25 °C se observaron infiltraciones de células sanguíneas, pérdida de delimitación celular en los hepatocitos y zonas de necrosis (Figura 10). Además se encontraron nucleolos grandes (3.5  $\mu$ ) que no se observaron en los hepatocitos de las sardinas de las otras temperaturas de aclimatación.

En los cortes del riñón de los organismos expuestos al estrés térmico agudo se observaron centros melanomacrófagos, el espacio intercapsular fue mayor al observado en los organismos control (19°C), también se identificaron glomérulos retraídos (21 °C), glomérulos con restos celulares y glomerulos vacíos (23 y 25 °C) (Figura 11).

#### V.4.2 Estrés Térmico Crónico

El hígado de los organismos expuestos a las temperaturas letales tenía una apariencia grumosa y coloraciones desde café pálido hasta verdoso. Microscópicamente, las alteraciones encontradas en las preparaciones de los organismos de cada temperatura de aclimatación y expuestos a diferentes temperaturas experimentales fueron las siguientes:

- a) Vacuolización (Vac): se conoce también como transformación hidropica y es una cavidad celular y se caracteriza por la formación de vacuolas múltiples en el citoplasma.
- b) Cambio en el diámetro del hepatocito (CDH)
- c) Núcleos grandes (NG): aumento en el volumen o tamaño nuclear.
- d) Picnosis (Pic): condensación de la cromatina.
- e) Apoptosis (Ap): fragmentación de la cromatina.
- f) Necrosis (Nec): muerte celular o estado final en el daño celular irreversible.
- g) Cariolisis (car): disolución del núcleo.
- h) Presencia de melanomacrófagos (MM)
- i) Coagulación (Coag)
- j) Foco de infección bacteriana (FIB)

Algunas de estas alteraciones, como apoptosis, picnosis y necrosis se observaron también en los cortes de hígado de los organismos expuestos al estrés térmico agudo, sólo que en los peces expuestos a las temperaturas letales, las alteraciones fueron de menor a mayor grado, conforme aumentaba la temperatura experimental y el tiempo de exposición.

En los organismos aclimatados a 19 °C y que fueron expuestos a 23°C, sólo se observó vacuolización (Figura 12) y, a partir de la temperatura experimental de 24 a 27 °C, además de la vacuolización se observaron cambios en el tamaño del hepatocito, modificación en el tamaño del núcleo y nucléolo, así como picnosis, apoptosis, necrosis, disolución del núcleo y centros melanomacrófagos; estos últimos no se observaron en el tejido de los peces expuestos a 23 y 27

°C. En el tejido hepático de los organismos aclimatados a 21 °C y expuestos a estrés crónico se observaron las alteraciones antes mencionadas excepto picnosis, disolución del núcleo y centros melanomacrófagos (Figura 13). En los peces expuestos a estrés crónico y aclimatados a 23 y 25 °C se encontraron las mismas alteraciones, así como heterofilia, coagulación y focos de infección bacteriana (Figura 14) (Tabla VI).

Las alteraciones en el riñón de la sardina expuesta a las diferentes temperaturas experimentales fueron:

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

Algunas de estas alteraciones como necrosis, apoptosis y focos de infección bacteriana se observaron también en cortes de hígado y, al igual que en éste organo, en el riñón las alteraciones resaltan conforme aumentaba la temperatura experimental y el tiempo de exposición. La degeneración tubular y glomerular, la necrosis tubular y glomerular, picnosis, la coagulación, la vacuolización, los centros melanomacrófagos y la apoptosis, se observaron en el tejido renal de las sardinas en todas las condiciones de aclimatación (Figura15-16). Sin embargo, la presencia de focos de infección bacteriana se observó solo

en el intervalo de aclimatación de 19 a 23 °C, los vasos sanguíneos dilatados sólo se vieron en los organismos expuestos a 23 y 24 °C que habían sido aclimatados a 19 °C (Tabla VII).

Tabla VI. Alteraciones en el tejido hepático de *S. sagax* aclimatada a cuatro temperaturas y expuesta a estrés térmico crónico. TA, temperatura de aclimatación; TE, temperatura experimental.

T.A.	TE	Alteraciones											
		Vac. (a)	MTH (b)	MTN (c)	MTn (d)	Pic (e)	Ap (f)	Nec. (g)	DPN (h)	Het. (i)	MM (j)	Coag. (k)	FIB (l)
19	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	*	-	-	-	*	*	*	*	-	-	-	-
	24	*	*	*	*	*	*	*	*	-	*	-	-
	25	*	*	*	*	*	*	*	*	-	*	-	-
	26	*	*	*	*	*	*	*	*	-	*	-	-
	27	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-
21	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	*	*	*	*	-	*	*	-	-	-	-	-
	26	*	*	*	*	-	*	*	-	-	-	-	-
	27	*	*	*	*	-	*	*	-	-	-	-	*
	28	*	*	*	*	-	*	*	-	-	-	-	-
23	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	26	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*
	27	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*
	28	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*
	29	*	*	*	*	*	*	*	-	*	*	*	*
25	C	*	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	28	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	29	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	30	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

C, organismo control; \*, presencia; - ausencia

Tabla VII. Alteraciones en el tejido renal de *S. sagax* aclimatada a cuatro temperaturas y expuesta a estrés térmico crónico. TA, temperatura de aclimatación; TE, temperatura experimental.

		Alteraciones								
T.A.	TE	NT (a)	NG (b)	MM (d)	Pic (e)	Ap (g)	FIB (h)	Coag (i)	Vac (j)	DET (k)
19	C	-	-	*	-	-	-	-	-	-
	23	*	-	-	*	*	*	*	*	*
	24	*	*	*	*	*	-	*	*	*
	25	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	26	*	*	*	*	*	-	*	*	*
	27	*	*	*	*	*	-	*	*	*
	27	*	*	*	*	*	*	*	*	*
21	C	-	-	-	-	-	-	-	*	-
	25	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	26	*	*	*	*	*	-	*	*	*
	27	*	*	*	*	*	-	*	*	*
	28	*	*	*	*	*	-	*	*	*
	28	*	*	*	*	*	*	*	*	*
23	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	26	*	*	*	*	*	-	*	-	*
	27	*	*	*	*	*	-	*	-	*
	28	*	*	*	*	*	*	*	-	*
	29	*	*	*	*	*	*	*	-	*
	29	*	*	*	*	*	*	*	*	*
25	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	*	*	-	*	*	*	*	-	*
	28	*	*	-	*	*	*	*	-	*
	29	*	*	-	*	*	*	*	-	*
	30	*	*	-	*	*	*	*	-	*
	30	*	*	-	*	*	*	*	*	*

C, organismo control; \*, presencia; -, ausencia

## Organismos Aclimatados

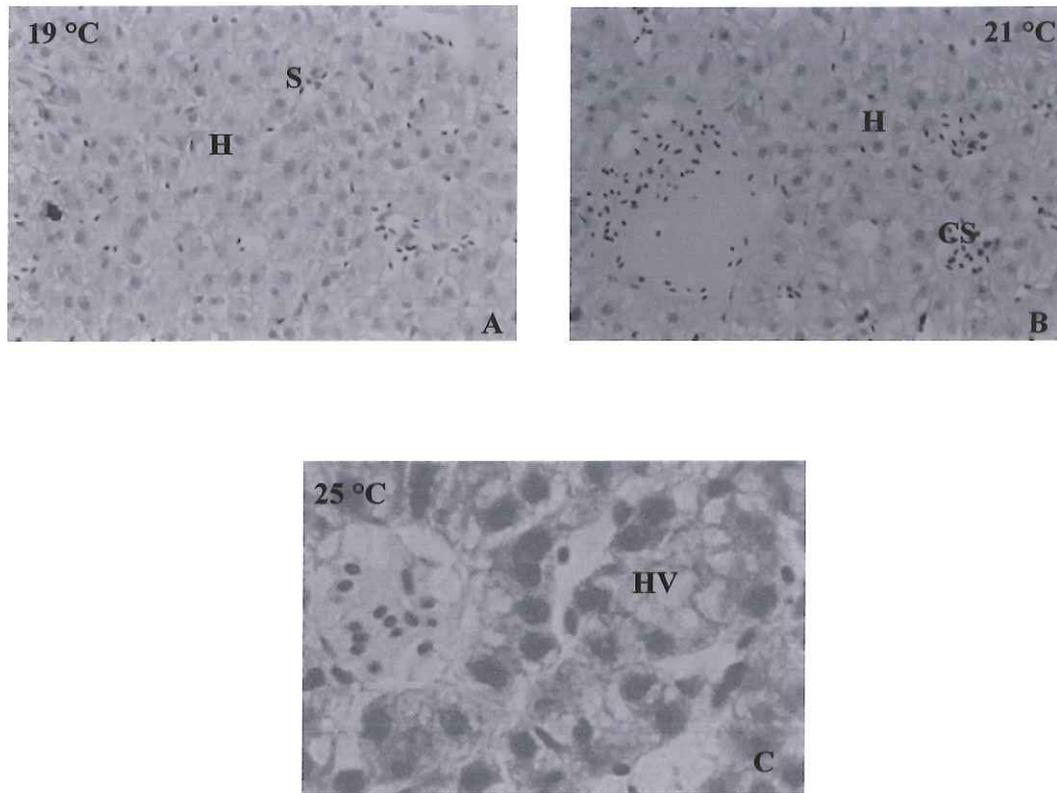


Figura 8. Corte transversal de hígado de *S. sagax* aclimatada a diferentes temperaturas. A) se observan la formación de cordones hepáticos (H), sinusoides (S), 500X; B) hepatocitos (H) y células sanguíneas (CS), 500X y C) hepatocitos vacíos (HV), 1250X H-E.

## Organismos Aclimatados

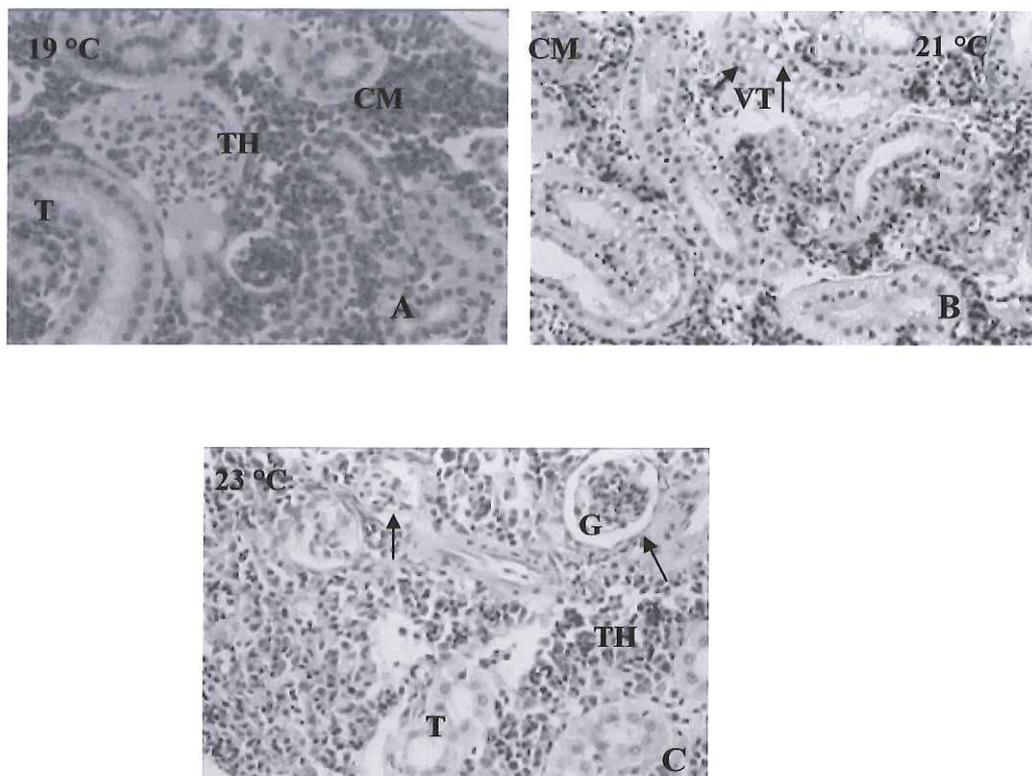


Figura 9. Corte longitudinal de riñón de *S. sagax* aclimatada a diferentes temperaturas. A) se observa el tejido hematopoyético (TH), túmulos renales (T) y centros melanomacrófagos (CM), B) vacuolas en los túbulos renales (VT), centros melanomacrófagos (CM) y C) túbulos renales (T), glomérulos (G) y tejido hematopoyético (TH), 500X H-E.

Histología de *Sardinops sagax* (estrés térmico agudo)

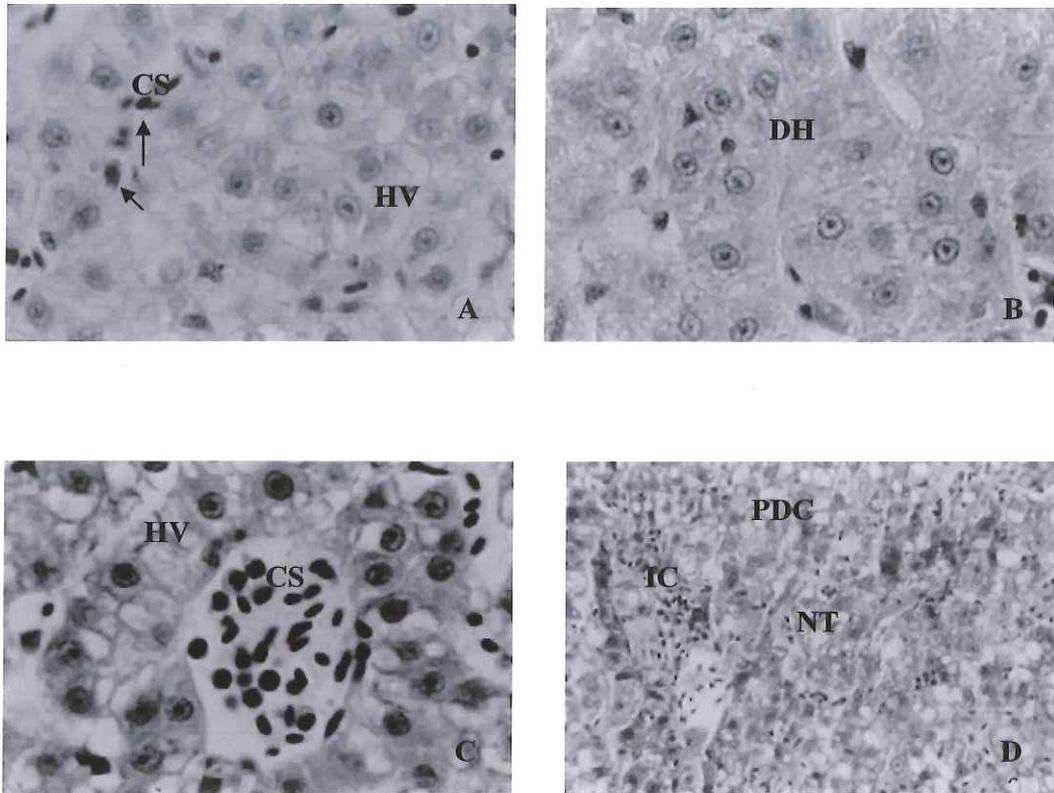


Figura 10. Corte transversal de hígado de *S. sagax* expuesta a estrés térmico agudo. A) se observan hepatocitos vacíos (HV), células sanguíneas (CS), B) desarreglo de hepatocitos (DH), C), hepatocitos vacíos (HV), células sanguíneas (CS), 500X y D) necrosis en todo el tejido (NT), infiltración de células sanguíneas (IC), así como pérdida de delimitación celular (PDC), 1250X H-E.

Histología de *Sardinops sagax* (estrés térmico agudo)

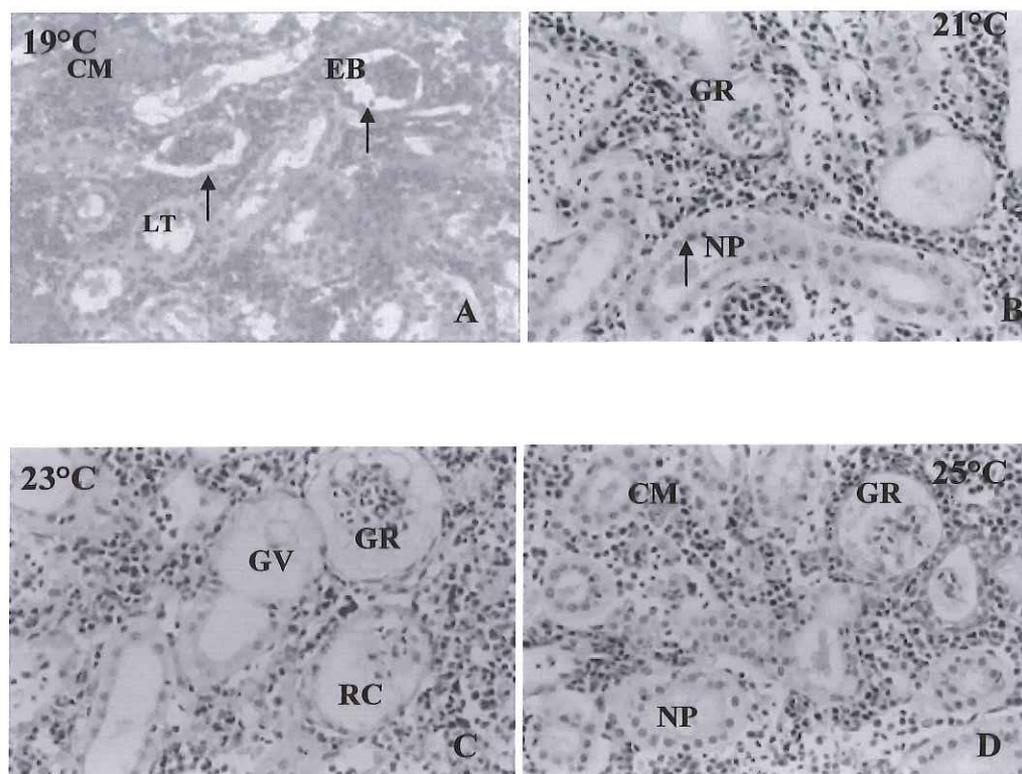


Figura 11. Corte longitudinal de riñón de *S. sagax* expuesta a estrés térmico agudo. A) se observan centros melanomacrófagos (CM), la luz en túbulos renales (LT), el espacio intercapsular de Bowman (EB) en el glomérulo aumenta B), glomérulo retraído (GR), núcleos picnóticos (NP) y restos celulares, C) glomérulo retraído, con restos celulares (RC) y vacío (GV) y D) núcleos picnóticos, glomérulo retraído y centro melanomacrófago, 500X H-E.

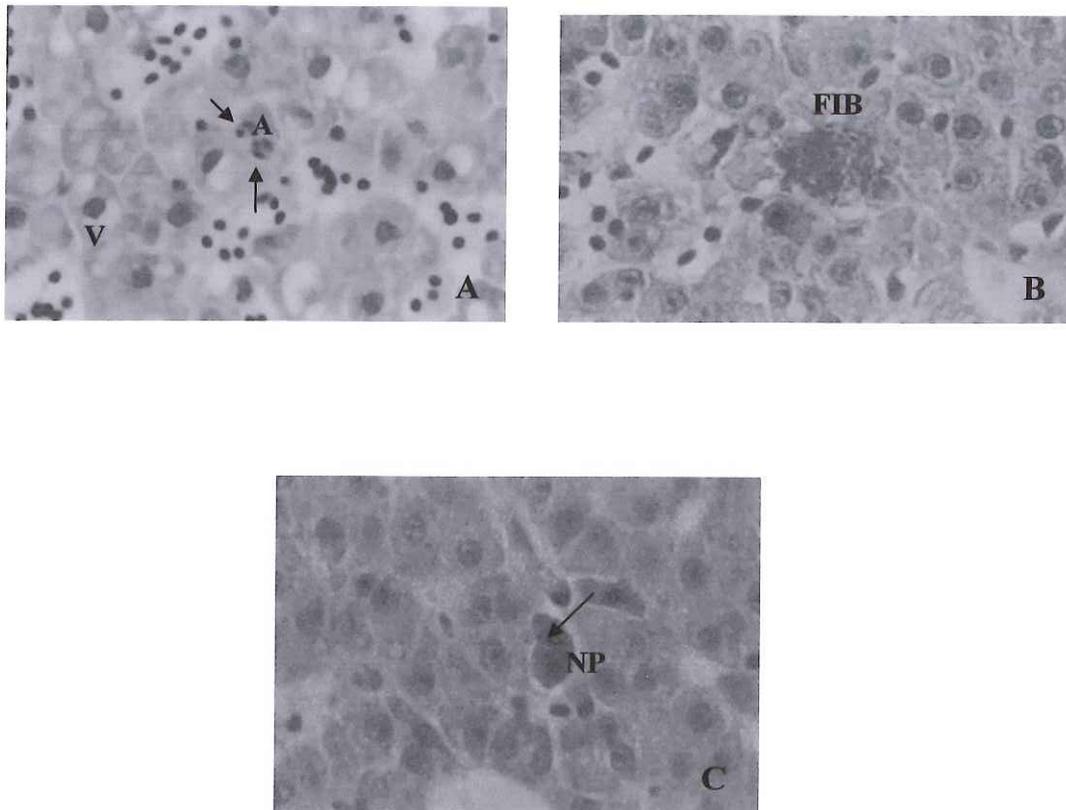
Histología de *Sardinops sagax* (estrés térmico crónico)

Figura 12. Corte transversal de hígado de *S. sagax* aclimatada a 19 °C y expuestas 23.3 °C. A) se observa hepatocito con núcleos apoptóticos (A), vacuolas (V); B) foco de infección bacteriana (FIB) y C) hepatocito con núcleo picnotico (NP), 1250X H-E.

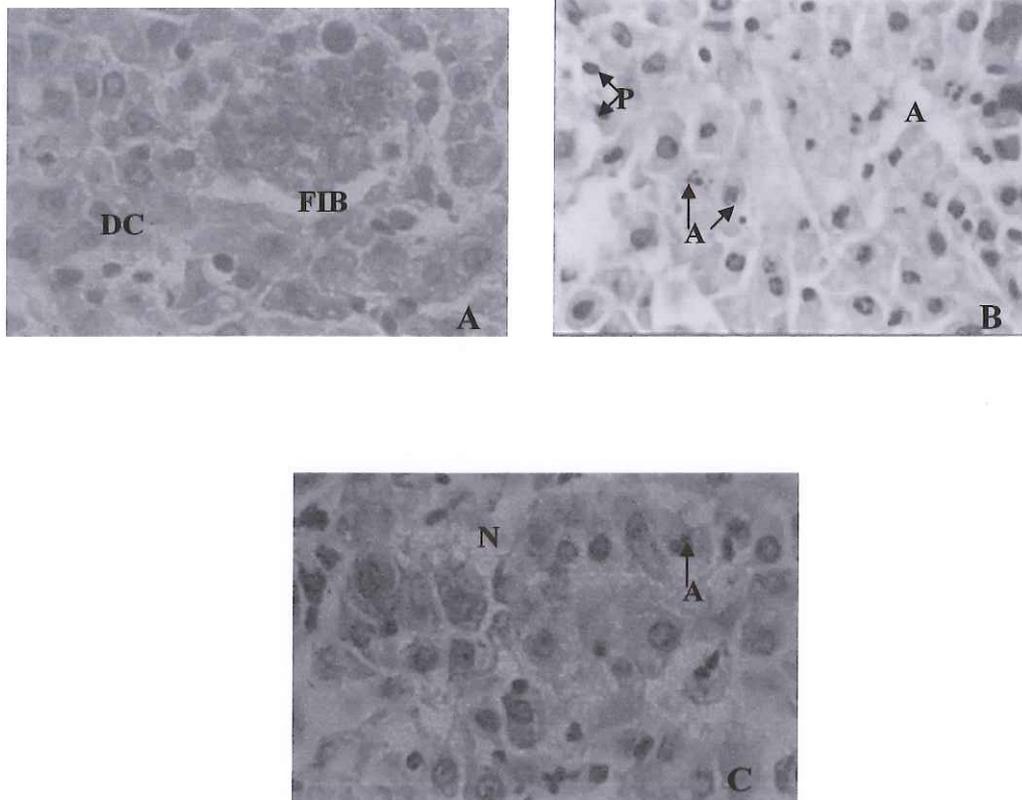
Histología de *Sardinops sagax* (estrés térmico crónico)

Figura 13. Corte transversal de riñón de *S. sagax* aclimatada a 21 °C y expuesta 25.3 °C. A) se observan foco de infección bacteriana (FIB), desorganización celular (DC); B) núcleos apoptóticos (A) y núcleos picnóticos (P) y C) necrosis (N) y núcleos apoptóticos, 1250X H-E.

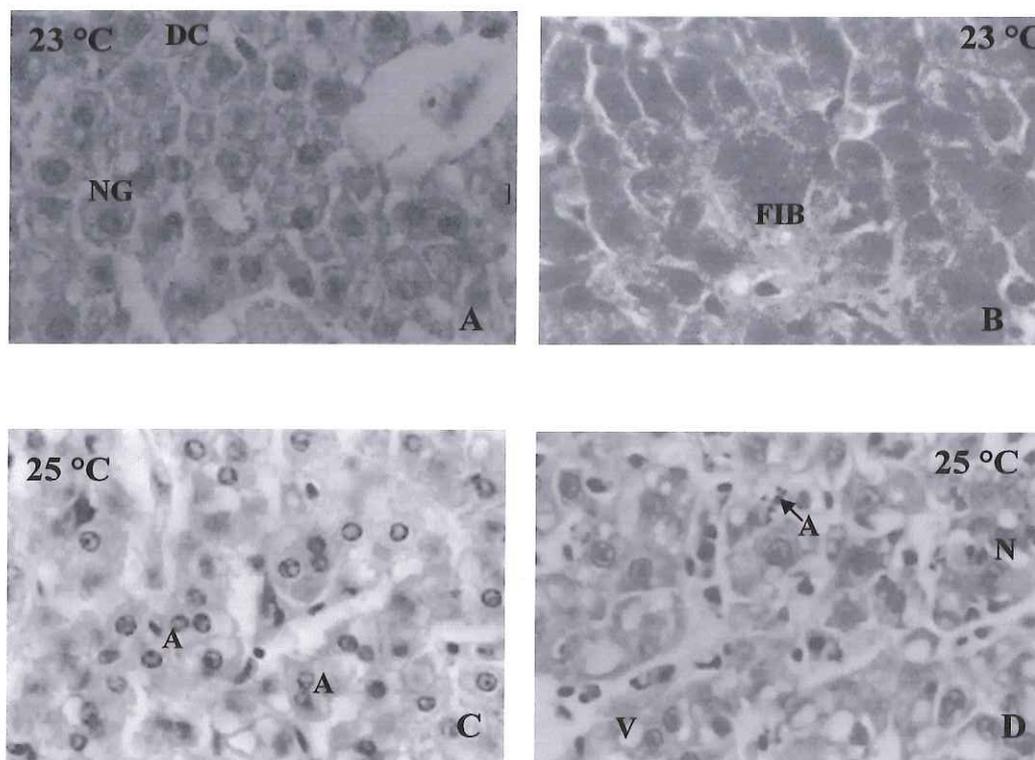
Histología de *Sardinops sagax* (estrés térmico crónico)

Figura 14. Corte transversal de hígado de *S. sagax* aclimatada a 23 y 25 °C y expuesta a 26.2 y 27.1 °C. A) se observa desorganización celular (DC), núcleos grandes (NG); B) foco de infección bacteriana (FIB); C) apoptosis (A) y D) apoptosis, necrosis (N) y vacuolas (V), 1250X H-E.

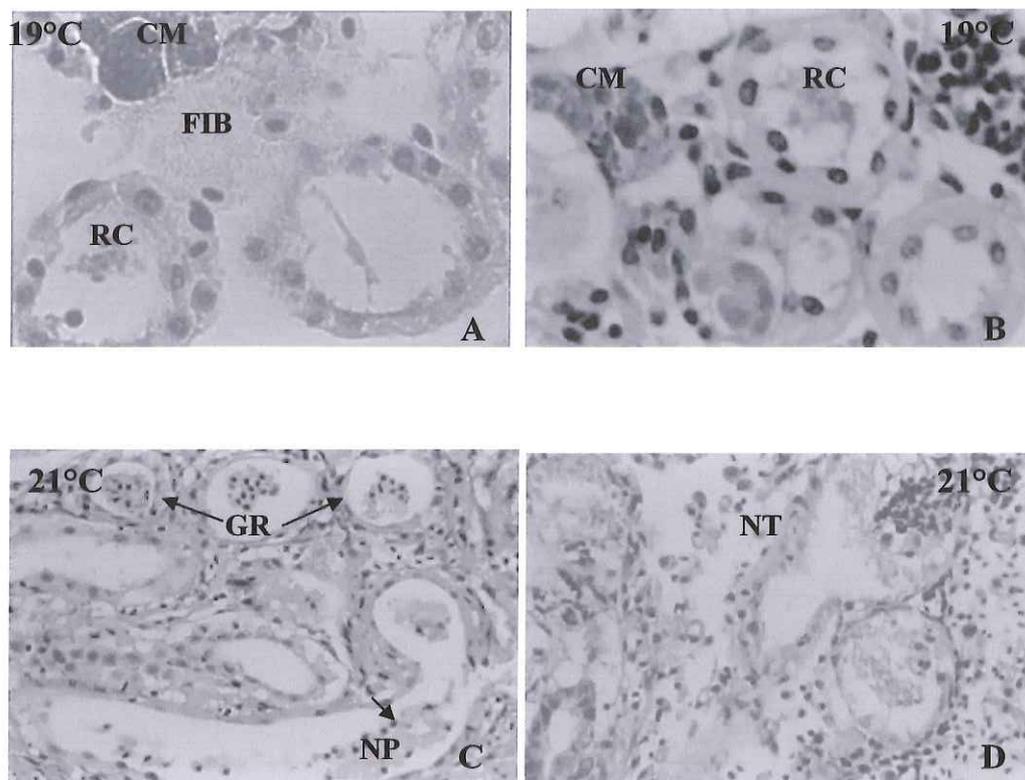
Histología de *Sardinops sagax* (estrés térmico crónico)

Figura 15. Corte longitudinal de riñón de *S. sagax* aclimatada a 19 y 21 °C y expuesta a 23.3 y 25.3 °C, respectivamente. A) se observa centro melanomacrofago (CM), restos celulares (RC) y foco de infección bacteriana (FIB); B) centros melanomacrofaeos y restos celulares; C) glomérulos retraídos (GR), núcleos picnoticos (NP) y D), necrosis de todo el tejido (NT), 1250X H-E.

Histología de *Sardinops sagax* (estrés térmico crónico)

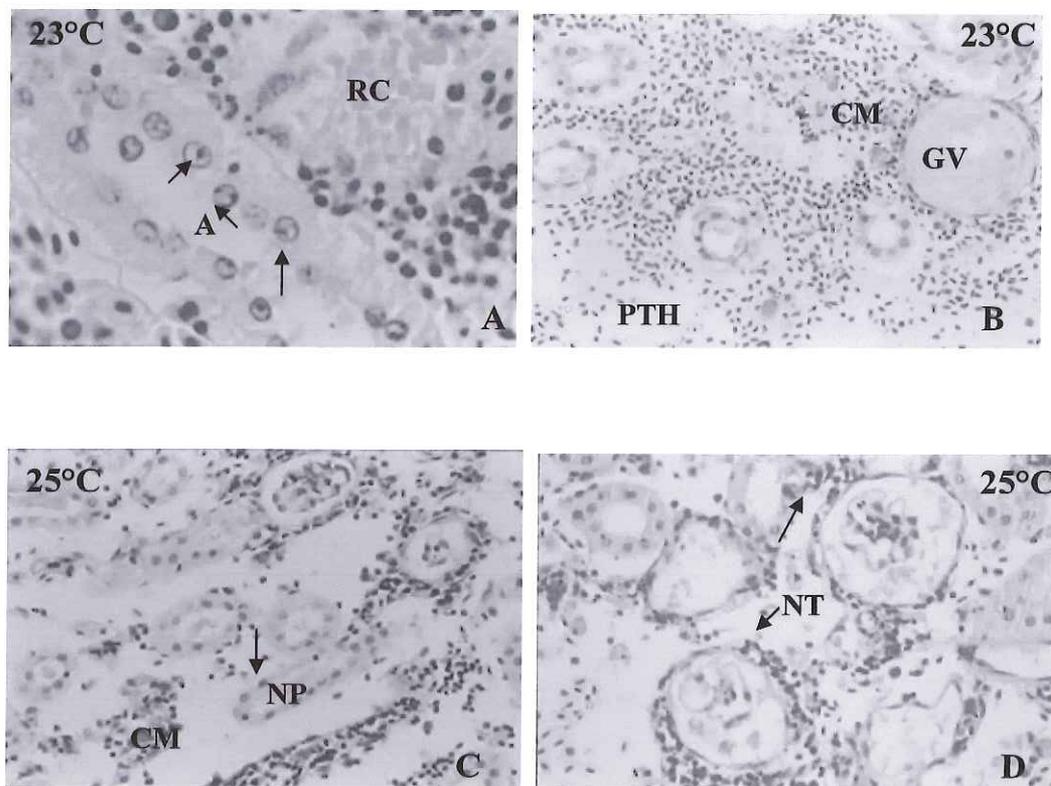


Figura 16. Corte longitudinal de riñón de *S. sagax* aclimatada a 23 y 25°C y expuesta a 26.2 y 27.1 °C, respectivamente. A) se observa núcleos apoptóticos (A), restos celulares (RC); B) pérdida de tejido hematopoyético PTH, corpúsculo renal vacío (GV) y centros melanomacrófagos (CM); C) núcleos picnóticos, centros melanomacrófagos y D) áreas necróticas de todo el tejido (NT), 1250X H-E.

## VI. DISCUSIÓN

Las fluctuaciones en el régimen de temperatura de muchos ecosistemas terrestres y marinos han sido asociadas a las oscilaciones en el clima. Las consecuencias de dichas oscilaciones en muchos de los ecosistemas marinos, incluyen cambios en el tiempo de reproducción de los organismos, así como en los sucesos de reclutamiento, crecimiento, mortalidad y, finalmente cambios en la distribución geográfica de las especies (Pörtner, 2002).

La temperatura ejerce un fuerte control en el metabolismo de los organismos acuáticos debido a que, en la mayoría de ellos la temperatura del medio circundante, es similar a la interna, por lo que su actividad es afectada forzándolos a que se adapten al ambiente que los rodea mediante ajustes en sus mecanismos bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento (Hill, 1980; Pinet, 1998).

En el presente estudio se evaluaron las respuestas de *Sardinops sagax* aclimatada a diferentes temperaturas y expuesta a un incremento paulatino de temperatura, observando dos respuestas más de las descritas por Paladino *et al.* (1980); la respuesta de nado de lado seguido por el aumento de actividad, los espasmos musculares, el nado vertical y la pérdida del equilibrio. Paladino *et al.* (1980), Prosser y Nelson (1981), Hernández (1998) y Del Río (2004), observaron las respuestas de aumento de actividad, los espasmos musculares y la pérdida del equilibrio en *Carassius auratus*, *Poecilia sphenops* y *Oreochromis mossambicus*. De acuerdo con Prosser y Nelson (1981), estas respuestas son inducidas por el enfriamiento o calentamiento del cerebro, particularmente cuando se trata del aumento de actividad y la pérdida del equilibrio. Además, mencionan que comportamientos similares han sido observados en insectos, cangrejos y mamíferos. En los peces de agua dulce como *Salvelinus alpinus* y *Salmo trutta* las respuestas observadas han sido el aumento de actividad, la pérdida de equilibrio y los movimientos operculares (Elliott y Elliott, 1995; Lowe y Vance, 1955), mientras que en *Nirosaurus ornatus* se observó la desorganización o la pérdida de la habilidad para escapar de

esta condición. Luttersmidt y Hutchinson (1997), realizaron una prueba de  $t$  con datos de 34 especies para determinar la diferencia significativa de la media, la varianza y la desviación estándar, asociadas con las respuestas de los espasmos musculares y la pérdida del equilibrio. Los resultados mostraron mayor significancia para la respuesta de espasmos musculares que para la pérdida del equilibrio, por lo cual, sugieren que los espasmos musculares son más significativos que la pérdida del equilibrio porque tienen mayor precisión y relevancia fisiológica, sin embargo, sugieren que ambas respuestas deben ser medidas.

En *Sardinops sagax* se observaron cinco respuestas, sin embargo, se consideraron el aumento de actividad, los espasmos musculares y la pérdida del equilibrio debido a que fueron los comportamientos que se observaron en todos los organismos; la conducta de nado de lado se vio en un 14.5 % y el nado vertical en un 22.9%. Tomando en cuenta el análisis realizado por Luttersmidt y Hutchinson (1997), se pueden tomar otras respuestas sólo si éstas son visiblemente identificadas; en este estudio el nado de lado y el nado vertical fueron evidentemente caracterizadas, sin embargo, en la muestra analizada no todos los organismos las presentaron por lo que la respuesta que ejemplifica a la TCMax de la sardina es la pérdida del equilibrio (PE).

El estrés térmico ascendente desencadena una serie de comportamientos en la sardina, con los cuales se observó un incremento en su resistencia térmica en función del aumento en la temperatura de aclimatación. Esta relación fue más evidente en la respuesta de la PE que caracteriza al TCMax y que se observó en el intervalo de 30.7 a 32.2 °C.

Tsuchida (1995), reportó para *Sardinops melanostictus* una TCMax de 30.9 y 33.6 °C con temperaturas de aclimatación de 20 y 26 °C, respectivamente. Al igual que en este trabajo, la pérdida del equilibrio se utilizó para caracterizar a la TCMax. La diferencia de 0.8 °C en la TCMax de la sardina *S. melanostictus* se puede deber a que el incremento de la temperatura fue a una tasa de 5 °C por hora, lo que permite a los organismos resistir temperaturas más altas.

Aunque el intervalo de temperatura de aclimatación es similar al utilizado en el presente trabajo, los valores de TCM<sub>ax</sub> de *S. melanostictus* y *S. sagax* son diferentes, lo cual no sólo se puede atribuir a la temperatura de aclimatación o a la tasa de calentamiento, sino a la temperatura estacional y a su distribución geográfica, reflejando así la amplitud de las fluctuaciones de temperatura en el hábitat de la especie (Pörtner, 2002). Sin embargo, es importante mencionar que la resistencia térmica de los organismos no sólo se modifica por la temperatura de aclimatación, sino también por otros factores como el fotoperiodo, los ciclos estacionales, el pH, la salinidad, la dieta y el estatus reproductivo (Lutterschmidt y Hutchinson, 1997), en el caso particular de la sardina la resistencia térmica observada se atribuye al efecto de la temperatura de aclimatación.

La relación entre la temperatura de aclimatación y la resistencia observada en la sardina, también se ha reportado en otras especies como *Girella nigricans* (Doudoroff, 1942), *Nirosaurus ornatus* (Lowe y Vance, 1955), *Ictalurus punctatus* (Cheetham *et al.* 1976), peces estenotérmicos (Beker y Genoway, 1979), *Micropterus salmoides* (Fields *et al.*, 1987), *Poecilia sphenops* (Hernández, 1998) y *Oreochromis mossambicus* (Del Río, 2004). Las diferencias en la resistencia ejemplifican la capacidad de los peces para ajustarse a los cambios en la temperatura ambiental, es por ello que la prueba de TCM<sub>ax</sub> se considera un buen indicador de adaptación y estrés en peces. Benfey *et al.* (1997), mencionan que *Salvelinus fontinalis* expuesta a incrementos de 2 °C por hora incrementa su resistencia al TCM<sub>ax</sub>. Carline y Machung (2001), observaron en organismos silvestres de *Salmo trutta*, *Onchorhynchus mykiss* y *Salvelinus fontinalis* que la TCM<sub>ax</sub> es mayor en las especies silvestres que en las domesticadas, lo que puede atribuirse a la mayor variabilidad genética en las especies silvestres.

La temperatura crítica máxima se ha estudiado en varias especies de peces, aclimatados a temperaturas de 10 °C hasta 35°C y posteriormente expuestos al estrés térmico agudo. En estos casos, el valor de la TCM<sub>ax</sub> tiene valores desde 25 °C hasta 43 °C. En *Ictalurus punctatus*,

aclimatado en un intervalo de 12 a 32 °C, la temperatura donde se observa la respuesta que caracteriza a la TCM<sub>ax</sub> se incremento 7.5 °C (Anexo I). En estas especies existe la tendencia a incrementar su resistencia térmica conforme aumenta la temperatura de aclimatación.

Los estudios de estrés térmico crónico, como es el caso de la temperatura letal incipiente superior, se han utilizados como herramienta para conocer la tolerancia térmica de los organismos y cómo se modifica por diversos factores. Es importante conocer la tolerancia de los organismos poiquiloterms ya que es un índice ecológico inmediato que provee información que permite explicar su distribución geográfica, sus patrones de migración y la capacidad de adaptación a diferentes condiciones térmicas (Rose, 1967; Brett, 1956).

En *Sardinops sagax* los valores de la temperatura letal incipiente superior fueron influenciados por la temperatura de aclimatación, ya que aumenta su resistencia conforme se incrementa la TA. En los peces aclimatados a 19°C, la TLIS observada fue de 23.3 °C y la calculada con el método de Spearman-Kärber fue 22.6 °C. En los organismos que permanecieron en 21, 23 y 25 °C, la TLIS calculada fue de 24.6, 25.8 y 26.6 °C y la observada fue de 25.3, 26.2 y 27.1 °C, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el modelo de Kilgour *et al.* (1985), el cual ha sido utilizado en diferentes especies de peces, para el caso de la sardina éste no aplica, debido a que los valores obtenidos a cero tasa de morticidad se encuentran dentro del intervalo de distribución de la especie y por lo tanto no pueden considerarse como temperaturas letales.

Para validar el método de Spearman-Kärber en el cálculo del valor de la temperatura letal, se considero la aseveración de Kilgour *et al.* (1985), quien menciona que la TLIS calculada puede diferir de la observada en un intervalo de 0.5 a 1 °C; de acuerdo con los resultados obtenidos, esto se cumple en todas las temperaturas de aclimatación, donde la diferencia térmica fue

menor a 1 °C. Con lo anterior podemos decir que el método de Spearman-Kärber puede ser utilizado para calcular la TLIS de la sardina.

En la sardina los valores de la TLIS para las dos últimas temperaturas de aclimatación (23 y 25 °C) difieren 0.8 y 0.9 °C, en otros estudios con diferentes especies se ha visto que en las últimas temperaturas de aclimatación los valores de TLIS son muy similares por lo que se podría decir que a partir de una temperatura de aclimatación, la TLIS se vuelve constante e independiente de la temperatura de aclimatación, tal como lo reporta Cherry *et al.* (1977) para *Notropis telescopus* aclimatada a 12, 15, 18, 21 y 24 °C. En esta especie mantenida a 21 y 24 °C, la TLIS fue de 27 °C; en *Micropterus dolomieu* aclimatada a 18, 21, 24, 27 y 30 °C, la TLIS fue de 33 °C a partir de los 24 °C. En *Hypentilium nigricans* bajo las mismas condiciones de aclimatación, la TLIS es igual a la de *M. dolomieu* (33 °C) a partir de los 21 °C. Hernández (1998), reporta que para *Poecilia sphenops* aclimatada a 20, 23, 26, 29, 32 y 35 °C el valor de la TLIS es de 37.9 a 38.9 °C y se vuelve constante a partir de la temperatura de aclimatación de 29 °C. Sin embargo, en el caso de la sardina, esta tendría que exponerse a temperaturas de aclimatación mayores a 25°C para comprobar lo anterior.

El valor térmico de la TLIS depende de la temperatura de aclimatación, así como de la historia térmica del organismo y, generalmente, el límite es consistente en organismos de la misma especie (Fry, 1947; Brett, 1956). Con base en esta aseveración, se podría suponer que en los organismos del mismo género y aclimatados en un intervalo de temperaturas similares, los valores de la TLIS estarían dentro de un mismo intervalo. Sin embargo, Tsuchida (1995), reportó para *Sardinops melanostictus* aclimatada a 20 y 26 °C una TLIS de 31.1 y 33.8 °C respectivamente; este valor difiere en 8.1 y 6.8 °C de los valores encontrados en este trabajo para las sardinias aclimatadas a 19 y 25 °C. En esta especie, las diferencias en los valores de la TLIS se pueden atribuir a que las condiciones de experimentación no fueron las mismas pues en este trabajo los organismos experimentaron un *shock* térmico al ser introducidos a la

temperatura de experimentación; en cambio, en *S. melanostictus* se interpreta que el incremento de temperatura gradual (5 °C/h), permitió al organismo una mayor tolerancia, y por lo tanto, permanecer más tiempo en esas condiciones hasta que se produjo la muerte.

Diversos autores han calculado los valores de la temperatura letal incipiente superior en varias especies aclimatadas en temperaturas de 12 hasta 35°C y expuestas al estrés térmico crónico. En *N. spilopterus*, *M. dolomieu* y *A. rupestris* se reportan valores de la TLIS de 27°C cuando son aclimatadas a 12 °C y en *Poecilia sphenops* aclimatada en un intervalo de 20 a 35°C, se observó que el valor de la TLIS incremento 1 °C (Anexo II).

La adaptación fisiológica a los cambios en la temperatura pueden ser a nivel de comportamiento, de la tasa metabólica, de la función neuromuscular y/o en las propiedades físicas de la membrana; en este último caso, la temperatura modifica la conformación de las cadenas acyl-fosfolípidos, lo que provoca cambios en la estructura y función de la membrana y por ende en las funciones de mantenimiento e integridad del cuerpo, al modificar las actividades las actividades esenciales de la célula. Los mecanismos de adaptación y aclimatación a la temperatura incluyen: 1) el refinamiento en la estructura primaria de las proteínas, las cuales aseguran la síntesis catalítica para que las características se conserven a través del intervalo biológico de temperaturas; 2) la modulación de la expresión genética, reflejada en modificaciones de la misma proteína o en la expresión preferencial de isoenzimas o aloenzimas adaptadas a diferentes temperaturas; 3) la regulación de la composición química y de las propiedades físicas de la membrana, como son la función y fluidez que se adecuan apropiadamente para el ambiente térmico que prevalece en ese momento; 4) un reconocimiento de la morfología del tejido y la célula; 5) los ajustes para la composición del ambiente intracelular y 6) los ajustes integrativos que aseguran la función fisiológica en temperaturas extremas (Evans, 1993). Podríamos suponer que en la sardina se dieron los ajustes antes

mencionados para satisfacer sus necesidades durante el proceso de aclimatación, pero cuando hablamos de su exposición a estrés crónico, en donde se encuentra fuera de su zona biocinética, la sardina no fue capaz de compensar esta situación.

Los estudios del efecto de la temperatura, también se han evaluado sobre el cultivo celular, sin embargo, se desconoce el daño producido en diferentes tejidos cuando este factor ocasiona estrés en el organismo. En los cortes de hígado de los peces aclimatados, no se observaron daños aparentes, sin embargo, en las sardinias de la temperatura de aclimatación de 25 °C observaron centros melanomacrófagos, así como modificación en el tamaño de núcleo. Heat (1990), menciona que cuando el pez está bajo estrés ambiental, este puede experimentar cambios internos que son perjudiciales o adaptativos, si estas alteraciones no son corregidas o compensadas, debilitan al organismo y pierde la capacidad para hacer frente a otros estresores. Razón por la cual suponemos que *Sardinops sagax*, durante el proceso de aclimatación, tuvo la capacidad de experimentar, enfrentar y compensar el cambio térmico al que fue aclimatada donde la sobrevivencia de 88.9 % se tuvo en la temperatura de 25°C, mientras que en el resto de las temperaturas, la sobrevivencia fue mayor al 95 %. La sobrevivencia no solo se puede atribuir a una compensación, sino a que las condiciones térmicas a la que se expusieron se encuentran en su intervalo de distribución.

En el riñón de los peces aclimatados, se observaron las estructuras que lo conforman sin alteración aparente, en cambio en las sardinias aclimatadas en el intervalo de 19 a 25 °C y expuestas al estrés agudo, se encontraron centros melanomacrófagos, modificaciones en el glomérulo y en los túbulos, así como picnosis. Ortiz *et al.* (2003), también observaron un tipo de muerte celular (necrosis) en tejido renal de *Mugil sp.*, *Cyprinus carpio* y *Barbas sp.*, pero debido a las descargas de lindano; a diferencia de *Paralabrax maculatofasciatus* que fue expuesta a estrés por cultivo a altas densidades y descenso en el nivel del agua, no se observó

necrosis y ninguna alteración histológica, sólo se describieron cambios en la coloración del riñón (Zacarias, 1997).

En los cortes de riñón, al igual que en las de hígado de las sardinas expuestas al estrés térmico crónico, las alteraciones observadas se hicieron más evidentes conforme aumentó la temperatura experimental. Además de identificar los daños observados en los organismos que fueron expuestos al estrés agudo (degeneración en túmulos renales, necrosis, apoptosis y pérdida de tejido hematopoyético), también se encontraron casos de picnosis, vacuolización y modificación en tamaño del núcleo. Estas alteraciones se han reportado en la anguila (Olivereau y Olivereau, 1977), *Oncorhynchus tshawytscha* (Kiryu y Moffitt *et al.*, 2001), *Chana punctatus* (Salam *et al.*, 2001) y *Mugil sp.*, *Cyprinus carpio* y *Barbas sp.* (Ortiz *et al.*, 2003) como resultado de cambios en la salinidad, insecticidas agrícolas y descargas de lindano. Hinton y Laurén (1990), mencionan que las lesiones en la parte anterior del riñón se consideran buenos indicadores de contaminación debido a que en esta región se sintetizan las catecolaminas adrenalina y noradrenalina que se liberan cuando el animal experimenta diversos tipos de estrés. En el presente trabajo las lesiones encontradas en la parte media del riñón de *Sardinops sagax*, también podrían utilizarse como un buen indicador de fluctuaciones o cambios de temperatura, ya que como se observó es una especie poco tolerante.

Anderson (1990), menciona que el estrés en un animal puede comprometer los mecanismos de defensa afectando así los procesos fisiológicos que conforman la respuesta inmune específica y no específica, incrementando la vulnerabilidad de los organismos. Sin embargo, los peces se protegen mediante barreras específicas y no específicas; dentro de las no específicas se encuentran los componentes del mucus.

Las respuestas externas observadas en los peces expuestos al estrés térmico agudo y crónico fueron la descamación y la producción de mucus (que de acuerdo a lo antes mencionado, se considera una barrera no específica). A nivel histológico se encontraron centros

melanomacrófagos, así como casos de necrosis y apoptosis. Los agregados de macrófagos se han sugerido como indicadores del estado de salud en los peces silvestres y pueden contener no sólo melanina sino también hemosiderina y lipofuscina (Hinton y Laurén, 1990). Dichos autores mencionan que estas agregaciones varían en número y tamaño conforme se incrementa el tiempo sin alimentarse, la toxicidad, la enfermedad y la edad, entre otros. En este trabajo se observó que en función de la temperatura de exposición las agregaciones de melanomacrófagos se hacían más evidentes, y de acuerdo con Hinton y Laurén (1990); se pudiera atribuir al tiempo que se tuvo al organismo sin alimentarse antes y durante los experimentos.

Muchos estudios han mostrado que los macrófagos de los peces son potentes células efectoras, capaces de matar bacterias y helmintos patógenos, también pueden secretar importantes mediadores solubles, incluyendo citoquinas y eicosanoides durante los procesos inflamatorios. Su actividad tanto efectora como accesoria, puede ser potencialmente modulada en los peces, con la capacidad de producir respuestas de protección contra enfermedades (Secombes, 1994).

Los casos de muerte celular encontrados en los tejidos de los organismos expuestos al estrés térmico agudo y crónico no se pueden considerar como una respuesta para eliminar las células que han sido dañadas, ya que a nivel celular la muerte es un prerequisite para la vida. Es importante, primeramente, para eliminar células no deseadas o no requeridas, lo que constituye además un buen mecanismo para precisar el número de células requeridas en una función en particular. Para las células que pierden la capacidad de experimentar apoptosis en respuesta a un estímulo fisiológico, la consecuencia puede ser perjudicial (Jacobson y Carthy, 2002), debido a que el mecanismo apoptótico es fundamental para el desarrollo normal de los tejidos de un organismo (Studzinski, 1999).

La necrosis producida en los tejidos de los organismos, es el estado en el cual las células disminuyen su actividad y eventualmente mueren. El núcleo sufre hiper cromatosis, picnosis, cariólisis y cariorrexis, y el citoplasma se vuelve homogéneo y se tiñe igual a eosina

(Takashima y Takashi, 1995). En este estado, el contenido celular es liberado dentro del fluido extracelular, y tiene un efecto irritante en las células cercanas, causando inflamación (Studzinski, 1999).

Otra de las repuestas encontradas en los tejidos hepático y renal de *Sardinops sagax* fue la presencia de fibroblastos que, de acuerdo con Takashima y Takashi (1995), es una característica de la respuesta inflamatoria, que se da como una reacción protectora a estímulos físicos, químicos y a parásitos que afectan fuertemente el tejido. Los autores también mencionan que durante la reacción protectora, los macrófagos, los histiocitos y los monocitos se incrementan en número en el sitio de la inflamación y se da la hiperplasia de fibroblastos.

La importancia de investigar la tolerancia térmica de una especie, no solo radica en conocer cual es la temperatura en la que mejor crece o se puede desarrollar, sino también en evaluar su capacidad adaptativa a los cambios térmicos, así como el efecto sobre sus funciones fisiológicas. Con los resultados obtenidos se destaca que la sardina es capaz de aclimatarse a una nueva condición térmica, siempre y cuando el cambio sea gradual. La respuesta más clara de una adaptación fisiológica se apreció en el proceso de aclimatación; sin embargo, cuando fue expuesta al estrés crónico, la especie no toleró un cambio mayor a 4 °C. Con el análisis de los cambios histológicos producidos en los tejidos hepático y renal de la sardina expuesta al estrés térmico agudo y crónico, y con base en el criterio de diversos autores en utilizar los daños en los tejidos como indicadores de contaminación, en la presente investigación se propone el uso de la histopatología como indicador para evaluar el efecto del estrés térmico.

## VII. CONCLUSIONES

- Las respuestas de estrés térmico de *Sardinops sagax* aclimatada a 19, 21, 23, y 25 °C fueron el nado de lado, el aumento de actividad, los espasmos musculares, el nado vertical y la pérdida del equilibrio.

- La respuesta que caracteriza a la temperatura crítica máxima de la sardina fue la pérdida de equilibrio y se observó en el intervalo térmico de 30.7 a 32.2 °C, el cual mostró un incremento en la resistencia del organismo conforme aumento la temperatura de aclimatación.
- La temperatura letal incipiente superior observada en la sardina fue de 23.3 °C en los organismos aclimatados a 19 °C, mientras que en los peces aclimatados a 21, 23 y 25 °C el valor de la TLIS fue de 25.3, 26.2 y 27.1 °C respectivamente.
- La temperatura letal incipiente superior calculada con el método de Spearman-Kärber fue de 22.6 °C en los organismos aclimatados a 19 °C mientras que para los peces aclimatados a 21, 23 y 25 °C el valor de la TLIS fue de 24.6, 25.8 y 26.6 °C respectivamente.
- En las sardinias aclimatadas a 19, 21 y 23 °C y no expuestas al estrés térmico agudo y crónico, se identificaron en el tejido hepático y renal las estructuras que conforman a cada uno de estos órganos y no se observaron alteraciones. En los peces aclimatados a 25 °C se observaron alteraciones en los tejidos hepático y renal debidas a la temperatura.
- El efecto del estrés térmico agudo en el tejido hepático de peces aclimatados a diferentes temperaturas ocasiono cambios en el tamaño del hepatocito y modificación en el tamaño de nucleolos; así como infiltración de células sanguíneas, pérdida del límite celular y necrosis.
- El efecto del estrés térmico agudo en el tejido renal ocasiono un incremento de centros melanomacrófagos, modificación en glomérulos y túbulos renales.
- El efecto del estrés térmico crónico en tejido hepático y renal fue similar al observado en organismos expuestos a TCMax, solo que en este caso el grado de alteración fue mayor en función del incremento de la temperatura experimental y del tiempo de exposición.
- Las alteraciones encontradas en tejido hepático por estrés térmico crónico fueron: vacuolización, modificación en tamaño de núcleo, picnosis, apoptosis, necrosis y focos de infección bacteriana. En el caso del tejido renal se observó necrosis tubular y glomerular,

picnosis, apoptosis, vacuolización, degeneración epitelial del túbulo y focos de infección bacteriana.

- Con los resultados obtenidos y habiendo utilizado la histología como herramienta para evaluar el efecto de la temperatura en la sardina, se plantea el uso de la histopatología como un indicador del efecto del estrés térmico agudo y crónico.

### VIII. RECOMENDACIONES

- Se sugiere evaluar el efecto de las temperaturas de aclimatación de 26 y 27 °C, para confirmar que estas condiciones constituyen la temperatura subletal y letal de la sardina.

- Con respecto a los experimentos de temperatura letal superior, se sugiere realizar las repeticiones que sean necesarias, para estimar la variabilidad de la respuesta bajo las mismas condiciones experimentales.

- En la parte histológica se sugiere cuantificar los daños tisulares, para validar los daños morfológicos observados en tejido hepático y renal.

- Se sugiere continuar con el análisis histológico de varios órganos con la finalidad del describir los daños producidos por el estrés térmico en la sardina.

## IX. LITERATURA CITADA

- Adams, S.M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. American Fisheries Society Symposium. 8:1-8 p.
- Ahlstrom, E. H. 1960. Synopsis on the pacific sardine *Sardinops caeruleus*. FAO Fish. Biol. Syn. No.17
- Alcocer, R.C. y J.R. Kelly. 1987. Variabilidad ambiental y su incidencia en aspectos fisiológicos de sardina (*Sardinops sagax*). Stock norte de Chile. Investigaciones Pesqueras (Chile) 34: 57-63 p.
- Álvarez, F. y J.L. Butler. 1992. First attempt to determine birthdates and environmental relationship of juvenile sardine, *Sardina pilchardus* (Walb.), in the region of Vigo (NW Spain) during 1988. Biol. Inst. Esp. Oceanogr. 8(1):115-121 p.
- Anderson, D.P. 1990. Immunological indicators: Effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. American Fisheries Society Symposium. 8: 38-50 p.
- Anthony, V.C. y M.J. Forgyarty. 1985. Environmental effects on recruitment, growth, and vulnerability of Atlantic Herring (*Clupea harengus harengus*) in the Gulf of Maine Region. Canadian Journal Fish Aquatic Science. 42: 158-173 p.
- Arthur, D.K. 1976. Food and feeding of larvae of three fishes occurring in the California current, *Sardinops sagax*, *Engraulis mordax* and *Trachurus symmetricus*. Fish. Bull. U. S. 74: 517-530 p.
- Becker, C.D. y R.G. Genoway. 1979. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. Environmental Biology of Fishes. 5(3):245-256 p.
- Beitinger, T.L., W.A. Bennett y R.W. McCauley. 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. Environmental Biology of Fishes. 58(3): 337-275 p.
- Benfey, T.J. L.E. McCabe y P. Ppin. 1997. Critical thermal maxima of diploid and triploid brook charr, *Salvelinus fontinalis*. Environmental Biology of Fishes 49(2): 259-264 p.
- Brett, J.R. 1956. Some principles in the thermal requirements of fishes. Quart. Rev. Biol. 31: 75-87 p.

- Bucher, F. y R. Hofer. 1993. Histological and enzyme histochemical changes in the kidney of male bullhead (*Cottus gobio*) during the spawning period. *Journal Fish Biology* 42: 403-409 p.
- Carline, R.F. y J.F. Machung. 2001. Critical thermal maxima of wild and domestic strains of trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 130:1211-1216 p.
- Cengiz, E.I., E. Ünlü. y K. Balci. 2001. The histopathological effects of THIODAN® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Journal of environmental science and health, part B: Pesticides, food contaminants, and agricultural*. 36(1):75-85 p.
- Cheetham, J.L., C.T. Garten, C.L. King y M.H. Smith. 1976. Temperature tolerance and Preference of immature channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *COPEIA* 3: 609-612 p
- Cherry, D.S., K.L. Dickson y J. Cairns. 1977. Preferred, avoided, and lethal temperatures of fish during rising temperature conditions. *Journal Fish Research Board Canadian*. 34: 239-246 p
- Cisneros, M.M.A., M.M.O. Neváres. y M.G. Hammann. 1995. The rise and fall of the Pacific sardine, *Sardinops sagax caeruleus* Girard, in the Gulf of California, México. *Cal. Coop. Oceanic Fish. Invest. Reports*. 36: 136-143 p.
- Comisión nacional de acuicultura y pesca. 2003. Anuario Estadístico de Pesca. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion.
- Cousin, J.C.B. y F.L. Baudin. 1987. Histological alterations observed in turbot, *Scophthalmus maximus* L., from days 15 to 40 after hatching. *Aquaculture* 67: 218-220 p.
- Cox, D.K. 1974. Effects of three heating rates on he critical thermal maximum of bluegill. En: *Thermal Ecology*. Edit. By Gibbons J.W. and Sharitz R.R. AEC Symposium Series Conf. 730505. 158-163 pp.
- Crawshaw, L.I. 1977. Physiological and behavioral reactions of fishes to temperature change. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 730-734 p.
- Culley, M. 1971. *The pilchard biology and exploitation*. Pergamon Press Limited, Oxford. 543pp.

- De Anda, M.J., J.C. Seijo y S. Martínez. 1994. Reclutamiento y variabilidad ambiental en la pesquería de sardina Monterrey (*Sardinops sagax*) del Golfo de California, México. Investigaciones Pesqueras. (Chile) 38: 23-36 p.
- Del Rio, O.B. 2004. Efecto del estrés térmico sobre los parámetros sanguíneos de la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) (Pices: Cichlidae). Tesis de Maestría. CICESE. 142 pp.
- Domitrovic, H.A. 2000. Histología e histopatología del riñón de *Cichlasoma dimerus* (Pices, Cichlidae). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste. 4p
- Doudoroff, P. 1942. The resistance and acclimatization of marine fishes to temperatura changes. I. Experiments with *Girella nigricans* (Ayres). Biology Bulletin. 83(2): 219-244 p
- Elliott, J.M. y J.A. Elliott. 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 p
- Estrada, F.E., Z.L. Peralta y M.P. Rivas. 1982. Manual de técnicas histológicas. AGT EDITOR, S.A. México. 140 pp.
- Evans, D.H. 1993. The physiology of fishes. Marine Science Series CRC. E.U.A. 592 pp.
- Farrell, A.P., A.K. Gamperl, J.M.T. Hicks, H.A. Shiels y K.E. Jain. 1996. Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit. Journal Experimental Biology. 199: 663-672 p.
- Fields, R.S. S. Lowe, C. Kaminski, G.S. Whitt y D.P. Philipp. 1987. Critical and chronic thermal maxima of Northern and Florida largemouth bass and their reciprocal F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> hybrids. Transactions of the American Fisheries Society. 116(2): 856-863 p.
- Fry, F.E.J., J.S. Hart y F.W. Walker. 1946. Lethal temperature relations for a sample of young speckled trout, *Salvelinus fontinalis*. Univ. Toronto Stud. Biol. Ser. 54: 1-35 p.
- Fry, F.E.J. 1947. Effects of the environment on animal activity. Univ. Toronto Biol. Serv. No. 55. Publ. Ont. Fish Res. Lab. 68. 1-62 p.

- Fry, F.E.J. 1964. Animals in aquatic environments: Fishes. En: Dill, B.D., E.F. Adolph y G.C. Wilber. Handbook of physiology. Amer. Physiol. Soc. Washington, D.C. 715-728 pp.
- Fry, F.E.J. 1967. Responses of vertebrate poikilotherms to temperature. En: Rose, A.H. Thermobiology. Academic Press. London. 375-406 p.
- Fry, F.E.J. 1971. Environmental relations and behavior. En: Hoar, W.S. y D.J. Randall. Fish physiology. Vol. VI. Academic Press. London. 1-87 p.
- Garside, E.T. 1973. Ultimate upper lethal temperature of atlantic salmon *Salmo salar*. Canadian Journal of Zoology. 51(8):898-900 p.
- Grahame, J. 1987. Plancton and fisheries. Edward Arnold Ltd. 102-111 pp.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo y R.V. Thurston. 1977. Trimmed SPEARMAN-KARBER METHOD for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environment Science Technological. 11(7): 714-719; Correction 12(4):417
- Hammann, M.G., T.R. Baumgartner y A. Bandan-Dangon. 1988. Coupling of the Pacific sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) life cycle with the Gulf of California pelagic environment. CalCOFI Vol. XXIX 102:108 p.
- Hand, C.H. y L. Berner. 1959. Food of the pacific sardine *Sardinops caerulea*. Fish Bulletin. 60 (164): 175-184 p.
- Hart, J.S. 1952. Geographic variations of some physiological and morphological characters in certain freshwater fish. Univ. Toronto Stud. Biol. Ser. 60: 1-79 p.
- Hart, J.L. 1973. Pacific fishes of Canada. Fisheries Research Board of Canada. 100-103 pp.
- Heath, A.G. 1990. Summary and Perspectivas. American Fisheries Society Symposium. 8:183-191 p.
- Hernández, M. 1998. Comportamiento termoregulador de *Poecilia sphenops* (Pisces: Poeciliidae) aclimatada a temperaturas constantes y fluctuantes. Tesis Doctoral. CICESE. 136 pp.

- Hickman, G.D. y M.R. Dewey. 1973. Notes on the upper lethal temperatura of the dusky stripe shiner, *Notropis pilsbryi*, and bluegill, *Lepomis macrochirus*. Transactions of the American Fisheries Society. 102:838-840
- Hill, W.R. 1980. Fisiología animal comparada. Reverte. España. 901 pp.
- Hinton, D.E. y D.J. Laurén. 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. American Fisheries Society Symposium. 8: 51-66 p.
- Hlohowskyj, I. y T.E. Wissing. 1985. Seasonal in the critical thermal maxima of fantail (*Etheostoma flabellare*), greeside (*Etheostoma blenniodes*), and rainbow (*Etheostoma caeruleum*) darters. Canadian Journal Zoology. 63: 1629-1633 p.
- Hochachka, P.W. y G.N. Somero. 1984. Biochemical adaptation. Pricenton University Press. New Jersey. E.U. 538 pp.
- Hofmann, N. y P. Fischer. 2002. Temperature preferences and critical thermal limits of burbot: implications for habitat selection and ontogenetic habitat shift (zoárcido). Transaction of the American Fisheries Society. 131:1164-1172 p.
- Huey, R.B. y A.F. Bennett. 1990. Physiological adjustments to flouctuating thermal Enviroments: An ecological and evolutionary perspective. En: Morimoto, R.A. Tissieses, C. Gorgopolus. Stress proteins in biology and medicine. Cold spring Harbor Laboratory Press. 37-59 p.
- Hunt, I.H. y K. Keating. 2003. Temperature-induced changes in viscosity and its effects on swimming speed in larval haddock. Proceedings of the 26<sup>th</sup> Annual Larval Fish Coference. 24-34 p.
- Jacobson, M.D. y Mc Carthy. 2002. Apoptosis the molecular biology of programmed cell death. University Press. Oxford. New York. 321 pp.
- Kenneth, B.D. y N.C. Parker. 1990. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. Aquaculture. 91: 349-358 p.

- Kilarski, W.M., M. Romex, M. Kozłowska y A. Gorlich. 1996. Short-term thermal acclimation induces adaptive changes in the inner mitochondrial membranes of fish skeletal muscle. *Journal of fish biology*. 49:1280-1290 p.
- Kilgour, D.M., R.W. McCauley y W. Kwain. 1985. Modeling the lethal effects of high temperatura on fish. *Canadian Journal Fish Aquatic Science*. 42: 947-951 p.
- Kiryu, Y. y C.M. Moffitt. 2001. Acute LD<sub>50</sub> and kidney histopathology following injection of erythromycin (Erythro-200) and its carrier in spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Journal of fish diseases*. 24:409-416 p.
- Lagler, K.F., J.E. Bardach, R.R. Miller y D.R. May Passino. 1984. *Ictiología*. AGT Editor S. A. México, D.F. 489 pp.
- Lasker, R. 1985. What limits Clupeoid Production? *Canadian Journal Fish Aquatic Science*. 42: 31-38 p.
- Lizárraga, C. 2002. Impacto del fenómeno El Niño en los ecosistemas marinos. *Natura* 10: 22-25 p.
- López-Martínez, J. 1991. Alimentación de juveniles y adultos de sardina Monterrey *Sardinops sagax caeruleus* (Girard), en el Norte de la Isla Tiburón durante el invierno de 1996. Tesis de Maestría. CICESE. 129 pp.
- López, I.C., V. Cubillos., S. Ernest., y C. Rosenfeld. 2001. Frecuencia y distribución, según edad y estacionalidad, de patologías hepáticas en salmonídeos, provenientes de la X<sup>a</sup> a XII<sup>a</sup> región de Chile, Período 1988-1998. *Arch.med.vet.* 33(2): 193-202 pp.
- Lutterschmidt, W.I. y V.H. Hutchinson. 1997. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal Zoology*. 75: 1553-1560 p.
- Llunch-Belda, D., S. Hernández-Vazquez, B.B. Lluch-Cota, C. Salinas-Zavala y R.A. Schwartzlose. 1992. The recovery of the California sardine as related to global change. *CalCOFI Rep.* 33: 50-59 p.
- Lowe, Ch.H. y V.J. Vance. 1955. Acclimation of the critical thermal maximum of the reptile *Urosaurus ornatus*. *Science* 122: 73-74 p.

- Lyle-Fritch, L.P. 1995. Fluctuaciones de la sardina crinuda (*Ophistonema sp.*) desembarcada en tres puertos del Pacífico Mexicano. 1973-1991. Tesis de Maestría. CICESE. 82 pp.
- Marty, G.D., M.S. Okihiro, E.D. Brown, D. Hanes y D.E. Hinton. 1998. Histopathology of adult Pacific herring in Prince William sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Canadian Journal Fish. Aquatic Science. 56: 419-426 p.
- Morales-Bojórquez, E., V.M. Gómez-Muñoz, R. Félix-Uraga y R.M. Alvarado-Castillo. 2003. Relation between recruitment, sea surface temperatura, and density-independent mortality of the Pacific sardine (*Sardinops caeruleus*) off the southwest coast of the Baja California Peninsula, Mexico. Science Marine. 67(1): 25-32 p.
- Nagahama, Y., H.A. Bern., B.A. Doneen y R.S. Nishioka. 1975. Euryhaline marine fish, *Gillichthys mirabilis*, in response to environmental salinity change. Development, Growth & Differentiation. 17: 367 p.
- Naidu, K.A., K.A. Nesa y R. Rammurthi. 1983. Histological alterations in liver and intestine of teleost *Sarotherodon mossambicus* in response to mercury toxicity. Ecotoxicol. Environ. Saf. 7(6): 566-575 p.
- Noga, E.J. 2000. Fish disease: Diagnosis and treatment. University Press. Iowa State. 276-277 p.
- Olivereau, M. y J. Olivereau. 1977. Effect of transfer to sea water and back to fresh water on the histological structure of the eel kidney. Journal of comparative physiology. B: Biochemical, systemic and environmental physiology. 115(2): 223-239 p.
- Olojo, E.A.A., K.B. Olurin, G. MBaka y A.D. Olowemimo. 2005. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. African Journal of biotechnology. 4(1): 117-122 p.
- Ortiz, J.B., M.L.C. Gonzalez y C. Sarasquete. 2003. Histopathological changes induced by lindane ( $\gamma$ -HCH) in various organs of fishes. Science Marine. 67(1): 53-61 p.
- Paladino F.V., J.R. Spotila, J.P. Schubauer y K.T. Kowalski. 1980. The critical thermal maximum: A technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fishes. Rev. Can. Biol. 39 (2): 115-122 p.
- Pinet, R.P. 1998. Invitation to oceanography. Jane and Bartlett Publishers, EUA, 508 pp.

- Pörtner, H.O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part.A* 132: 739-761 p.
- Prosser, C.L. y T. Nagai. 1986. Effects of low temperature on conditioning in goldfish. In: *The central nervous system and fish behaviour*. The University of Chicago Press, Chicago. 17-180 p.
- Prosser, C.L. y D.O. Nelson 1981. The role of nervous systems in temperature adaptation of poikilotherms. *Ann. Rev. Physiol.* 43: 281-300 p.
- Randovich, J. 1982. The collapse of the California sardine fishery. *CalCOFI Report*. 23: 56-78 p.
- Ream, R.A., J.A. Theriot y G.N. Somero. 2003. Influences of thermal acclimation and acute temperature change on the motility of epithelial wound-healing cells (keratocytes) of tropical, temperate and Antarctic fish. *Journal Experimental Biology*. 206: 4539-4551 p.
- Ribelin, W.E. y G. Migaki. 1975. *The pathology of fishes*. The University of Wisconsin Press. 995 pp
- Richardson, J., J.A.T. Boubée y D.W. West. 1994. Thermal tolerance and preference of some native New Zealand freshwater fish. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 28: 399-407 p.
- Rose. A.H. 1967. *Thermobiology*. Academic Press. New York. 621 pp.
- Salam, B.A., B. Nesa y Q. Nessa. 2001. Effects of sumithion on the histological changes of spotted murrel, *Channa punctatus* (Bloch). *Pakistan Journal of Biological Science*. 4(10): 1288-1290 p.
- Schweigert, J.F. 2002. COSEWIC status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada, in COSEWIC assessment and update status report on the Pacific *Sardinops sagax* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. 1-19 pp.
- Secombes, Ch.J. 1994. Macrophage activation in fish: Modulators of fish immune responses. Breckenridge series. USA Vol. 1: 49-57 p.

- Selong, J.H., T.E. McMahon, A.V. Zale y F.T. Barrows. 2001. Effect of temperature on growth and survival of bull trout, with application of an improved method for determining thermal tolerance in fishes. *Transactions of American Fisheries Society*. 130:1026-1037 p.
- Snieszko, S.F. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal Fish Biology*. 6: 197-208 p.
- Sokolov, V.A. y M. Wong. 1972. Informe científico de investigaciones sobre peces pelagico del Golfo de California (sardina crinuda y anchoveta) en 1970. Mexico/PNV/FAO. Informe Científico (1): 31 p.
- Spisni, E., M. Tugnoli., A. Ponticelli., T. Mordenti y V. Tomasi. 1998. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *Journal of fish diseases*. 21:177 p.
- Stehr, C.M., L.L. Johnson y M.S. Myers. 1998. Hydropic vacuolation in the liver of three species of fish from the U.S. west coast: lesion description and risk assessment associated with contaminant exposure. *Dis. Aquat. Organ.* 32(2) : 119-135 p.
- Studzinski, G.P. 1999. Apoptosis a practical approach. OXFORD. University Press. New York. 244 pp.
- Takashima, F. y H. Takashi. 1995. Fish histology: normal and pathological features. Kodansha Ltd. Tokyo. 195 pp.
- Titu, V. 2002. Temperatura as a modifier of fish cardiac contractility. Tesis. University of Joensuu. 22 pp.
- Torres, V.J., R.M. Reinecke y S.R. Rodríguez. 1986. Ciclo reproductor de *Sardinops sagax* (sardina Monterrey), en el Golfo de California. *Inv. Mar. CICIMAR*. 1 (3): 52-68 p.
- Tricklebank, K.A. 2000. Effects of organochlorines on the ultrastructure of the liver of the damselfish *Parma microlepis* from reefs in New South Wales, Australia. *Marine biology*. 136(2): 337-348 p.
- Triebkorn, R., H.R. Köhler., W. Honnen., M. Schramm., S.M. Adams y E.F. Müller. 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field?. *Journal of aquatic ecosystem stress and recovery*. 6(1): 53-73 p.

- Tsuchida, S. 1995. The relationship between upper temperature tolerance and final preferendum of Japanese marine fish. *Journal Thermobiology*. 20 (1/2): 35-45 p.
- Van der Lingen, C.D. 1998. Nitrogen excretion and absorption efficiencies of sardine *Sardinops sagax* fed phytoplankton and zooplankton diets. *Marine Ecology Progress Service*. 175: 67-76 p.
- Van der Lingen, C.D. 1995. Respiration rate of adult pilchard *Sardinops sagax* in relation to temperatura, voluntary swimming speed and feeding behavior. *Marine Ecology Progress Service*. 129: 41-54 p.
- Van der Lingen, C.D. 1994. Effect of particle size and concentration on the feeding behavior of adult pilchard *Sardinops sagax*. *Marine Ecology Progress Service*. 109: 1-13 p.
- Vaschenko, M.A., I.G. Syasina., V.B. Durkina y P.M. Zhandan. 2003. Contamination of sediments and histological alterations in Barfin Plaice, *Pleuronectes pinnifasciatus* from Amursky Bay. *Ocean and Polar Research*. 25 (1): 31-40 p.
- Wahli, T., R. Knuesel., D. Bernet., H. Segner., D. Pugovkin., P. Burkhardt-Holm., M. Escher y H. Schmidt-Posthaus. 2002. Proliferative kidney disease in Switzerland: curret state of knoledge. *Journal of fish diseases*. 25:491-500 p.
- Wolf, P. 1992. Management of the recovery of the Pacific sardine and the recent California fishery. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* 33 p.
- Woods, H.A., W. Makino, J.B. Cotner, S.E. Hobbie, J.F. Harrison, K. Acharya y J.J. Elser. 2003. Temperature and the chemical composition of poikilothermic organisms. *Ecology Science*. 17: 237-245 p.
- Zacarias, S.M.R. 1997. Histología del estomago, corazón, hígado y riñón de *Palabrax maculatofasciatus* (Steinacher, 1968) y sus modificaciones ante situaciones de estrés crónico. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Área interdisciplinaria de ciencias del mar. 74 pp.
- Zar H.J. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall International. New Jersey. 718 pp.

Anexo I. Temperatura crítica máxima de diferentes especies de peces aclimatados a distintas temperaturas.

Especie	Temperatura de Aclimatación ( °C)	TCMax ( °C)	Autor
<i>Ictalurus Punctatus</i>	12.0	34.5	Cheetham <i>et al.</i> (1976)
	16.0	34.3	
	20.0	35.8	
	24.0	37.8	
	28.0	39.2	
	32.0	41.0	
<i>Salomo trutta</i>	15	29.6	Elliott y Elliott (1995)
	20	29.5	
	30	41.6	
<i>Salmo salar</i>	15	32.6	Elliott y Elliott (1995)
	20	32.6	
<i>Sebastes schlegeli</i>	15	31.2	Tsuchida, (1995)
	20	32.6	
	25	34.0	
	28	34.6	
<i>Clupea pallasii</i>	10	25.7	Tsuchida, (1995)
	14	26.6	
	17	27.7	
	20	29.0	
<i>Trachurus japonicus</i>	17	32.0	Tsuchida, (1995)
	20	33.8	

## Anexo I. (Continuación)

<i>Sardinops</i>	12	28.9	Tsuchida (1995)
<i>melanostictus</i>			
	15	29.0	
	20	30.9	
	26	33.6	
	28	33.7	
<i>Engraulis japonica</i>	15	31.7	Tsuchida (1995)
	20	32.6	
	25	33.9	
	28	34.7	
<i>Oncorhynchus keta</i>	10	27.1	Tsuchida (1995)
	15	28.2	
	18	29.1	
	20	29.6	
<i>Pseudocaranx</i>	15	30.8	Tsuchida (1995)
<i>dentex</i>			
	20	32.6	
	23	33.9	
	26	35.2	
	29	36.1	
<i>Seriola</i>	15	32.0	Tsuchida (1995)
<i>quinqueradiata</i>			
	20	33.6	
	23	34.6	
	25	35.8	
	28	36.6	
	15	32.1	Tsuchida (1995)

## Anexo I. (Continuación)

<i>Lateolabrax</i>	20	35.6	
<i>japonicus</i>			
	23	36.7	
	26	38	
	29	39.1	
<i>Parapristipoma</i>	15	30.3	Tsuchida (1995)
<i>trilineatum</i>			
	20	32.7	
	23	33.5	
	26	35.5	
	29	37.2	
<i>Acantopagnus</i>	15	33.9	Tsuchida (1995)
<i>schlegeli</i>			
	20	34.7	
	23	36.1	
	26	38.2	
	29	39.3	
<i>Pagrus major</i>	14	28.5	Tsuchida (1995)
	20	31.0	
	23	33.2	
	25	34.2	
	28	35.7	
<i>Oplegnathus</i>	15	33.3	Tsuchida (1995)
<i>fasciatus</i>			
	20	34.9	
	25	37.1	

## Anexo I. (Continuación)

	28	38.1	
<i>Sigallo japonica</i>	15	31.4	Tsuchida (1995)
	20	34.4	
	25	36.5	
	28	37.4	
<i>Salvelinus fontinalis</i>	*	28.8 ♀ 28.3 ♂	Benfey <i>et al.</i> (1997)
<i>Poecilia sphenops</i>	20	38.8	Hernández (1998)
	23	39.8	
	26	41.2	
	29	42.0	
	32	43.0	
	35	43.0	
<i>Lota lota</i>	19.6	25.1	Hofmann y Fischer (2002)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	24	41.6	Del Río (2004)
	28	42.0	
	32	43.3	
<i>Sardinops sagax</i>	19	30.8	En este trabajo
	21	31.6	
	23	31.8	
	25	32.8	

\*Organismos silvestres.

Anexo II. Temperatura letal de diferentes especies de peces aclimatados a distintas temperaturas.

Espece	Temperatura de Aclimatación (C)	Temperatura Letal	Autor
<i>Salmo salar</i>	27.5	27.8	Garside (1973)
<i>Lepomis macrochirus</i>	21.3	35.5	Hickman y Dewey (1973)
<i>Netropis pilsbryi</i>	21.5	32.2	Hickman y Dewey (1973)
<i>C. anomalum</i>	12	21	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	24	
	18	24	
	21	27	
	24	30	
	27	33	
<i>P. promelas</i>	12	9	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	12	
	18	15	
	21	18	
	24	21	
	27	21	
	30	21	
<i>P. nonatus</i>	12	21	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	24	
	18	27	
	21	27	
	24	27	
	27	30	
<i>N. rubellus</i>	12	21	Cherry <i>et al.</i> (1977)

## Anexo II. (Continuación)

---

	15	24	
	18	21	
	21	27	
	24	27	
	27	33	
	30	33	
<i>N. spilopterus</i>	12	27	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	24	
	18	27	
	21	27	
	24	30	
	27	33	
	30	36	
	33	36	
<i>N. telescopus</i>	12	18	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	21	
	18	24	
	21	27	
	24	27	
<i>L. macrochirus</i>	12	24	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	27	
	18	30	
	21	30	
	24	33	
	27	36	
	30	36	
	33	39	

---

## Anexo II. (Continuación)

<i>M. dolomieu</i>	12	27	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	30	
	18	33	
	21	33	
	24	33	
<i>M. punctalatus</i>	12	33	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	30	
	18	33	
	21	33	
	24	36	
	27	39	
<i>A. rupestris</i>	12	27	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	27	
	18	30	
	21	33	
	24	33	
	27	36	
<i>H. nigricans</i>	12	27	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	30	
	18	33	
	21	33	
	24	33	
<i>P. flavescens</i>	12	21	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	27	
	18	27	

## Anexo II. (Continuación)

<i>S. gairdneri</i>	12	18	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	21	
	18	21	
	21	27	
<i>S. truta</i>	12	15	
	15	18	
	18	21	
	21	24	
<i>Salvelinus fontinalis</i>	12	15	Cherry <i>et al.</i> (1977)
	15	18	
	18	21	
	21	24	
	11	24.4	Sholdice (en Kilgour <i>et al.</i> 1985)
	14	24.2	Kilgour <i>et al.</i> (1985)
	24	25.5	Fry <i>et al.</i> (1946)
	20	25.2	
<i>Rhinichthys atratulus</i>	20	29.7	Hart (1952)
<i>Semotilus atromaculatus</i>	25	30.5	Hart (1952)
<i>Notropis atherionoides</i>	25	31.4	Hart (1952)

## Anexo II. (Continuación)

<i>Hybognathus notatus</i>	20	32.3	Hart (1952)
<i>Perca flavescens</i>	25	30.1	Hart (1952)
<i>Poecilia sphenops</i>	20	37.9	Hernández (1998)
	23	38.2	
	26	38.9	
	29	38.3	
	32	38.3	
	35	38.9	
<i>Salvelinus confluentus</i>	8-28	20.9	Selong <i>et al.</i> (2001)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	24	37.0	Del Río (2004)
	28	37.8	
	32	38.8	
<i>Sardinops sagax</i>	19	22.6	En este trabajo
	21	24.6	
	23	25.8	
	25	25.6	