

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**VARIABILIDAD DE PERFILES DE ÁCIDOS
GRASOS DE BALLENA AZUL, *Balaenoptera
musculus*, EN EL GOLFO DE CALIFORNIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA:

BIÓL. MARISOL RUEDA FLORES

La Paz, B.C.S., México

Agosto de 2007



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 10:00 horas del día 3 del mes de Julio del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

“VARIABILIDAD DE PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS DE BALLENA AZUL,
Balaenoptera musculus, EN EL GOLFO DE CALIFORNIA”

Presentada por el alumno:

RUEDA
Apellido paterno

FLORES
materno

MARISOL
nombre(s)

Con registro:

A	0	5	0	1	1	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

Sergio Aguiniga

DR. SERGIO AGUÍNIGA GARCÍA

PRESIDENTE

Víctor Manuel Gómez Muñoz

DR. VÍCTOR MANUEL GÓMEZ MUÑOZ

SECRETARIO

Christine Johanna Band Schmidt

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

SEGUNDO VOCAL

Diane Gendron Lanier

DRA. DIANE GÉNDRON LANIEL
2º Director

TERCER VOCAL

Jorge Arturo del Ángel Rodríguez

MC. JORGE ARTURO DEL ÁNGEL RODRÍGUEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Rafael Cervantes Duarte

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



L. P. N.
CICIMAR
DIRECCION



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 15 del mes Agosto del año 2007, el (la) que suscribe MARISOL RUEDA FLORES alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A050116 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. SERGIO AGUÍÑIGA GARCÍA Y DRA. DIANE GENDRON LANIEL y cede los derechos del trabajo titulado: "VARIABILIDAD DE PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS DE BALLENA AZUL, *Balaenoptera musculus*, EN EL GOLFO DE CALIFORNIA" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mer_et_soleil15@yahoo.com.mx mruedaf@ipn.mx
dgendron@ipn.mx saguini@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MARISOL RUEDA FLORES

nombre y firma

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) por permitirme realizar este posgrado en su institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Sergio Aguíñiga García por su dirección y apoyo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Diane Gendron por haberme permitido formar parte de su gran equipo de trabajo y dirigir esta tesis.

Al M.C. Jorge del Ángel Rodríguez por sus valiosas e importantes aportaciones para la realización del trabajo.

Al Dr. Victor Gómez Muñoz por su colaboración en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Christine Johanna Band Schmidt por su apreciable asesoría para la mejora de este trabajo.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme emplear sus instalaciones para la realización del trabajo de laboratorio.

A la M.C. Laura Carreón Palau por su increíble paciencia y apoyo en el trabajo de laboratorio y su invaluable supervisión en el mismo.

A la M.C. Ma. del Carmen Rodríguez Jaramillo por asesorarme en la parte de histología de esta tesis.

Al M.C. Francisco Hernández por permitirme emplear su equipo de liofilización.

Al Laboratorio de Ecología de Mamíferos Marinos en especial a: Raúl Díaz Gamboa por su asesoría y enseñanzas al inicio de mi maestría, Christian Ortega Ortiz y Manolo Álvarez Torres por formar un excelente equipo de trabajo en el campo y brindarme su amistad; a Azucena Ugalde de la Cruz por su apoyo en la identificación de las ballenas azules y el manejo de la base de datos, y a Norma Flores Lozano por su colaboración en la elaboración de la curva de calibración.

Al Lic. Humberto Ceseña por su enorme paciencia y esa gran amabilidad que lo caracteriza en todo momento.

A los capitanes y técnicos Ciro Arista de la Rosa, Manuel Antonio Zamarrón Núñez, y Javier Álvarez Espinoza por su apoyo en el trabajo de campo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Martha O. Flores Escobar y Juan Manuel Rueda Castro por su amor incondicional, apoyarme en esta nueva aventura y permitirme realizarla con éxito.

A mi hermano Manuel Rueda Flores por siempre estar tan cerca de mí y brindarme grandes palabras de aliento.

A mi abuela Genoveva Escobar Alemany porque siempre estuvo pendiente de mí y mis logros.

A mi amigo y novio, Raúl Díaz Gamboa por tantos años de invaluable amistad, su paciencia, apoyo, enseñanzas y sobre todo por su gran amor que lo mueve todo.

A mis amigos de Cuernavaca que a pesar de la distancia nada nos separa, gracias por estar siempre presentes en especial Mónica, Nora, Adriana y Tony.

A mi prima Eglé Flores por compartir conmigo los peores y mejores momentos.

A todas aquéllas personas en La Paz que me brindaron su amistad, por compartir momentos y experiencias increíbles durante estos años que siempre guardaré en mis recuerdos: Agnès, Laura, Fernando, Luis, Paco, Mony, Christian, Mauricio, Chava, Felipe, Deni, Rodrigo y Karen.

A los que estuvieron, están y estarán siempre presentes...

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE ANEXOS.....	IV
GLOSARIO.....	V
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
III. JUSTIFICACIÓN.....	10
IV. OBJETIVOS.....	11
V. ÁREA DE ESTUDIO.....	12
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
VI.1. Trabajo de campo.....	14
VI.2. Histología.....	15
VI.3. Ácidos grasos.....	17
VI.4. Análisis estadísticos.....	24
VII. RESULTADOS	
VII.1. Histología de las biopsias.....	26
VII.2. Lípidos totales.....	28
VII.3. Ácidos grasos estructurales (polares).....	30
VII.4. Ácidos grasos de reserva (neutros).....	37
VII.5. Relación entre depredador y presa.....	44
VIII. DISCUSIÓN	
VIII.1. Clases lipídicas.....	46
VIII.2. Lípidos totales.....	47
VIII.3. Ácidos grasos estructurales (polares).....	49
VIII.4. Ácidos grasos de reserva (neutros).....	51
VIII.5. Relación depredador-presa.....	54
IX. CONCLUSIONES.....	58
X. RECOMENDACIONES.....	59
XI. LITERATURA CITADA.....	60
XII. ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Resultado de las técnicas empleadas para las pruebas de extracción de lípidos totales. Promedio de los porcentajes de extracción obtenidos \pm desviación estándar.	18
Tabla II. Clasificación de individuos de ballena azul por categoría por mes y año de muestreo.	25
Tabla III. Porcentaje de triglicéridos y fosfolípidos encontrando en las biopsias seleccionadas de ballenas azules.	27
Tabla IV. Concentración de los ácidos grasos estructurales divididos en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. La concentración se muestra en porcentaje promedio \pm el intervalo de confianza al 95%.	30
Tabla V. Porcentaje de clasificación por categoría de ballenas azules basado en los perfiles de ácidos grasos estructurales.	35
Tabla VI. Concentración de los ácidos grasos de reserva divididos en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. La concentración se muestra en porcentaje promedio \pm el intervalo de confianza al 95%.	37
Tabla VII. Porcentaje de clasificación por categorías de ballenas azules basado en los perfiles de ácidos grasos de reserva.	42
Tabla VIII. Correlación canónica entre categorías de ballena azul y estadios de eufáusidos. (R Canónica = 0.912. $Ji^2(20) = 145.73$, $p < 0.05$).	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fotografía de un corte de grasa de <i>B. borealis</i> donde se observan distintas capas (Modificado de Ackman <i>et al.</i> (1975b)): epidermis (E), capa externa (A), capa elástica (EL), capa interna (B), tejido no graso (C), músculo (M).	7
Figura 2. Golfo de California.	12
Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología empleada para ácidos grasos de ballena azul.	23
Figura 4. Ubicación de las muestras de ballenas azules a lo largo del Golfo de California.	26
Figura 5. Corte histológico de una biopsia de ballena azul. Los triglicéridos se notan como gotas lipídicas negras y los fosfolípidos se observan como gotas lipídicas grisáceas.	27
Figura 6. Comparación del porcentaje de lípidos totales (%LT) en grasa subcutánea de las diferentes categorías de ballena azul, agrupando los 3 años de muestreo.	28
Figura 7. Frecuencias del porcentaje de lípidos totales en biopsias de grasa subcutánea de ballena azul.	29
Figura 8. Análisis de componentes principales (ACP) en ácidos grasos estructurales de grasa subcutánea de las cuatro categorías de ballena azul (C: cría, HL: hembra lactante, H: hembra, M: macho).	32
Figura 9. Proyección de las variables en un plano bidimensional. Los ácidos grasos estructurales en negritas son los que contribuyen en una mayor proporción a la separación de grupos.	33
Figura 10. Análisis de funciones discriminantes (AFD) mostrando la separación entre crías, hembras lactantes y el resto de los individuos de ballena azul dada por los perfiles de ácidos grasos estructurales.	34
Figura 11. Proyección de los ácidos grasos estructurales en un plano bidimensional.	34
Figura 12. Concentración del ácido graso 19:0 (a) y 20:1n-9 (b) entre categorías de ballena azul.	36
Figura 13. Análisis de componentes principales (ACP) en ácidos grasos de reserva de grasa subcutánea de las cuatro categorías de ballena azul (C: cría, HL: hembra lactante, H: hembra, M: macho).	39
Figura 14. Proyección de las variables en un plano bidimensional. Los ácidos grasos de reserva en negritas son los que contribuyen en una mayor proporción a la separación de grupos.	40

Figura 15. Análisis de funciones discriminantes (AFD) mostrando la separación entre crías, hembras lactantes y el resto de los individuos de ballena azul dada por los perfiles de ácidos grasos de reserva.	41
Figura 16. Proyección de los ácidos grasos de reserva en un plano bidimensional.	41
Figura 17. Concentración del 16:1n-7 (a), 18:1n-9 (b), 18:2n-6 (c), 18:3n-6 (d), 20:3n-6 (e), 22:4n-6 (f), 20:5n-3 (g) y 22:1n-11 (h) entre categorías de ballena azul.	43
Figura 18. Perfiles de ácidos grasos de reserva <i>Nyctiphanes simplex</i> (N.s.) y <i>Balaenoptera musculus</i> (B.m.).	45
Figura 19. Análisis de componentes principales (ACP) en ácidos grasos de reserva de grasa subcutánea de crías y hembras lactantes de ballena azul.	52
Figura 20. Proyección de las variables en un plano bidimensional. Los ácidos grasos de reserva en negritas son los que contribuyen en una mayor proporción a la separación de crías y hembras lactantes.	52

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Historial de avistamiento de los individuos de ballena azul con biopsias para este estudio (C = cría; HL = hembra lactante; H = hembra; M = macho).	65
Anexo 2. Lista de ácidos grasos de reserva reportados para <i>Nyctiphanes simplex</i> . Concentración promedio (%) ± el intervalo de confianza al 95%.	67

GLOSARIO

Ácido graso: ácidos orgánicos saturados o insaturados con un radical carboxilo en un extremo, generalmente con una cadena de carbonos de número par, aunque también se encuentran ácidos grasos con cadena de carbonos de número impar, y sin presentar ramificaciones. Son los componentes mayoritarios de los lípidos.

Ácido graso de cadena corta: ácido graso que presenta una longitud de cadena de 4 a 6 átomos de carbono.

Ácido graso de cadena larga: ácido graso que presenta una longitud de cadena de 12 o más átomos de carbono.

Ácido graso esencial: son aquéllos ácidos grasos que no pueden ser biosintetizados por los animales, siendo el alimento su única fuente de obtención.

Ácido graso monoinsaturado: ácido graso que tiene una sola doble ligadura.

Ácido graso poliinsaturado: ácido graso que tiene dos o más dobles ligaduras.

Ácido graso saturado: ácido graso que no posee dobles ligaduras, ya que cada átomo de carbono está unido a otro por un enlace sencillo.

BHT: butil hidroxitolueno empleado para prevenir la oxidación de los ácidos grasos.

Biopsia: muestra de tejido de un ser vivo; en este trabajo se referirá a una muestra de grasa subcutánea obtenida de una ballena azul.

DHA: este ácido graso (22:6n-3) es un componente importante de los lípidos de la membrana de la mayoría de los tejidos en animales especialmente en los lípidos del cerebro y la retina de los ojos. Su presencia en la leche es importante para el desarrollo del cerebro de las crías.

EPA: este ácido graso (20:5n-3) se encuentra en bajas cantidades en los fosfolípidos de los animales y es un componente mayoritario en las algas marinas y aceites de pescados. Es un precursor de algunos eicosanoides.

Fosfolípido: componente mayoritario de los lípidos estructurales que está compuesto por dos ácidos grasos y un grupo fosfato unidos a un glicerol.

Hembra lactante: hembra madura con edad mínima de 5 años, que bajo observación directa en el campo acompaña a una cría.

Lípidos: son los ácidos grasos y sus derivados, así como sustancias relacionadas a estos compuestos de manera biosintética o funcional.

Lípidos de reserva: son aquéllos lípidos que forman la principal reserva energética de los animales.

Lípidos estructurales: son aquellos lípidos que forman las bicapas lipídicas de las membranas celulares.

n-3: también llamados ω -3 (omega-3) debido a que presentan un doble enlace en el tercer carbono contando a partir del extremo metilo. Son los ácidos grasos derivados a partir del ácido α -linolénico por medio de elongación de la cadena o desaturación e incluye ácidos grasos como el EPA y DHA.

n-6: también llamados ω -6 (omega-6) debido a que presentan un doble enlace en el sexto carbono contando a partir del extremo metilo. Son los ácidos grasos derivados a partir del ácido linoléico por medio de elongación de la cadena o desaturación e incluye al ácido graso araquidónico.

Stock: término utilizado para referirse a entidades biológicas o de manejo. Un stock de manejo se define como un grupo de individuos de la misma especie que son manejados por separado. Un stock biológico se caracteriza por presentar poco o nulo intercambio genético con otros individuos pertenecientes a un stock distinto, es decir que tienden a reproducirse entre miembros de un mismo stock.

Triglicérido: componente mayoritario de los lípidos de reserva formado por tres cadenas de ácidos grasos unidas a un glicerol mediante el grupo carboxilo.

RESUMEN

Las ballenas azules de la población del Pacífico Noreste migran hacia el Golfo de California durante invierno y primavera. Esta zona es la única área de crianza conocida de la población del Pacífico Noreste, donde encontramos hembras lactantes con sus crías, así como hembras y machos jóvenes y adultos. También en esta zona, estas ballenas continúan alimentándose del eufáusido más abundante en el área, *Nyctiphanes simplex*, el cual constituye su presa principal. Estudios previos de perfiles de ácidos grasos han permitido inferir sobre la dieta, y/o diferenciar entre poblaciones o zonas de distribución de algunos mamíferos marinos. En el presente estudio, a partir de la grasa subcutánea de ballenas azules biopsiadas en el Golfo de California se prueba la hipótesis de que los perfiles de ácidos grasos de lípidos de reserva se encuentran más asociados a la fuente alimenticia, mientras que los ácidos grasos de los lípidos estructurales se asocian con diferencias a nivel de membrana celular. Con base a 50 biopsias de ballenas azules incluyendo crías, hembras lactantes, hembras y machos tomadas entre 2003 y 2005 se determinaron los perfiles de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplado a un detector selectivo de masas (GC-MS). Un análisis histológico de la grasa mostró que los triglicéridos (70%) y los fosfolípidos (30%) están embebidos en la biopsia, sin encontrar indicios de estratificación, lo que confirmó el uso de las biopsias para la obtención de ácidos grasos de reserva y estructurales. Se identificaron y cuantificaron 34 ácidos grasos estructurales, de los cuales 30 presentaron concentraciones mayores a 0.1% y 11 presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre crías, hembras lactantes, hembras y machos. Se obtuvieron porcentajes de clasificación del 100% para crías y hembras lactantes, mientras que para hembras y machos los porcentajes fueron menores (94% y 78% respectivamente), probablemente debido a individuos inmaduros o viejos. Por otro lado, se identificaron y cuantificaron 52 ácidos grasos de reserva de los cuales 39 presentaron concentraciones mayores a 0.1% y 22 presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las categorías. Los ácidos grasos de reserva mostraron una clara separación entre crías, hembras lactantes, hembras y machos. Los porcentajes de clasificación para todas las categorías fueron del 100% mostrando que esta clase de ácidos grasos es un excelente indicador de sexo, estado de lactancia y crías. Algunos de los ácidos grasos importantes en la separación de las categorías fueron dominantes, esenciales, o con alguna importancia biológica como el 16:1n-7, 20:5n-3 y 22:1n-11. Los perfiles de ácidos grasos de reserva de todas las categorías de ballenas azules fueron comparados con los de las categorías de *Nyctiphanes simplex* (juveniles indiferenciados, hembras juveniles, hembras gastadas, machos juveniles y machos adultos) resultando en una alta correlación entre las ballenas azules y los eufáusidos (R Canónica = 0.912. $J_i^2(20) = 145.73$, $p < 0.05$). Así se concluye que los perfiles de ácidos grasos de reserva y estructurales varían en función de las categorías y el sexo. Las condiciones fisiológicas, como la lactancia en hembras lactantes, y el metabolismo propio de cada categoría, son factores determinantes en la diferenciación de grupos de ballenas azules cuando se emplean perfiles de ácidos grasos.

ABSTRACT

Blue whales from the Northeast Pacific population migrate to the Gulf of California during winter and spring. This area is the only known nursing ground of the Northeast Pacific population, where nursing females-calves pairs, young, adults females and males individuals occur. In this zone, the whales continue to feed on the most abundant euphausiid in the area, *Nyctiphanes simplex*, which constitutes its principal prey. Previous work based upon fatty acid profiles have led to inferences about the diet, and/or differentiate between populations or distributional areas of some marine mammals. In this study, using the dart biopsies of the subcutaneous blubber of Gulf of California blue whales, it is proved the hypothesis that the fatty acid profiles of storage lipids are more associated to the nutritional source, while those of structural lipids are associated with differences in cellular membranes. Based upon 50 biopsies of blue whales including calves, lactating females, females and males taken between 2003 and 2005 the fatty acids profiles were determined using a gas chromatography coupled to a selective detector of masses (GC-MS). Histological analysis of the blubber showed that the triglycerides (70%), and phospholipids (30%) are embedded throughout the biopsy, with no evidence of stratification, which confirmed that biopsies can be used for obtaining both storage and structural fatty acids. There were 34 structural fatty acids identified and quantified, 30 of them occurred at concentrations higher than 0.1% and 11 revealed significant differences ($p < 0.05$) between calves, lactating females, females and males. The use of the structural fatty acids allowed for the classification of 100% of the calves and lactating females, but only 94% and 78% of the remaining females and males, respectively, probably because of the inclusion of immature and old individuals. As for the storage fatty acids, there were 52 fatty acids identified and quantified, 39 of them at concentrations higher than 0.1% and 22 presented significant differences ($p < 0.05$) between categories. The storage fatty acids showed a clear separation between calves, lactating females, females and males. The classification percentages for all the categories were of 100% showing that these fatty acids class is an excellent indicator of sex, lactating state and calves. Some of the fatty acids important for distinguishing categories were dominant, essential, or with a biological importance such as 16:1n-7, 20:5n-3 and 22:1n-11. The storage fatty acid profiles of all the categories of blue whales were compared to the storage fatty acids of *Nyctiphanes simplex* (undifferentiated juveniles, female juveniles, spent females, male juveniles and male adults) resulting in a high correlation between all categories of blue whales and the euphausiids ($R \text{ Canónica} = 0.912$. $J_i^2(20) = 145.73$, $p < 0.05$). This study leads to the conclusion that the storage and structural fatty acid profiles of blue whales vary as a function of category and sex. Physiological conditions, such as lactation in the case of nursing females, and the particular metabolism of each category, are determinant factors in the differentiation of blue whale groups based upon fatty acid profiles.

I. INTRODUCCIÓN

Las ballenas azules tienen una amplia distribución en el Pacífico Norte. Se sabe que una parte de esta población se encuentra fuera de la costa de California (Calambokidis *et al.*, 1990) donde se alimentan de los eufáusidos *Euphausia pacifica* y *Thysanoessa spinifera* durante el verano (Fiedler *et al.*, 1998). Durante esta temporada, su distribución es amplia y abarca incluso el área fuera de la costa occidental de Baja California y las aguas del Domo de Costa Rica (Reilly y Thayer, 1990). Durante el invierno y la primavera, un grupo de ballenas azules migran al Golfo de California donde crían a sus ballenatos y siguen alimentándose (Gendron, 2002).

El Golfo de California es la única área de crianza de ballena azul conocida del Pacífico Noreste y donde se encuentran hembras lactantes con sus crías, jóvenes y adultos, tanto machos como hembras (Gendron, 2002). En esta zona se alimentan principalmente del eufáusido dominante *Nyctiphanes simplex* (Del Ángel-Rodríguez, 1997; Mejía-Acosta, 2003). Por otra parte, se ha demostrado que algunas ballenas azules avistadas fuera de California durante el verano migran en el área del Domo de Costa Rica en invierno (Mate *et al.*, 1999) donde probablemente también se alimentan (Reilly y Thayer, 1990). Por lo que esta especie presenta un rango latitudinal de alimentación muy amplio para un misticeto.

Precisamente dentro del Golfo de California se ha observado que las hembras con cría prefieren zonas más costeras (Gendron, 2002) donde aparentemente se alimentan de eufáusidos más grandes (Mejía-Acosta, 2003). Durante la migración, las hembras lactantes tienen diferentes requerimientos fisiológicos al resto de las ballenas ya que además de la migración, requieren de energía para amamantar a sus crías. Se sabe que las crías de ciertos pinnípedos se alimentan de la leche de las madres que contiene nutrientes y ácidos grasos que se movilizan de la grasa de la madre hacia la leche (Iverson, 1993).

Uno de los problemas de trabajar con la técnica de ácidos grasos es minimizar la variabilidad que pueda existir en la biopsia. En la grasa puede estar contenida información acerca de la dieta y de la especie o población (Budge *et al.*, 2006, Grahl-Nielsen, 2006), y a su vez la grasa puede estar estratificada, por lo cual se requiere caracterizar la biopsia con la que se trabaja para saber qué tipo de información se puede obtener de ella. La mayoría de los estudios referentes a los ácidos grasos se han realizado en pinnípedos, odontocetos y algunos misticetos.

Existen dos clases de lípidos importantes contenidas en la grasa de los organismos, que son los estructurales y los de reserva (Christie, 1989). Ambos poseen funciones distintas y arrojan información diferente. Los estructurales (representados en su mayoría por fosfolípidos) son los componentes mayoritarios de las membranas celulares, mientras que los de reserva (representados en su mayoría por triglicéridos) sirven de almacenamiento de energía para el animal.

Algunos autores sugieren que la identificación y cuantificación de los ácidos grasos contenidos en grasa de pinnípedos y cetáceos permite inferir sobre la composición de su dieta y sus hábitos de forrajeo (Budge *et al.*, 2006, Iverson *et al.*, 1997). Sin embargo, en cetáceos, pocos estudios han logrado establecer una relación entre el depredador y su dieta con base en los perfiles de ácidos grasos (Hooker *et al.*, 2001), e incluso algunos estudios concluyen que no es posible determinar dicha relación entre depredador y presa mediante el perfil de ácidos grasos, ya que existen otras variables que pueden modificar este perfil (Olsen y Grahl-Nielsen, 2003). A pesar de ello, se ha sugerido que la composición y el tipo de alimento, así como las adaptaciones al ambiente o cambios fisiológicos, contribuyen a las diferencias espaciales en el contenido lipídico y el perfil de ácidos grasos observadas en algunas poblaciones de mamíferos marinos (Samuel y Worthy, 2004).

En mamíferos marinos el contenido de lípidos totales es afectado por la condición nutricional en la que se encuentran los organismos, cambios en la temperatura del ambiente, y cambios en el tipo y disponibilidad de las presas durante ciertas estaciones del año (Aguilar y Borrell, 1990; Bradshaw *et al.*, 2003). La composición de ácidos grasos varía entre géneros (West *et al.*, 1979), estados reproductivos (Ackman *et al.*, 1975b; Aguilar y Borrell, 1990) y clases de edad (Iverson *et al.*, 1997). Así mismo, los ácidos grasos ayudan a distinguir entre grupos de animales provenientes de distintas zonas geográficas, a aquéllos que consumen diferentes presas (Iverson *et al.*, 1997), e incluso a los que provienen de distintas poblaciones (Olsen y Grahl-Nielsen, 2003).

Actualmente se desconoce la distribución de los lípidos estructurales y de reserva en la grasa superficial (biopsias) de ballena azul en vida libre y si el perfil de ácidos grasos permite determinar diferencias entre categorías y relaciones depredador-presa. En este contexto, el presente estudio representa la primera aproximación de los perfiles de ácidos grasos de ballenas azules del Golfo de California que incluye la separación en ácidos grasos estructurales y de reserva, donde los primeros se asocian con diferencias a nivel de membrana celular, mientras que los últimos se encuentran más asociados con la fuente alimenticia.

A continuación, encontrarán cómo se relacionan los perfiles de ácidos grasos estructurales y de reserva entre individuos de distintas categorías (crías, hembras lactantes, hembras y machos). Así mismo, observarán una relación depredador-presa con los eufáusidos *Nyctiphanes simplex* lo cual corrobora lo encontrado por otros métodos convencionales.

II. ANTECEDENTES

II.1. Lípidos y ácidos grasos

No existe una definición de lípidos que sea ampliamente aceptada. De acuerdo con Christie (1989) los lípidos están constituidos por ácidos grasos y sus derivados, así como de sustancias relacionadas a estos compuestos de manera biosintética o funcional.

Los lípidos se dividen en dos clases: neutros y polares. Los neutros son aquellos que mediante la saponificación dan lugar como máximo a dos tipos de productos primarios, como ácidos grasos o glicerol, por cada mol (por ejemplo triglicéridos o ésteres de colesterol) durante la hidrólisis. Los polares son aquellos que mediante la saponificación dan lugar a 3 o más productos primarios por mol (por ejemplo fosfolípidos y glicolípidos). Los lípidos neutros, que constituyen la reserva energética, incluyen a diferentes clases como lo son los esteroides, ceras, monoacilglicéridos, diacilglicéridos y triglicéridos. Los lípidos polares, que constituyen la estructura de las membranas celulares, incluyen a gliceroalcoholes, esfingolípidos y fosfolípidos o glicerofosfolípidos (Christie, 1989; Gurr y Harwood, 1991).

Los triglicéridos son moléculas hidrofóbicas no polares constituidas por una molécula de glicerol unida a 3 ácidos grasos por medio del grupo hidroxilo. Esta clase de lípidos constituyen la mayor parte de los lípidos de reserva de los animales. Los fosfolípidos están formados por un glicerol al cual están unidos los ácidos grasos y además está presente un grupo fosfato polar. Esta clase de lípidos se encuentran formando la mayor parte de las membranas celulares de los organismos vivos (Christie, 1989; Gurr y Harwood, 1991).

Los ácidos grasos están formados generalmente por un número par de carbonos, con un grupo carboxilo en una extremidad, y en algunos casos presentan dobles enlaces. En los animales, los ácidos grasos pueden formar una cadena de 14 a 22 carbonos, y algunas veces un poco más, y tener de uno a seis

dobles enlaces. Los ácidos grasos se pueden dividir en 3 grupos: saturados, cuando los carbonos en la cadena ocupan todos sus enlaces; monoinsaturados, cuando en la cadena de carbonos está presente un solo doble enlace; y poliinsaturados, cuando en la cadena de carbonos están presentes de dos a más dobles enlaces (Christie, 1989). Así mismo, los ácidos grasos se pueden dividir en dos grandes familias: familia ω -3 y ω -6, indicando que presentan 3 y 6 carbonos respectivamente, desde el último doble enlace hasta el metilo terminal (Christie, 1989).

Los ácidos grasos presentan al menos tres funciones en los animales siendo éstas: a) formando la estructura de las membranas celulares, compuesto principalmente de fosfolípidos y esfingolípidos, b) reserva energética compuesto principalmente de triglicéridos, y c) precursores de sustancias llamadas eicosanoides que regulan procesos tales como la vaso constricción, vaso dilatación, inflamación y coagulación (Christie, 1989). Además algunos ácidos grasos son importantes en procesos reproductivos, regulación de los niveles de lípidos en el plasma, regulación de la expresión génica, así como en el desarrollo de funciones neuronales y visuales (Jump, 2002).

II.2. Digestión, absorción y transporte de los lípidos

La digestión es un proceso de hidrólisis catalizado por la enzima lipasa, donde la grasa junto con la bilis se convierte en grasa emulsificada. El resultado final de la digestión completa de los lípidos es el desdoblamiento de éstos en ácidos grasos y glicerol, donde quedan monoglicéridos que entran a la membrana intestinal al igual que los ácidos grasos y el glicerol y son absorbidos (Gurr y Harwood, 1991).

El hígado se encarga de secretar sales biliares importantes en la digestión. Éstas actúan como detergentes, transportando los ácidos grasos y triglicéridos apartándolos de los glóbulos de grasa conforme continúa el proceso digestivo formando micelas, y además permitiendo la absorción de los productos terminales y digestivos de los lípidos (Gurr y Harwood, 1991).

El transporte de ácidos grasos libres se da mediante la difusión desde la célula combinándose con albúmina sanguínea transportándolos hacia los tejidos del cuerpo o hacia las células donde se producirá energía (Gurr y Harwood, 1991).

El hígado se encarga de saturar algunos lípidos para producir lípidos insaturados requeridos por las células del cuerpo para funciones metabólicas. Otros lípidos se convierten en colesterol y fosfolípidos necesarios para las estructuras de las membranas celulares. Por último, algunos lípidos se desdoblan en moléculas más pequeñas que las células emplean para la obtención de energía (Gurr y Harwood, 1991).

II.3. Descripción de la grasa en cetáceos

Uno de los primeros estudios sobre grasa en cetáceos fue realizado por Ackman *et al.* (1975a), quienes mencionan que la capa externa de la grasa de los misticetos es la más estable. Lockyer *et al.* (1984) concuerdan con esta idea y proponen que la capa externa es catabólicamente la más estable siendo una zona de almacenamiento de energía a largo plazo. La zona basal, o más cercana al músculo y a la red de capilares sanguíneos, es la región donde el almacenamiento de grasa está en un estado de flujo ya sea que entren ácidos grasos para almacenarse o para romperse catabólicamente (Lockyer *et al.*, 1984). De acuerdo con Ackman *et al.* (1975a), el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs por sus siglas en inglés) en la capa interna de la grasa indica una rápida tasa de depósito de estos ácidos grasos cuando se encuentran en exceso en el animal. También lograron determinar que la capa de grasa del rorcual de Sei (*Balaenoptera borealis*) es más delgada que la capa de grasa del rorcual común (*Balaenoptera physalus*), aún siendo de un tamaño corporal similar. Además para *B. borealis* encuentran una separación de capas específicas de tejido no graso y diferentes capas de grasa que no se habían descrito en misticetos, y que probablemente sean específicas para la especie (Ackman *et al.*, 1975b). Ellos encuentran que la capa externa posee mayor cantidad de grasa que la capa interna siendo esto representativo en misticetos (Fig. 1).

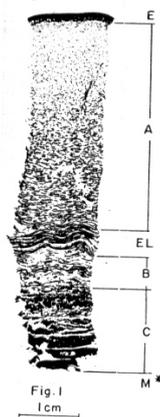


Figura 1. Fotografía de un corte de grasa de *B. borealis* donde se observan distintas capas (Modificado de Ackman *et al.* (1975b)): epidermis (E), capa externa (A), capa elástica (EL), capa interna (B), tejido no graso (C), músculo (M).

Lockyer *et al.* (1984) concluyen que la grasa de *B. physalus* está compuesta en un 77.4% de lípidos, con el doble de contenido lipídico en las capas externas de grasa que en la zona más interna, adyacente al músculo y constituida por mayor cantidad de proteínas. También reportan que la composición de lípidos de la grasa tiene 60% de triglicéridos y de 25 a 30% de ácidos grasos libres probablemente generados por hidrólisis *post mórtem*. Los ácidos grasos monoinsaturados constituyeron el 60% de los lípidos de la grasa y algunos de ellos fueron similares al consumo de la dieta en cuanto al tipo de ácidos grasos. Los valores más altos de ácidos grasos poliinsaturados se encontraron en la zona interna de la capa de grasa, así como los ácidos grasos saturados.

En otro trabajo, Grahl-Nielsen *et al.* (1991) mencionan entre otros factores que modifican el contenido de ácidos grasos a la dieta así como a las diferencias entre 1) sexos (West *et al.*, 1979), 2) hembras lactantes y no lactantes (Stull *et al.*, 1967), 3) incremento en las insaturaciones de los ácidos grasos conforme la edad (Magomaev, 1966; Jangard y Ke, 1968; Engelhardt y Walter, 1974), y 4) áreas geográficas (Grahl-Nielsen *et al.*, 1991). Incluso en este último trabajo mencionan que diferentes stocks de ballena de aleta tienen diferentes grados de insaturaciones en sus aceites medidos por medio del valor de yodo, lo cual hace pensar que el ambiente influye en el perfil de ácidos grasos.

Borobia *et al.* (1995) analizan la capa externa de la grasa del ballena de aleta y de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) del Golfo de San Lorenzo para obtener un reflejo de la dieta a largo plazo. Encuentran una variación en los ácidos grasos 20:1n-9 y 22:1n-11 entre las dos especies sin embargo no es suficiente para poder separar a las dos especies.. Estos autores concluyeron que las variaciones en la composición de ácidos grasos se deben más a diferencias en la dieta que a diferencias a nivel metabólico.

En el rorcual minke (*Balaenoptera acutorostrata*) (Olsen y Grahl-Nielsen, 2003) observaron que los ácidos grasos de cadena corta y saturados, los ω -3 poliinsaturados, y otros poliinsaturados (16:4n-1 y 16:3n-4) aumentan hacia la capa más interna y que se asocian con la dieta. Los ácidos grasos monoinsaturados y los ω -6 se observan en mayor cantidad en la capa más externa y se relacionaron con cambios ocurridos a largo plazo y por ende a la separación geográfica del rorcual minke, coincidiendo con la separación en dos stocks de esta misma especie reportada por la Comisión Ballenera Internacional. Aquí mismo se menciona que las diferencias en ácidos grasos de la capa interna de la grasa reflejan cambios en la dieta a corto plazo, mientras que las diferencias en la capa externa reflejan los cambios en la dieta a largo plazo.

Recientemente, Samuel *et al.* (2004) realizaron un estudio con el delfín tursión, *Tursiops truncatus*, para determinar la variabilidad de los ácidos grasos de los mismos en función del sitio de muestreo, la estación de muestreo y el estado reproductivo. Se establece que el análisis de ácidos grasos es una herramienta útil para evaluar interacciones depredador-presa en cuanto a la alimentación en tursiones y que es factible determinar la historia de la dieta al comparar la composición de la presa con la de los tejidos del depredador. Los ácidos grasos poliinsaturados fueron asociados a individuos y a una localización geográfica concreta. También se encontró que los ácidos grasos de la dieta se incorporan al tejido con poco o nulo cambio. Se encontró que los sitios de muestreo a lo largo del cuerpo no son diferentes en su composición bioquímica. En cuanto al estado reproductivo, aparentemente las hembras lactantes presentaron diferencias en sus ácidos grasos respecto a las no lactantes aunque éstas no fueron estadísticamente significativas, en cambio, se encontraron diferencias entre

machos y hembras no lactantes. La proporción de ácidos grasos saturados y poliinsaturados incrementó desde la capa más externa hacia la interna, mientras que los monoinsaturados disminuyeron de la capa más externa hacia la más interna.

En el estudio de Cruz-Vizcaíno (2005) se analizaron los perfiles de ácidos grasos en biopsias de la aleta caudal de individuos de cachalote (*Physeter macrocephalus*) que contienen un mayor porcentaje de tejido estructural, y sugiere que los cachalotes que concurren en el Golfo de California pertenecen a dos stocks diferentes.

Birkeland *et al.* (2005) observa en un estudio realizado con parejas de madre y cría de belugas en cautiverio, que existe una relación del cambio de ácidos grasos conforme crecen las crías. Así las más grandes poseían perfiles de ácidos grasos similares a los de sus madres, ya que los ácidos grasos han sido metabolizados asemejando su perfil al de un adulto. En cambio aquellas crías de menor edad se separan completamente de los perfiles de sus madres.

III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que las ballenas azules de la población Pacífico Noreste fueron ampliamente cazadas en el pasado no existe un reporte acerca del comportamiento de sus lípidos en grasa. Se han realizado estudios en la grasa de ballenas azules varadas o cazadas para determinar concentraciones de contaminantes, sin embargo no se han determinado las clases lipídicas contenidas en la grasa, ni si existe o no una estratificación de ésta. Así mismo, no se sabe qué tipo de información nos arrojan las biopsias de animales en vida libre, la cual se podría emplear de manera útil en estudios de ecología de poblaciones empleando ácidos grasos.

En la última década, los estudios de ácidos grasos toman en cuenta el perfil completo de la especie sin una previa separación en ácidos grasos estructurales y de reserva. Por lo que este trabajo es uno de los primeros en hacer una separación entre los estructurales y de reserva, identificarlos y cuantificarlos.

IV. OBJETIVO GENERAL

Describir los perfiles de ácidos grasos, en lípidos de reserva y estructurales de la capa superficial de grasa de ballenas azules foto-identificadas en el Golfo de California.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar histológicamente la grasa de las biopsias de ballena azul.
2. Cualificar y cuantificar los ácidos grasos de lípidos estructurales y de reserva de la grasa superficial de ballena azul.
3. Evaluar la variabilidad de los ácidos grasos de los lípidos estructurales y de reserva en cuatro categorías: crías, hembras lactantes, hembras y machos.
4. Establecer relaciones de los perfiles de ácidos grasos de lípidos de reserva de ballena azul con análogos de los eufáusidos reportados en la literatura para el área de estudio.

V. ÁREA DE ESTUDIO

El Golfo de California (Fig. 2) es una cuenca marina de forma alargada ubicada en la región noroccidental de México comprendido entre los 31°53' - 20°27' latitud norte y los 114°54' - 105°38' longitud oeste. Se encuentra en una zona subtropical de alta productividad primaria propiciada por las características hidrográficas de esta región (Álvarez-Borrego, 1983). Topográficamente presenta diversas cuencas que conforme se distribuyen hacia el Sur van aumentando en profundidad, confiriéndole al Golfo de California ciertas características morfológicas que permiten dividirlo en 3 zonas: norte, centro y sur (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991) Al Oeste está limitado por la Península de Baja California y al Este por los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Jalisco (Roden, 1964).

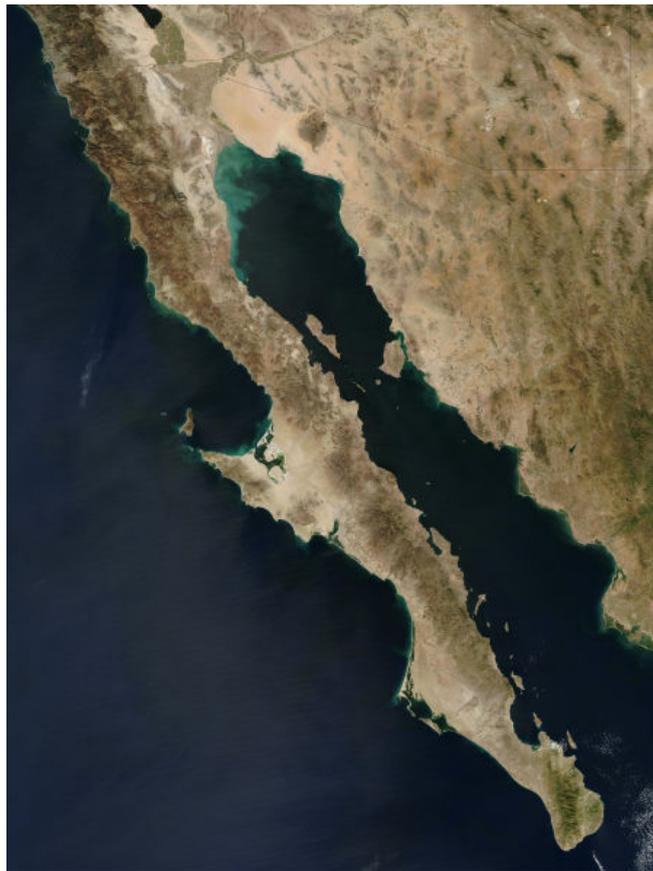


Figura 2. Golfo de California

Durante el verano (Julio a Octubre) predominan vientos del sureste y se generan surgencias en la costa occidental. Así mismo, entra agua de la superficie del Pacífico Oriental Tropical al Golfo de California presentando bajas concentraciones de nutrientes y altas temperaturas superficiales. En invierno soplan vientos del noroeste y se presentan surgencias en la costa oriental y en el área de las Grandes Islas. Esto propicia una alta productividad primaria durante los meses de invierno. (Santamaría-del-Ángel *et al.*, 1994).

La intensificación de las corrientes de marea superficiales y los centros de surgencias costeras propician una alta productividad primaria y secundaria (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991; Santamaría-del-Ángel *et al.*, 1994). Las concentraciones de fitoplancton presentan un patrón de incremento desde la boca hacia las zonas más norteñas del golfo (Álvarez-Borrego, 1983; Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991). Los valores de pigmentos fotosintéticos estimados mediante imágenes de satélite son más altos en la costa Este que en la costa Oeste en las regiones centro y sur del Golfo de California (Santamaría-del-Ángel *et al.*, 1994).

Las densidades promedio de eufáusidos presentes en esta área son intermedias entre las que se presentan en las zonas productivas y frías como la Corriente de California y las menos productivas del Pacífico Oriental Tropical. *Nyctiphanes simplex* es el eufáusido con mayor afinidad nerítica en comparación a los que habitan la región subtropical de California. Su rango de distribución va desde Baja California hasta el sur de California (34°N). Esta especie es la más abundante y ampliamente distribuida en el Golfo de California durante todas las estaciones, especialmente en invierno, observando densas agregaciones superficiales especialmente durante el día, aunque también están presentes durante la noche (Brinton y Townsend, 1980).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Trabajo de campo

Se tomaron biopsias de piel y grasa de diferentes individuos de ballena azul avistados tanto en la región norte, centro y sur del Golfo de California durante las temporadas 2003, 2004 y 2005. Éstas se obtuvieron a bordo de embarcaciones menores en salidas no sistemáticas entre Loreto y La Paz, B.C.S., así como en un crucero realizado a lo largo del Golfo de California en marzo y abril del 2005 (proyecto CONACYT-SEMARNAT 0628).

Después de identificar a un individuo mediante fotografías del costado, se obtuvo su biopsia mediante un dardo cilíndrico de acero inoxidable de 7 mm de diámetro por 40 mm de largo con tres púas en la cara interna, el cual fue disparado con una ballesta a una distancia aproximada de 10 m del organismo (Gendron *et al.*, 2001). Con el fin de destruir cualquier resto de materia orgánica que hubiese quedado atrapado en el dardo y prevenir posible contaminación entre las muestras, el dardo se remojó en cloro después de su uso, se esterilizó con alcohol, se quemó con un soplete por 10 segundos y se guardó en papel aluminio esterilizado hasta su nuevo uso (Gendron *et al.*, 2001).

La biopsia obtenida se colocó en papel aluminio esterilizado dentro de un vial criogénico. Para prevenir la oxidación de lípidos en el campo, en los muestreos 2004 y 2005 las biopsias se preservaron en nitrógeno líquido (-296°C), mientras que en el 2003 se mantuvieron en un congelador (-20°C) hasta llegar a tierra (5 días aproximadamente). En el laboratorio, las biopsias fueron almacenadas en un ultracongelador (-70°C) hasta su análisis.

El sexo de las ballenas fue determinado mediante análisis moleculares realizados en el laboratorio de genética de poblaciones de la UABC (Enríquez-Paredes, 2006). La base de datos de fotografías de identificación individual del laboratorio de Ecología de Mamíferos Marinos del CICIMAR, permitió tener la correspondencia de cada biopsia con un individuo en particular. De esta manera

se pudo relacionar el sexo, estado reproductivo y la edad mínima de los individuos de los cuales se realizaron los análisis de ácidos grasos.

La comparación fotográfica del patrón de manchas único de cada individuo permite reconocer individuos que han sido avistados previamente en otras temporadas (Sears *et al.*, 1990). Con este criterio, se consideró como jóvenes a aquellos individuos fotografiados desde crías y que se han foto-recapturado en años posteriores (entre 1 y 9 años), mientras que aquellos individuos fotografiados por primera vez hace 10 años o más, se consideraron adultos. En el caso de las hembras acompañadas de una cría se les consideraron como hembras lactantes, mientras que a las crías se les identificó mediante observación directa en el campo de su cercanía a la hembra y por poseer un tamaño menor con relación a ésta.

VI.2. Histología

Se realizaron cortes histológicos de la grasa contenida en biopsias de ballena azul para observar la posible estratificación de diferentes clases lipídicas, para lo que se emplearon las siguientes técnicas.

Cortes por congelación

Se escogieron 4 biopsias diferentes (3 hembras y un macho) con base en los dos siguientes criterios:

- a) que fuera tomada perpendicularmente al dorso del animal lo que permite obtener una biopsia completa.
- b) que haya provocado el derrame de sangre observado en la fotografía del animal, lo que permite asumir que el dardo penetró hasta el músculo y de esa forma obtendríamos una biopsia con todas las capas de grasa.

A partir de las biopsias congeladas, se seccionó una porción de la grasa (aprox. 20% de la biopsia), de manera longitudinal. Esta porción de tejido se colocó en un molde redondo y se cubrió con Tissue Teck (producto 4583-Tissue-Teck O.C.T. Compound Embedding Medium for frozen tissue specimens. For *in vitro* diagnostic use. Sakura Finetek, Torrence, CA. 90504 E.U.A.). Posteriormente se colocó el soporte del crióstato en el molde y se dejó enfriar (-26°C). Una vez congelado se realizaron los cortes a 10 micras de grosor.

Se realizaron aproximadamente 10 cortes por biopsia para seleccionar el corte mejor teñido. Cada corte se colocó en un portaobjetos previamente lavado con alcohol etílico al 100%, secado y bañado en una solución poli-L-lisina para evitar que los cortes se despegaran durante la tinción. Cada corte se guardó en congelación hasta su tinción.

Tinción en sudán negro para grasas

Los cortes por congelación se tiñeron con una solución de sudán negro a saturación en alcohol etílico al 70%, mediante el siguiente procedimiento (Rodríguez-Jaramillo, 2004):

- a) Se colocaron en alcohol al 70%.
- b) Se tiñeron por 30 min. en la solución de sudán negro previamente filtrada.
- c) Se volvieron a colocar en alcohol al 70%.
- d) Se lavaron con agua corriente.
- e) Se lavaron en agua destilada.
- f) Se montaron en gelatina glicerinada.

Cuantificación del área

Se seleccionó el corte mejor teñido de cada una de las biopsias. Cada corte se observó al microscopio a un objetivo de 10X. Se tomaron fotografías secuenciadas desde la capa externa hasta la capa interna de la biopsia y se analizaron mediante un software para análisis de imágenes (Image Pro PLUS, versión 4.1.5) adaptado a una cámara CoolSNAP (Media Cybernetics, Bethesda, MD) conectada a un microscopio OLYMPUS BX41. Debido a que el software sólo detecta de manera automática los tonos negros, las gotas lipídicas negras que representan los triglicéridos fueron identificadas automáticamente, mientras que las gotas lipídicas grisáceas que representan los fosfolípidos tuvieron que ser estandarizadas previamente para evitar el sesgo al seleccionarlos manualmente. Dicho procedimiento se realizó en cada una de las fotografías secuenciadas de cada biopsia, permitiendo calcular el área ocupada por cada clase lipídica respecto al área total de triglicéridos y fosfolípidos (Rodríguez-Jaramillo, 2004):

$$\frac{\sum t}{\sum t \sum f} = \frac{\text{suma total de triglicéridos o de fosfolípidos}}{\text{total del área (4477.778 micras}^2\text{)}}$$

VI.3. Ácidos grasos

A partir de la biopsia congelada, se separó la grasa de la piel de ballena. Ya que cada biopsia es empleada para diversos análisis, por medio de un corte sagital, se separó de la biopsia una porción variable entre 3.5 y 200 mg de grasa, según la cantidad de grasa disponible de la biopsia. Se empleó una navaja nueva en cada biopsia para evitar contaminación entre muestras. Los cortes de las biopsias se realizaron sobre un gel congelado cubierto con papel aluminio esterilizado para evitar que la biopsia se descongelara rápidamente perdiendo lípidos y se contaminara. Las submuestras fueron secadas en una liofilizadora durante 8 hrs. por día (3 días en total), sumando un periodo de liofilización de 24 hrs., y se almacenaron en un ultracongelador a -80°C hasta su análisis.

Extracción de lípidos totales

Se sistematizó el protocolo de preparación de las biopsias recolectadas en 2003 (n=10), 2004 (n=8) y 2005 (n=32) para la extracción de lípidos totales. Para determinar la mejor eficiencia de extracción de lípidos totales en las biopsias de ballena azul, se usó grasa de una biopsia colectada en el 2002 a la cual se le realizó pruebas con 3 métodos de extracción con cloroformo:metanol (1:2), Bligh y Dyer (cloroformo:metanol:agua; 1:2:0.5), y Folch (cloroformo:metanol:agua; 2:1:0.15) por triplicado. Se concluyó que con el método de Folch se extrajo un mayor porcentaje de lípidos totales (17.35%), y se estableció como el método a aplicar a todas las muestras (Tabla I).

Tabla I. Resultado de las técnicas empleadas para las pruebas de extracción de lípidos totales. Promedio de los porcentajes de extracción obtenidos \pm desviación estándar.

Método	Promedio del porcentaje de extracción \pm desv. est.
cloroformo:metanol (1:2)	15.44 \pm 4.71
Bligh & Dyer	11.05 \pm 0.14
Folch	17.35 \pm 3.49

Los lípidos en el tejido liofilizado, se extrajeron de manera pasiva con 3.5 mL de la solución Folch durante 24 hrs. Para prevenir la oxidación, se añadieron a cada muestra 10 μ L del antioxidante butil hidroxitolueno (BHT) al 0.01%. Para determinar el porcentaje de recuperación se añadieron 5 μ L del ácido graso C23:0 como estándar interno, el cual no fue detectado en los análisis preliminares de ácidos grasos de ballena azul.

Posteriormente, se añadieron 0.6 mL de agua destilada y se homogenizó la solución. Se dejó reposar hasta que la solución se separara en dos fases. Se retiró la fase superior con una pipeta Pasteur. Se añadieron 1.5 mL de una solución denominada Fase Superior (cloroformo:metanol:agua; 3:48:47) y se retiró el extracto superior. Se repitió el mismo procedimiento 3 veces antes de retirar la fase inferior y colocarla en un tubo limpio. Se agregaron 0.65 mL de

metanol, se homogenizó y se obtuvo una sola fase, misma que se filtró con una columna preparada con fibra de vidrio y sulfato de sodio anhidro para atrapar el agua que pudiera haber quedado. Una vez filtrado, se secó con una corriente de nitrógeno gaseoso y se resuspendió en 1 mL de cloroformo.

Cuantificación de lípidos totales

Para conocer el porcentaje de lípidos totales se empleó el método de calcinación propuesto por Marsh y Weinstein (1966). Del extracto de los lípidos resuspendidos en cloroformo (1 mL) se tomó una alícuota de 10 μ L de cada una de las muestras y se colocó en un tubo de ensaye. Posteriormente se secó con una corriente de nitrógeno gaseoso y se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) tapando el tubo con papel aluminio y posteriormente con un tapón de rosca. Se empleó una muestra blanco donde sólo se agregaron 2 mL de H_2SO_4 sin lípidos. Se introdujo a la mufla a 200°C por 15 min. Se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min. De ahí se pasó a un baño de hielo para enfriarlos durante otros 5 min. Se retiró y se agregaron 3 mL de agua destilada, regresándolos al baño de hielo esperando 10 min. hasta que desaparecieron las burbujas. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 375 nm. Los 990 μ L restantes se guardaron en atmósfera de nitrógeno con tapa con teflón en un congelador a -20°C.

Se realizó una curva de calibración para lípidos totales con la propia grasa de la ballena azul, ya que no se contaba con una curva de calibración propia de esta especie. Se tomaron diferentes fracciones de grasa de una misma ballena para realizar la curva ya que la composición de clases lipídicas varía dependiendo de la especie y de esta manera se obtendría una curva de calibración que contemplaría todas las clases lipídicas contenidas en la grasa.

Además de esto se contó con una curva de calibración para cada ácido graso, donde se tenía una concentración conocida y se midió el área de cada uno de los ácidos grasos. Esto con el fin de conocer la concentración a la cual los picos de ácidos grasos estuvieran bien definidos.

Separación de lípidos de reserva (neutros) y estructurales (polares)

Los 990 μL restantes se secaron con nitrógeno gaseoso y se resuspendieron en 0.5 mL de cloroformo. Se prepararon microcolumnas con pipetas Pasteur previamente lavadas o nuevas, colocando fibra de vidrio hasta el fondo y cubriendo con sílica gel, previamente preparada hasta alcanzar una altura de 3.5 cm en la pipeta Pasteur. La sílica gel se preparó quemándola por 4 hrs. a 480°C en una mufla. Se pesó y se le añadió 6 % en volumen de agua. La sílica gel en la pipeta Pasteur con fibra de vidrio se acomodó con el vortex para compactarla. Para cada muestra se colocaron los 0.5 mL del extracto lipídico en la microcolumna, misma que se acopló a una bureta para añadir 10 mL de cloroformo, los cuales pasaron a través de la pipeta por goteo constante, a fin de extraer los lípidos de reserva (representados en su mayoría por triglicéridos) y colectarlos en un tubo limpio. Después se agregaron 15 mL de metanol a la bureta y se colectaron los lípidos estructurales (representados en su mayoría por fosfolípidos) en un tubo limpio. Ambos tubos con las dos clases lipídicas; de reserva y estructurales se taparon y se guardaron en el congelador a -20°C .

Los ácidos grasos en los lípidos de reserva y estructurales permitirían comparar diferencias o similitudes entre las categorías (crías, hembras lactantes, hembras y machos). Cada clase lipídica aparentemente refleja información distinta, donde los lípidos de reserva indican aspectos sobre la dieta y los estructurales indican diferencias o similitudes a nivel de la composición de la membrana celular, que puede estar controlada genéticamente.

Derivatización de los ácidos grasos

Los lípidos de reserva y estructurales se secaron con una corriente de nitrógeno gaseoso. Antes de analizar los ácidos grasos de ambas clases de lípidos en un cromatógrafo de gases (CGL), se realizó una derivatización de los lípidos para obtener metil-ésteres, que son más volátiles, además de ser derivados no reactivos.

El proceso de derivatización consistió en someter los lípidos a una metanólisis añadiendo 2.5 mL de una mezcla de HCl:CH₃OH (5 %:95 %) por un periodo de 2.5 hrs. en un baño María a 85 °C. Los tubos se cerraron con tapón con teflón y se sellaron con cinta teflón. Los metil-ésteres obtenidos se separaron de otros productos secundarios de la reacción con 1 mL de hexano (grado HPLC). Este procedimiento se repitió 2 veces hasta tener una extracción total.

Los metil-ésteres en solución de hexano se lavaron adicionando 2 mL de agua destilada al extracto para formar una capa inferior de agua destilada y productos de la reacción solubles en agua, y una superior que contenía el hexano y los metil-ésteres. El agua destilada se separó con una pipeta Pasteur burbujeando para atravesar la fase del hexano. Este procedimiento se realizó 2 veces para eliminar las impurezas producto de la derivatización. Se utilizó una pipeta Pasteur para separar los ácidos grasos metil esterificados contenidos en el hexano. Éstos se pasaron a un tubo limpio y se llevaron a sequedad utilizando una corriente de nitrógeno gaseoso.

Los ácidos grasos metil esterificados obtenidos se resuspendieron en 1 mL de hexano y de ahí se tomaron 250 µL colocándolos en un vial sellado con tapa de teflón para su análisis en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

Identificación de los ácidos grasos

Para poder identificar cada ácido graso encontrado en las muestras se compararon los espectros de masas de cada muestra, con los espectros contenidos en la biblioteca de espectros de masas (NIST, 2002) y con la biblioteca de estándares de ácidos grasos metil esterificados para su comparación mediante un software (HP GCD Plus Chemstation).

Adicionalmente, la comparación de los tiempos de retención característicos de cada ácido graso contribuyó a su identificación. El tiempo de retención es el tiempo que tarda en detectarse el pico del ácido graso desde la inyección de la muestra. Estos picos se compararon con un estándar de 28 ácidos grasos comerciales que son abundantes en organismos marinos. Aunado a esto se

realizó una verificación con los iones moleculares que destacan en los ácidos grasos metil esterificados.

Cuantificación de los ácidos grasos

El área bajo la curva (siendo la curva cada pico de ácido graso) es directamente proporcional a la concentración en el sistema utilizado (GC-MS). Se realizó una curva de calibración para cada ácido graso, relacionando el área integrada en cada uno de los picos del cromatograma con una concentración conocida.

A cada curva de calibración se le calculó la pendiente de la recta y se utilizó como un factor de corrección específico para cada ácido graso, ya que la intensidad de la señal varía en función del número de carbonos en el compuesto, de la presencia e incremento de dobles enlaces y de la presencia de ramificaciones. Un segundo factor de corrección basado en la relación observada y esperada de las abundancias del estándar interno (C23:0), permitió cuantificar las pérdidas ocurridas durante el proceso de extracción (Fig. 3).

Los datos obtenidos en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se calcularon en porcentajes de ácidos grasos y éstos se transformaron mediante el arcoseno de su raíz cuadrada para reducir la heterogeneidad de las variancias y realizar los análisis estadísticos pertinentes (Zar, 1999).

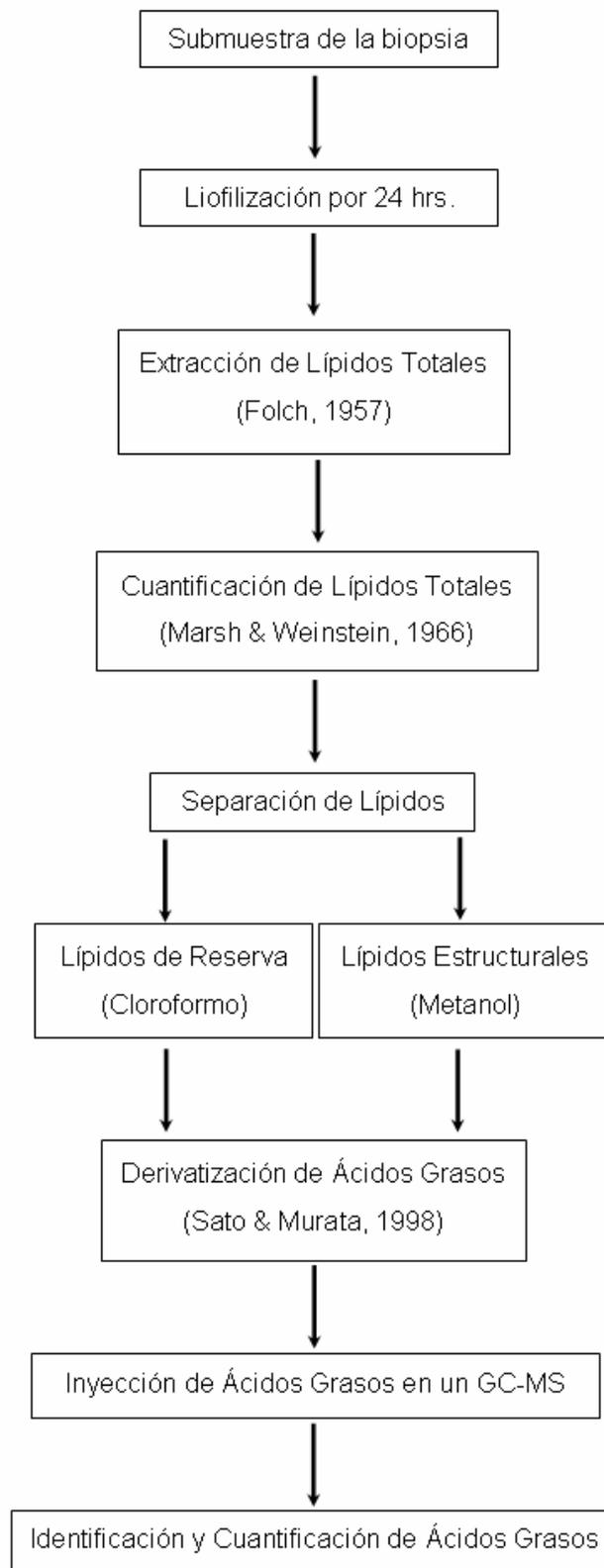


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología empleada para ácidos grasos de ballena azul.

VI.4. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de ANOVA en el contenido de lípidos totales para ver si existían diferencias significativas entre categorías. También se compararon las categorías mediante un análisis de distribución de frecuencias tomando en cuenta rangos de porcentajes de lípidos totales.

Para los ácidos grasos tanto estructurales como de reserva, se realizaron análisis de componentes principales (ACP) para observar cómo se distribuían las 4 categorías de ballena azul tomando en cuenta los ácidos grasos en concentraciones mayores a 0.1%. Posteriormente se realizó un análisis de funciones discriminantes (AFD) con los mismos ácidos grasos de reserva y estructurales, para identificar los ácidos grasos que separaron las categorías. Finalmente se realizaron análisis de ANOVA para los ácidos grasos que fueron significativamente diferentes en el análisis discriminante, aplicando una prueba *a posteriori* de Tukey, con intervalos de confianza al 95%.

Para corroborar la relación directa entre el perfil de ácidos grasos de las presas y el depredador, se realizó un análisis de correlaciones canónicas comparando los perfiles de ácidos grasos de reserva de las 4 categorías de ballenas azules con los perfiles de los 5 categorías de eufáusidos *Nyctiphanes simplex* proporcionados por Jorge Del Ángel Rodríguez en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del CIBNOR, La Paz, México.

VII. RESULTADOS

Se obtuvo un total de 50 biopsias de 47 individuos diferentes, ya que un macho del 2005 fue biopsiado por duplicado y una hembra biopsiada en 2003 fue re-biopsiada en el 2005. Los individuos foto-identificados fueron clasificados, con ayuda del historial de vida de individuos basado en la foto-identificación, en 4 categorías por año de muestreo que a su vez se distribuyeron en 3 meses de la temporada (Tabla II).

Tabla II. Clasificación de individuos de ballena azul por categoría por mes y año de muestreo.

	2003			2004			2005		
	Feb	Mar	Abr	Feb	Mar	Abr	Feb	Mar	Abr
Crías	0	2	0	0	2	0	1	0	1
Hembras lactantes	0	3	0	0	2	0	1	1	1
Hembras	0	3	0	0	2	0	3	5	5
Machos	0	2	0	0	2	0	2	9	3

Las muestras provienen de todo el Golfo de California, donde se nota la ubicación amplia de las hembras y machos contrastando con la ubicación de las hembras lactantes y sus crías concentradas en la zona suroeste del Golfo, entre Loreto y Bahía de La Paz (Fig. 4).

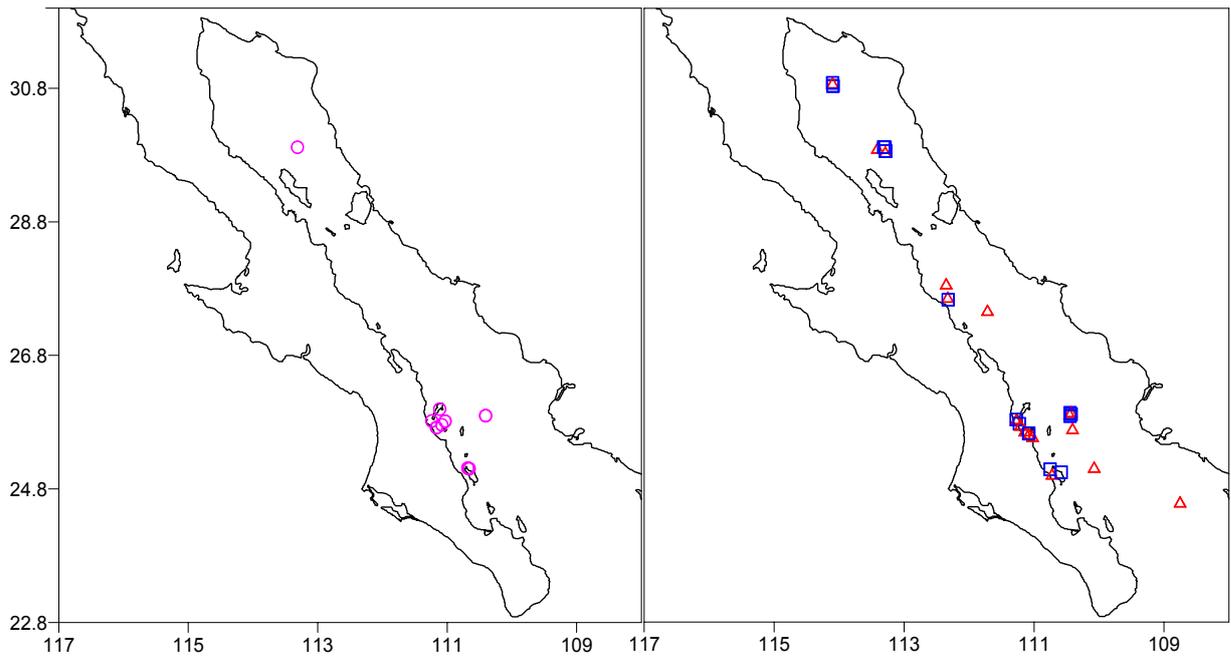


Figura 4. Ubicación de las muestras de ballenas azules a lo largo del Golfo de California.

○ Hembras lactantes con cría △ Hembras □ Machos

VII.1. Histología de las biopsias

Las cuatro biopsias seleccionadas de ballena azul mostraron una distribución homogénea, *i.e.* sin estratificación de triglicéridos y fosfolípidos a lo largo de los cortes histológicos, y al parecer independiente del sexo del animal, aunque no lo podemos afirmar dado el número pequeño de muestra (Tabla III). A pesar de la distribución homogénea, los triglicéridos, que forman parte del tejido de reserva, representaron aproximadamente el 70% de la biopsia, mientras que los fosfolípidos, que forman parte del tejido estructural, representaron aproximadamente el 30% de la biopsia (Fig. 5). El mayor porcentaje de triglicéridos en la biopsia de ballena azul permite asumir una mayor influencia de la dieta en la composición de ácidos grasos.

Tabla III. Porcentaje de triglicéridos y fosfolípidos encontrado en las biopsias seleccionadas de ballenas azules.

	Triglicéridos (%)	Fosfolípidos (%)
466b (Macho)	64	36
482b (Hembra)	70	30
484b (Hembra)	69	31
486b (Hembra)	78	22

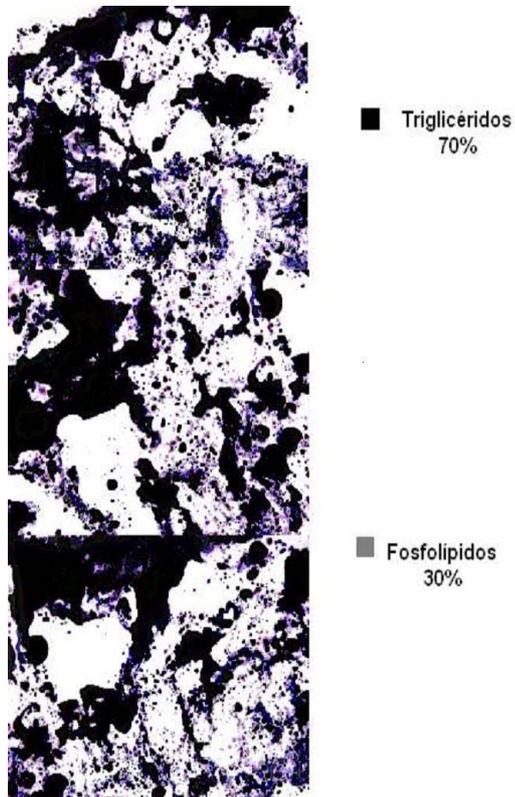


Figura 5. Corte histológico de una biopsia de ballena azul. Los triglicéridos se notan como gotas lipídicas negras y los fosfolípidos se observan como gotas lipídicas grisáceas.

VII.2. Lípidos totales

No se encontraron diferencias significativas ($F_{(3, 46)}=0.4327$, $p>0.05$) en el porcentaje de lípidos totales entre categorías (Fig. 6). Se observa una gran variación en el porcentaje de lípidos totales en cada categoría, las cuales tienen un promedio entre el 30 y 40 % de la grasa total. Tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre años al comparar las hembras no lactantes ($F_{(2, 15)}=1.2319$, $p=.31962$) y los machos ($F_{(2, 15)}=2.7701$, $p=.09466$), que fueron los grupos mejor representados. Por otro lado, se observa una similitud entre las distribuciones de los porcentajes de lípidos para hembras lactantes y machos (Fig. 7).

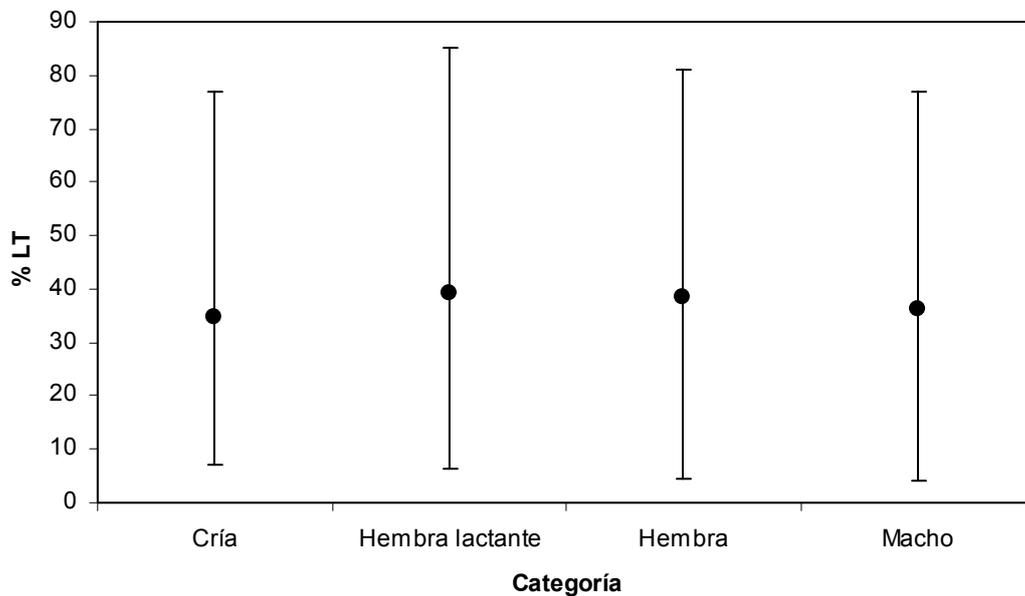


Figura 6. Comparación del porcentaje de lípidos totales (%LT) en grasa subcutánea de las diferentes categorías de ballena azul, agrupando los 3 años de muestreo.

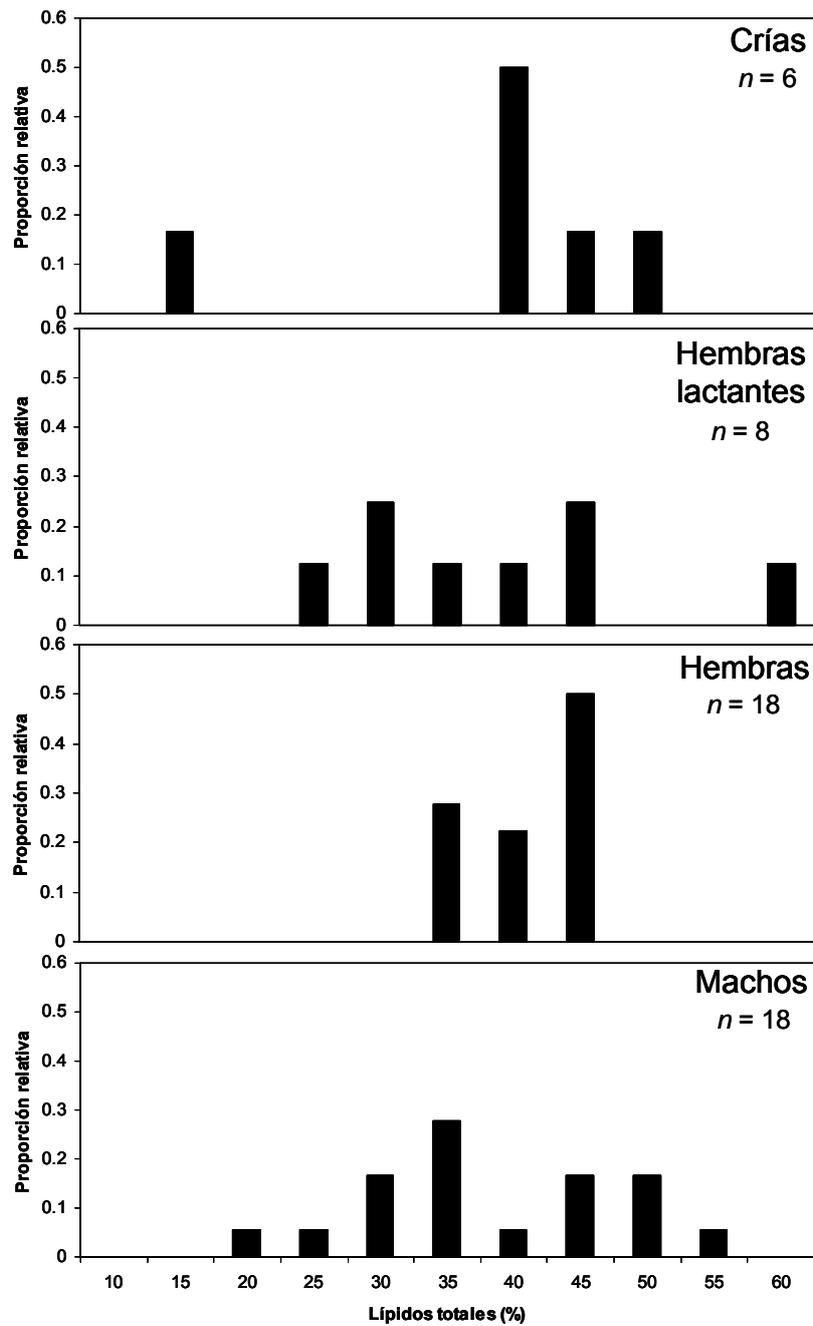


Figura 7. Frecuencias del porcentaje de lípidos totales en biopsias de grasa subcutánea de ballena azul.

VII.3. Ácidos grasos estructurales (polares)

Aunque no hubo diferencias significativas en el contenido de lípidos, se analizaron los ácidos grasos tanto estructurales como de reserva para verificar si había diferencias cualitativas. Se detectaron 34 ácidos grasos estructurales en grasa de ballena azul los cuales separados por su grado de saturación presentan variaciones con respecto a las categorías (Tabla IV). Se encontraron las mayores concentraciones en los ácidos grasos monoinsaturados y las menores concentraciones en los ácidos grasos poliinsaturados en hembras lactantes contrastando con las crías y machos, los cuales presentaron altas concentraciones en los ácidos grasos poliinsaturados. No se observaron diferencias en las concentraciones de ácidos grasos saturados entre las categorías.

Tabla IV. Concentración de los ácidos grasos estructurales divididos en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. La concentración se muestra en porcentaje promedio \pm el intervalo de confianza al 95%.

* = ácidos grasos que muestran diferencias significativas

	Crías	Hembras lactantes	Hembras	Machos
12:0	traza	traza	traza	traza
14:0	1.8 \pm 0.4	2.1 \pm 0.4	1.9 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3
iso14:0	traza	traza	traza	traza
15:0	0.31 \pm 0.05	0.29 \pm 0.05	0.31 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03
iso15:0	traza	traza	traza	traza
16:0	13 \pm 1	13 \pm 1	12 \pm 1	11 \pm 1
iso16:0 *	0.22 \pm 0.05	0.18 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.22 \pm 0.03
16:0tMe *	0.10 \pm 0.05	0.24 \pm 0.07	0.15 \pm 0.04	0.16 \pm 0.04
17:0	1.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
iso17:0 *	0.4 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
A iso 17:0	0.13 \pm 0.05	0.12 \pm 0.04	0.13 \pm 0.03	0.12 \pm 0.03
18:0	15 \pm 2	13 \pm 2	15 \pm 1	15 \pm 1
19:0 *	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
20:0 *	0.8 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
21:0 *	0.16 \pm 0.05	0.35 \pm 0.06	0.35 \pm 0.04	0.29 \pm 0.04
22:0 *	0.9 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
24:0	0.7 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4	0.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2
Σ Saturados	35 \pm 0.3	34.8 \pm 0.3	35.9 \pm 0.2	34.4 \pm 0.2

	Crías	Hembras lactantes	Hembras	Machos
16:1n-7	5 ± 1	5 ± 1	4 ± 1	4 ± 1
17:1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
18:1n-9 *	18 ± 3	23 ± 2	20 ± 2	20 ± 2
18:1n-7	3.7 ± 0.5	4.2 ± 0.4	3.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3
18:1n-5 *	0.22 ± 0.04	0.17 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02
20:1n-9 *	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
20:1n-7 *	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02
24:1n-9	2 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
∑ Monoinsaturados	30 ± 0.7	37 ± 0.6	32 ± 0.6	32 ± 0.6

	Crías	Hembras lactantes	Hembras	Machos
18:2n-6	1.9 ± 0.5	2.5 ± 0.5	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.3
18:3n-3	0.26 ± 0.07	0.26 ± 0.06	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.04
20:3n-6	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
20:4n-6	12 ± 2	9.0 ± 2.0	12 ± 1	12 ± 1
20:3n-3	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
20:4n-3	traza	traza	Traza	traza
20:5n-3	11 ± 2	8 ± 2	9 ± 1	10 ± 1
22:5n-3	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	4 ± 1
22:6n-3	4 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	5 ± 1
∑ Poliinsaturados	33.2 ± 0.5	26.8 ± 0.5	31.2 ± 0.4	34.1 ± 0.4

En los perfiles de ácidos grasos estructurales sólo 2 ácidos grasos fueron exclusivos de este perfil siendo estos el 24:0 y el 24:1n-9 (Tabla IV).

Tomando en cuenta los 30 ácidos grasos estructurales que presentaron concentraciones mayores al 0.1% con respecto al total para cada categoría de ballena azul (Tabla IV), se observó un bajo porcentaje de explicación de los componentes (42.72%) en el ACP (Fig. 8). Sin embargo, se notó la separación de las crías con respecto a las hembras lactantes en el componente 2.

Una hembra lactante (ID 451) se ubicó fuera de ambas agrupaciones siendo los ácidos grasos 18:1n-9 y 16:0 los que contribuyeron en mayor proporción a su separación. Dicha hembra posiblemente modificó la tendencia del ACP y enmascaró algunas diferencias entre grupos. A pesar de que las crías y las hembras lactantes tuvieron diferentes contenidos de ácidos grasos

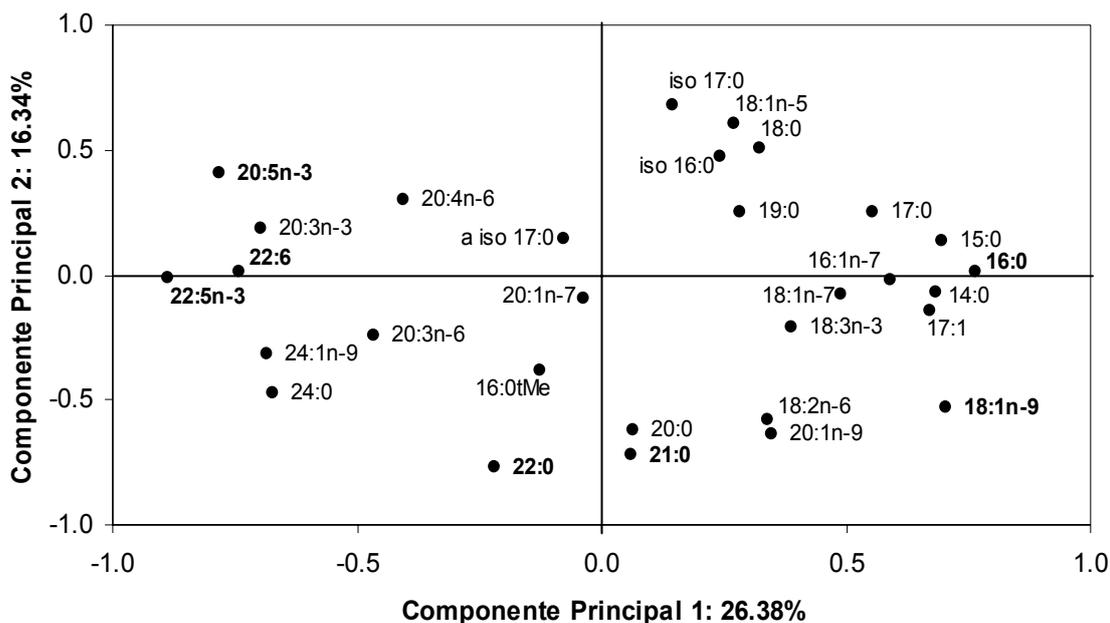


Figura 9. Proyección de las variables en un plano bidimensional. Los ácidos grasos estructurales en negritas son los que contribuyen en una mayor proporción a la separación de grupos.

Estos resultados indican que los ácidos grasos estructurales de la grasa subcutánea no son consistentes entre los individuos de una misma población, ya que la forma en que estos ácidos grasos son fijados en las membranas celulares del tejido graso depende del metabolismo de cada una de las categorías.

Debido a que el ACP es un análisis exploratorio, que no nos indicó las diferencias entre las 4 categorías, se realizó un AFD considerando los 30 ácidos grasos estructurales, mismo que mostró una clara separación entre crías y hembras lactantes con respecto a machos y hembras (Λ de Wilks: 0.01436, $F_{(90,51)} = 1.7992$ $p < .0113$, Fig. 10 y 11). De éstos 30 ácidos grasos, 11 tuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$, Tabla IV).

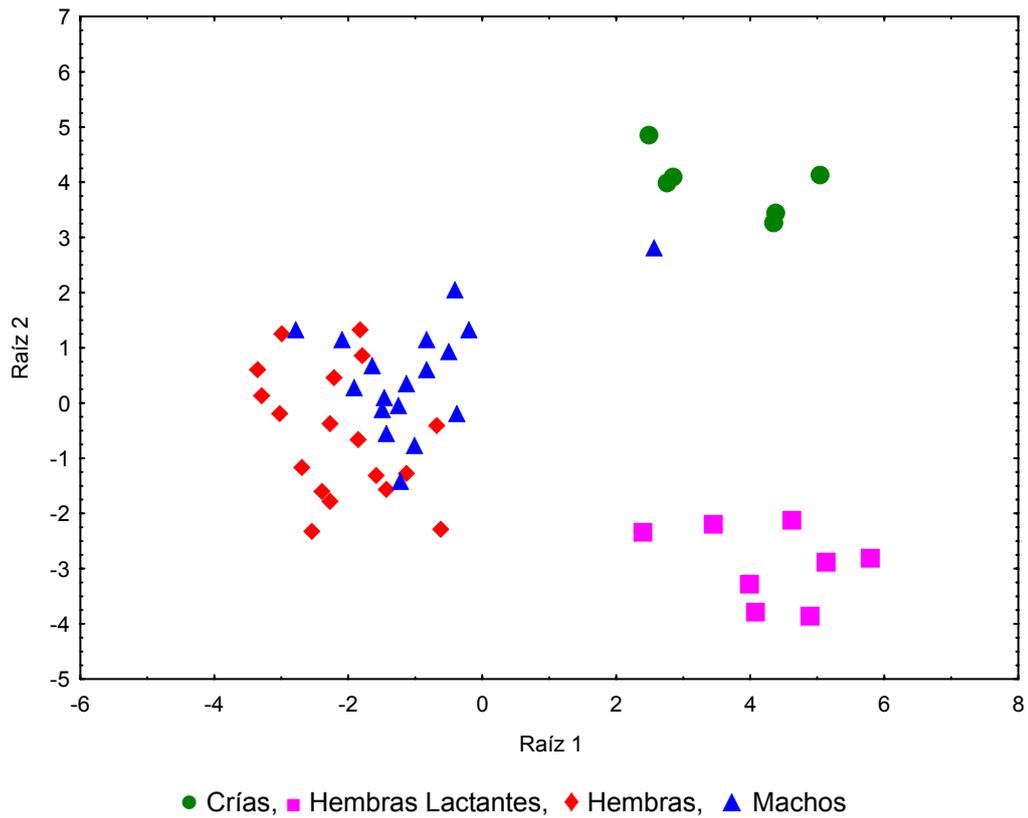


Figura 10. Análisis de funciones discriminantes (AFD) mostrando la separación entre crías, hembras lactantes y el resto de los individuos de ballena azul dada por los perfiles de ácidos grasos estructurales.

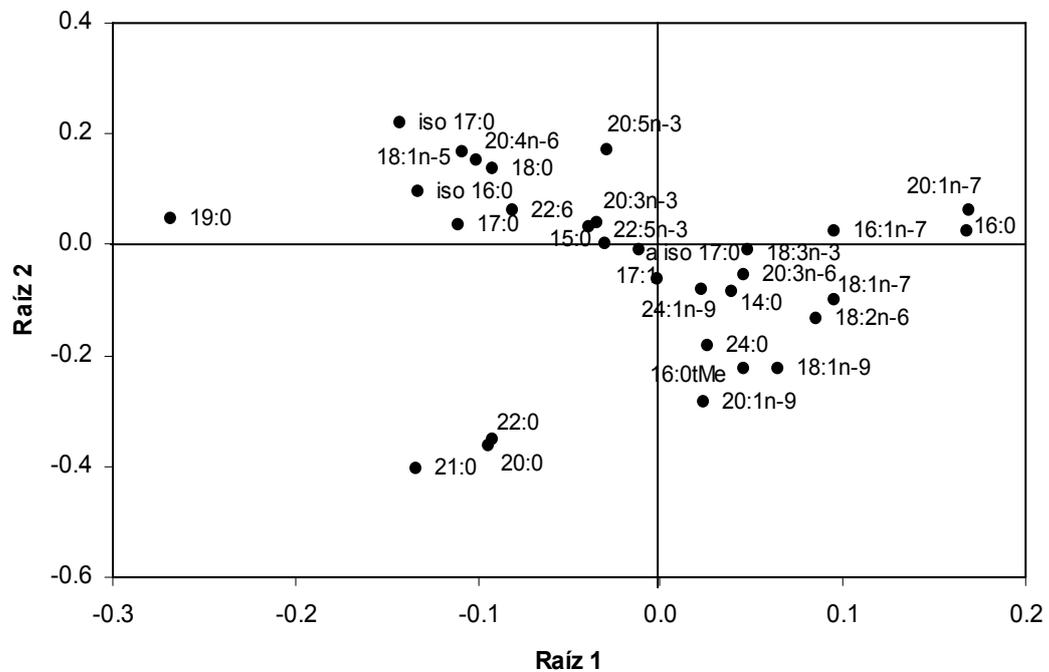


Figura 11. Proyección de los ácidos grasos estructurales en un plano bidimensional.

Se obtuvieron altos porcentajes de clasificación correctos tanto para las crías y hembras lactantes (100 %) como entre hembras (94 %) y machos (78 %, Tabla V). Se observó una menor probabilidad de clasificar a una hembra como macho (6 %) que lo contrario (17 %). Sólo se clasificó erróneamente a un macho como cría (ID 519, ver Anexo 1). Con esto, se limita el uso de los ácidos grasos estructurales, para estudiar las diferencias entre sexos. Es posible que los individuos que quedaron mal clasificados fueron hembras y machos (ID 503, 482, 499) inmaduros ya que fueron avistados por primera vez en el 2005 por lo que no tienen un largo historial de avistamiento (Ver Anexo 1). Por otro lado, otro individuo mal clasificado fue un macho viejo de al menos 16 años (ID 12, ver Anexo 1).

Tabla V. Porcentaje de clasificación por categoría de ballenas azules basado en los perfiles de ácidos grasos estructurales.

	Porcentaje	Crías	Hembras lactantes	Hembras	Machos
	Correcto	p=.12000	p=.16000	p=.36000	p=.36000
Crías	100	6	0	0	0
Hembras lactantes	100	0	8	0	0
Hembras	94.4	0	0	17	1
Machos	77.8	1	0	3	14
Total	90	7	8	20	15

p = probabilidad de clasificación

Dentro de los ácidos grasos estructurales que tuvieron diferencias significativas entre categorías, el 19:0 mostró diferencias significativas donde las crías presentaron menores concentraciones que hembras, y las hembras lactantes menores concentraciones que hembras y machos ($F_{(3, 46)} = 8.6340$, $p=.00012$). El ácido graso 20:1n-9 mostró diferencias significativas entre crías y hembras lactantes, y éstas a su vez presentaron mayores concentraciones que machos ($F_{(3, 46)} = 4.7342$, $p=.00583$) (Fig. 12).

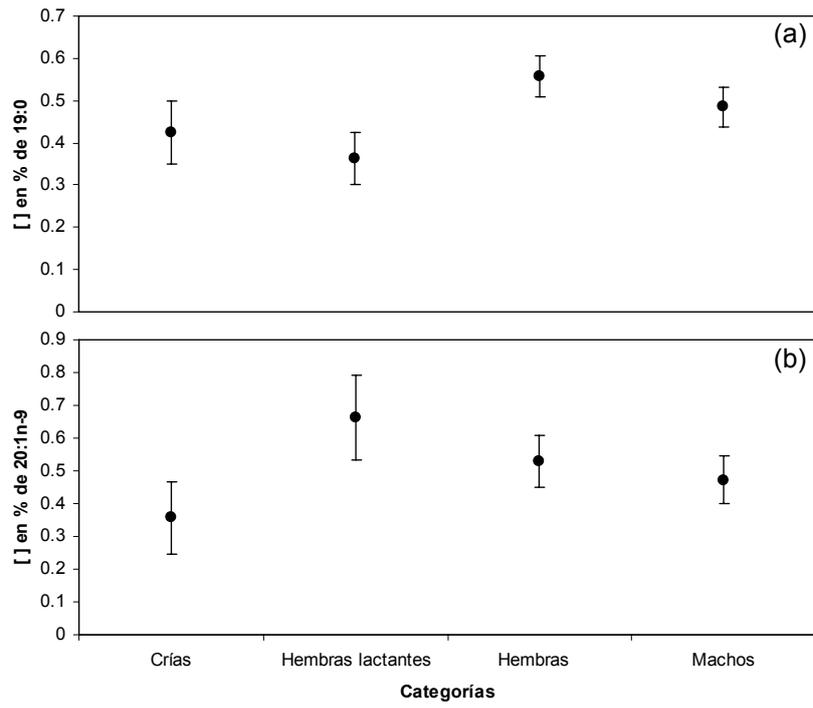


Figura 12. Concentración del ácido graso 19:0 (a) y 20:1n-9 (b) entre categorías de ballena azul.

VII.4. Ácidos grasos de reserva (neutros)

Se detectaron 52 ácidos grasos de reserva en grasa de ballena azul, notando las altas concentraciones en los ácidos grasos monoinsaturados de las hembras lactantes, y en los poliinsaturados de crías (Tabla VI).

Tabla VI. Concentración de los ácidos grasos de reserva divididos en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. La concentración se muestra en porcentaje promedio \pm el intervalo de confianza al 95%.

* = ácidos grasos que presentaron diferencias significativas entre categorías

	Crías	Hembras lactantes	Hembras	Machos
12:0 *	0.09 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01
13:0	traza	traza	traza	traza
iso 13:0	traza	traza	traza	traza
14:0	3.9 \pm 0.4	4.1 \pm 0.4	4.4 \pm 0.3	4.1 \pm 0.2
iso 14:0 *	0.14 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
a iso 14:0	traza	traza	traza	traza
15:0	0.44 \pm 0.07	0.42 \pm 0.06	0.51 \pm 0.04	0.47 \pm 0.04
iso 15:0	traza	traza	traza	traza
16:0	12 \pm 2	11 \pm 2	12 \pm 1	11 \pm 1
iso 16:0 *	0.25 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03	0.29 \pm 0.02	0.28 \pm 0.02
a iso 16:0	traza	traza	traza	traza
16:0tMe *	0.08 \pm 0.05	0.35 \pm 0.09	0.18 \pm 0.04	0.19 \pm 0.04
17:0	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
iso 17:0 *	0.09 \pm 0.02	0.16 \pm 0.03	0.14 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02
a iso 17:0	traza	traza	traza	traza
18:0	1.9 \pm 0.5	2.1 \pm 0.4	2.1 \pm 0.3	2.0 \pm 0.3
19:0	traza	traza	traza	traza
20:0 *	0.06 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
21:0	0 \pm 0	traza	traza	traza
22:0	0 \pm 0	traza	traza	traza
Σ Saturados	19 \pm 0.3	19 \pm 0.3	21 \pm 0.2	19 \pm 0.2

	Crías	Hembras lactantes	Hembras	Machos
14:1	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2
16:1n-9 *	0.26 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.33 ± 0.03
16:1n-7 *	15 ± 2	12 ± 2	12 ± 1	12 ± 1
16:1n-5	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02
17:1	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
18:1n-9 *	22 ± 3	31 ± 3	27 ± 2	25 ± 2
18:1n-7	5.4 ± 0.4	5.7 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.3 ± 0.2
18:1n-5	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02
20:1n-11	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
20:1n-9 *	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1
20:1n-7 *	0.12 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
22:1n-11 *	0 ± 0	0.01 ± 0.02	0.19 ± 0.08	0.10 ± 0.06
22:1n-9	0 ± 0	traza	traza	traza
22:1n-7	0 ± 0	traza	traza	traza
∑ Monoinsaturados	45 ± 0.5	53 ± 0.5	48 ± 0.3	46 ± 0.3

	Crías	Hembras lactantes	Hembras	Machos
16:2n-4 *	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
16:3	traza	traza	traza	traza
18:2n-6 *	1.6 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1
18:2 *	0.18 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.01
18:3n-6 *	0.22 ± 0.06	0.12 ± 0.04	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.03
18:3n-3	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
18:4n-3	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1
20:2n-6 *	0.18 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02
20:3n-6 *	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.01
20:4n-6	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
20:3n-3	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01
20:4n-3 *	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
20:5n-3 *	9 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	7 ± 1
22:2n-5	traza	traza	traza	traza
22:3n-3 *	0.12 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.03
22:4n-6 *	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
22:5n-3	7 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
22:6n-3	11 ± 2	8 ± 2	10 ± 1	11 ± 1
∑ Poliinsaturados	34.4 ± 0.4	26.0 ± 0.3	29.4 ± 0.2	31.8 ± 0.2

Resulta interesante notar algunos ácidos grasos que sólo estuvieron presentes en el perfil de ácidos grasos de reserva siendo estos el 13:0, iso 13:0, a iso 14:0, a iso 16:0, 14:1, 16:1n-9, 16:1n-5, 20:1n-11, 22:1n-11, 22:1n-9, 22:1n-7, 16:2n-4, 16:3, 18:2, 18:3n-6, 18:4n-3, 20:2n-6, 22:2n-5, 22:3n-3 y 22:4n-6.

Tomando en cuenta los 39 ácidos grasos que presentaron concentraciones mayores al 0.1% (Tabla VI) se observó un alto porcentaje (56.07%) explicado por los dos primeros componentes (Fig. 13). También se notó una tendencia de las crías y hembras lactantes a formar grupos opuestos y entremezclados por el resto de las ballenas.

Los ácidos grasos poliinsaturados tuvieron mayores porcentajes en las crías como por ejemplo el 16:2n-4, 20:5n-3, 20:4n-6 y 20:4n-3. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados como por ejemplo el iso 16:0, iso 17:0, 20:0, 16:1n-9, 18:1n-9 y 20:1n-9 tuvieron mayores proporciones en las hembras lactantes (Fig. 14), lo cual es consistente con lo observado en la tabla (Tabla VI).

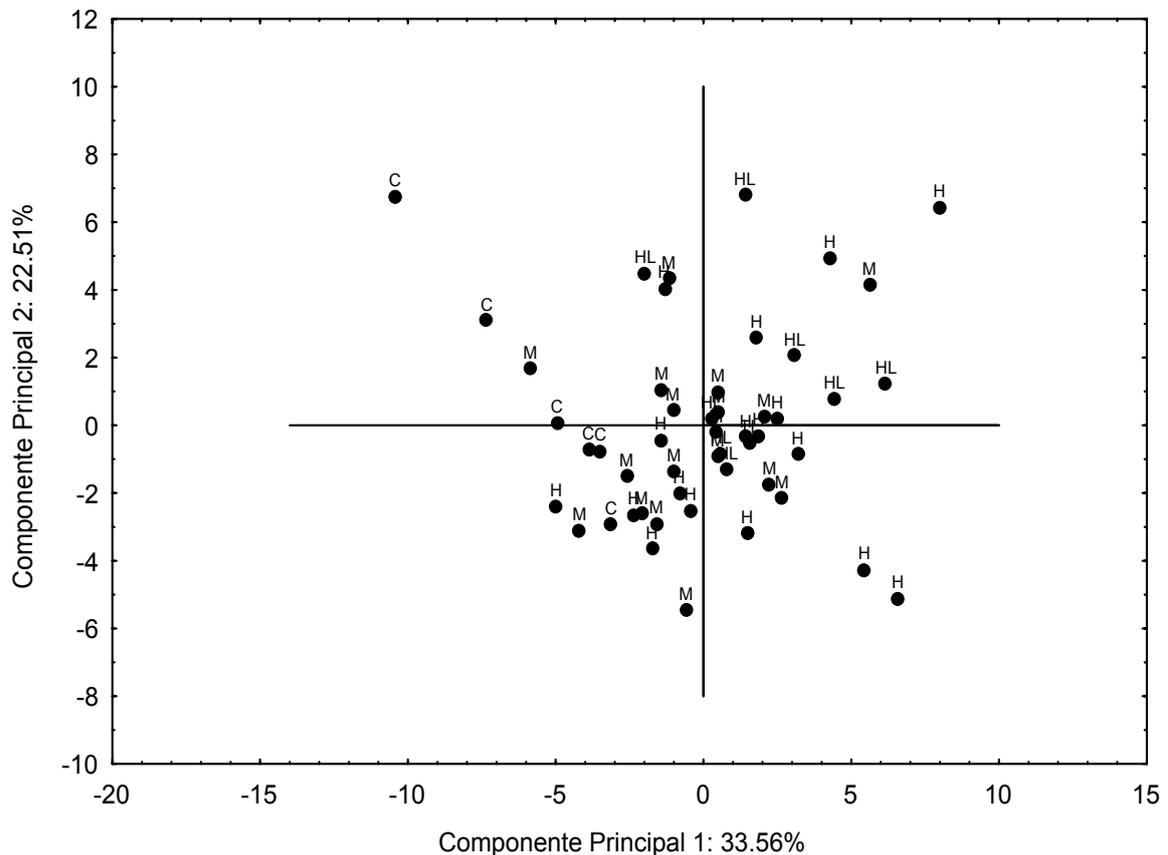


Figura 13. Análisis de componentes principales (ACP) en ácidos grasos de reserva de grasa subcutánea de las cuatro categorías de ballena azul (C: cría, HL: Hembra lactante, H: hembra y M: macho).

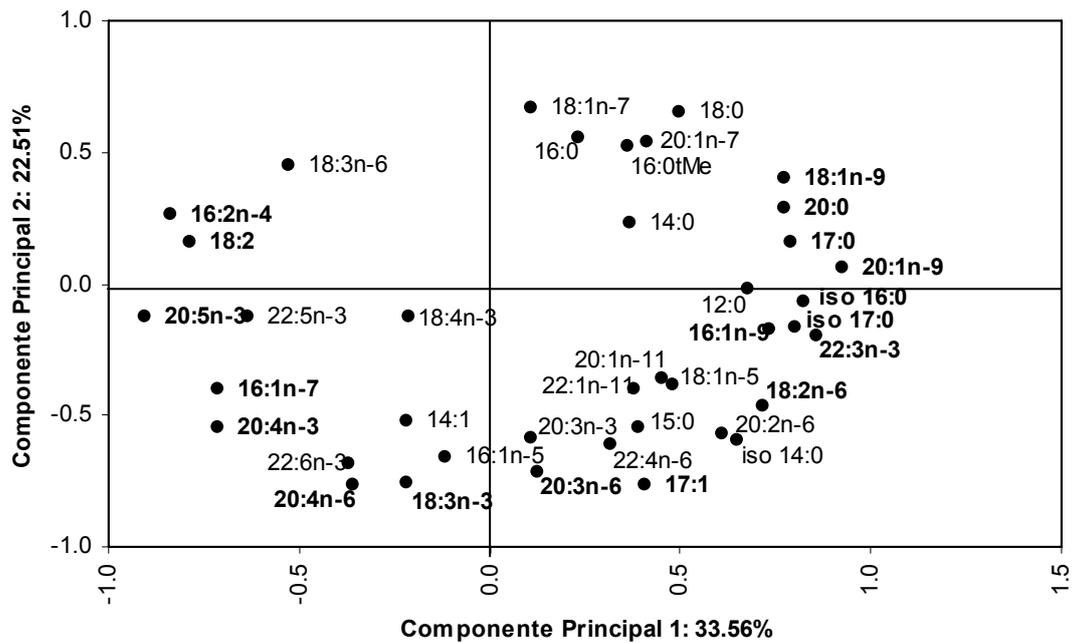


Figura 14. Proyección de las variables en un plano bidimensional. Los ácidos grasos de reserva en negritas son los que contribuyen en una mayor proporción a la separación de grupos.

Se observó una clara separación entre crías y hembras lactantes con respecto a machos y hembras (Lambda de Wilks: 0.00058 aprox. $F_{(117,24)} = 2.3521$ $p < .0078$, Fig. 15 y 16). De los 39 ácidos grasos, 22 de ellos tuvieron diferencias significativas entre categorías ($p < 0.05$, Tabla VI).

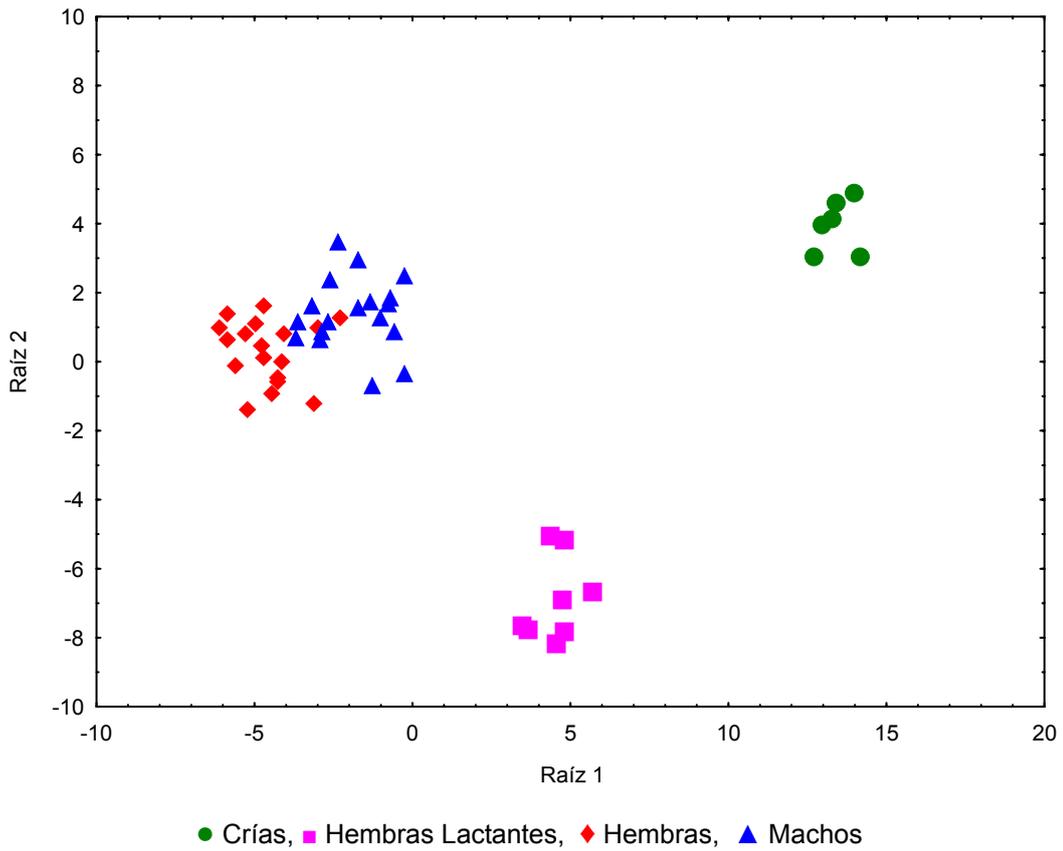


Figura 15. Análisis de funciones discriminantes (AFD) mostrando la separación entre crías, hembras lactantes y el resto de los individuos de ballena azul dada por los perfiles de ácidos grasos de reserva.

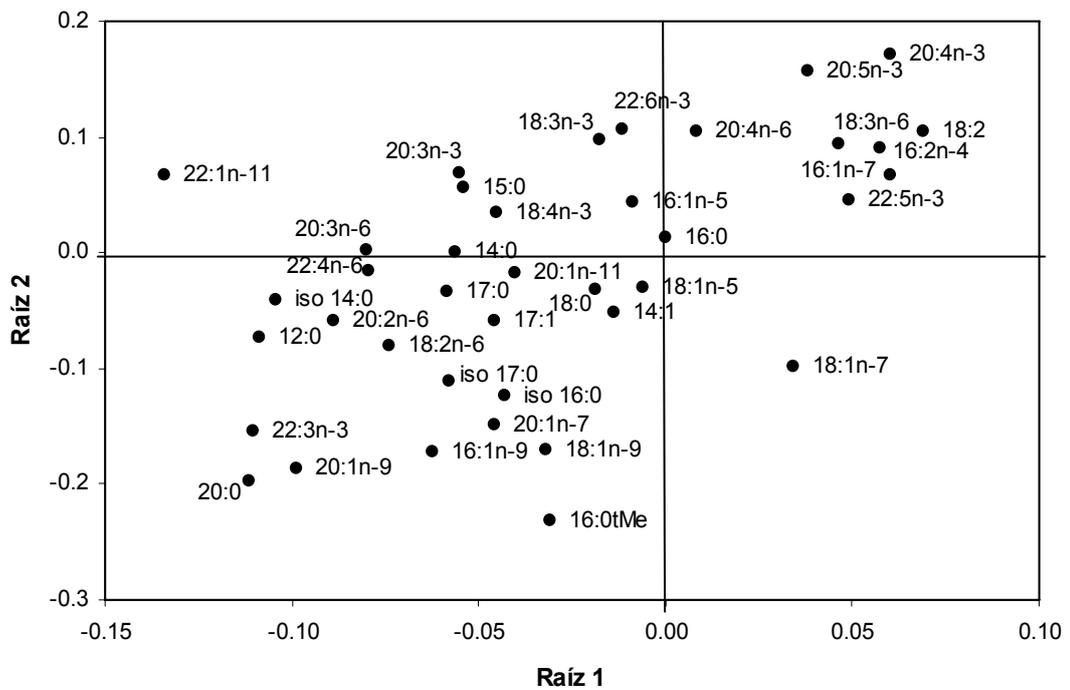


Figura 16. Proyección de los ácidos grasos de reserva en un plano bidimensional.

Se obtuvieron porcentajes de clasificación correctos del 100% para todas las categorías, mostrando que los ácidos grasos de reserva son buenos indicadores del estado fisiológico de las hembras, y que difieren entre crías, hembras y machos (Tabla VII).

Tabla VII. Porcentaje de clasificación por categorías de ballenas azules basado en los perfiles de ácidos grasos de reserva.

	Porcentaje Correcto	Crías p=.12000	Hembras lactantes p=.16000	Hembras p=.36000	Machos P=.36000
Crías	100	6	0	0	0
Hembras lactantes	100	0	8	0	0
Hembras	100	0	0	18	0
Machos	100	0	0	0	18
Total	100	6	8	18	18

p = probabilidad de clasificación

Se encontraron ácidos grasos dominantes como el 16:1n-7 que presentaron diferencias significativas con mayores concentraciones en crías con respecto a las hembras ($p < 0.05$, Fig. 17). Así mismo, se encontraron ácidos grasos esenciales o con una importancia biológica que tuvieron diferencias significativas: 18:1n-9, 18:2n-6, 20:4n-3 (con comportamiento contrario al 18:2n-6), 18:3n-6, 20:3n-6 y 22:4n-6, 20:5n-3 y 22:1n-11 ($p < 0.05$, Fig. 17).

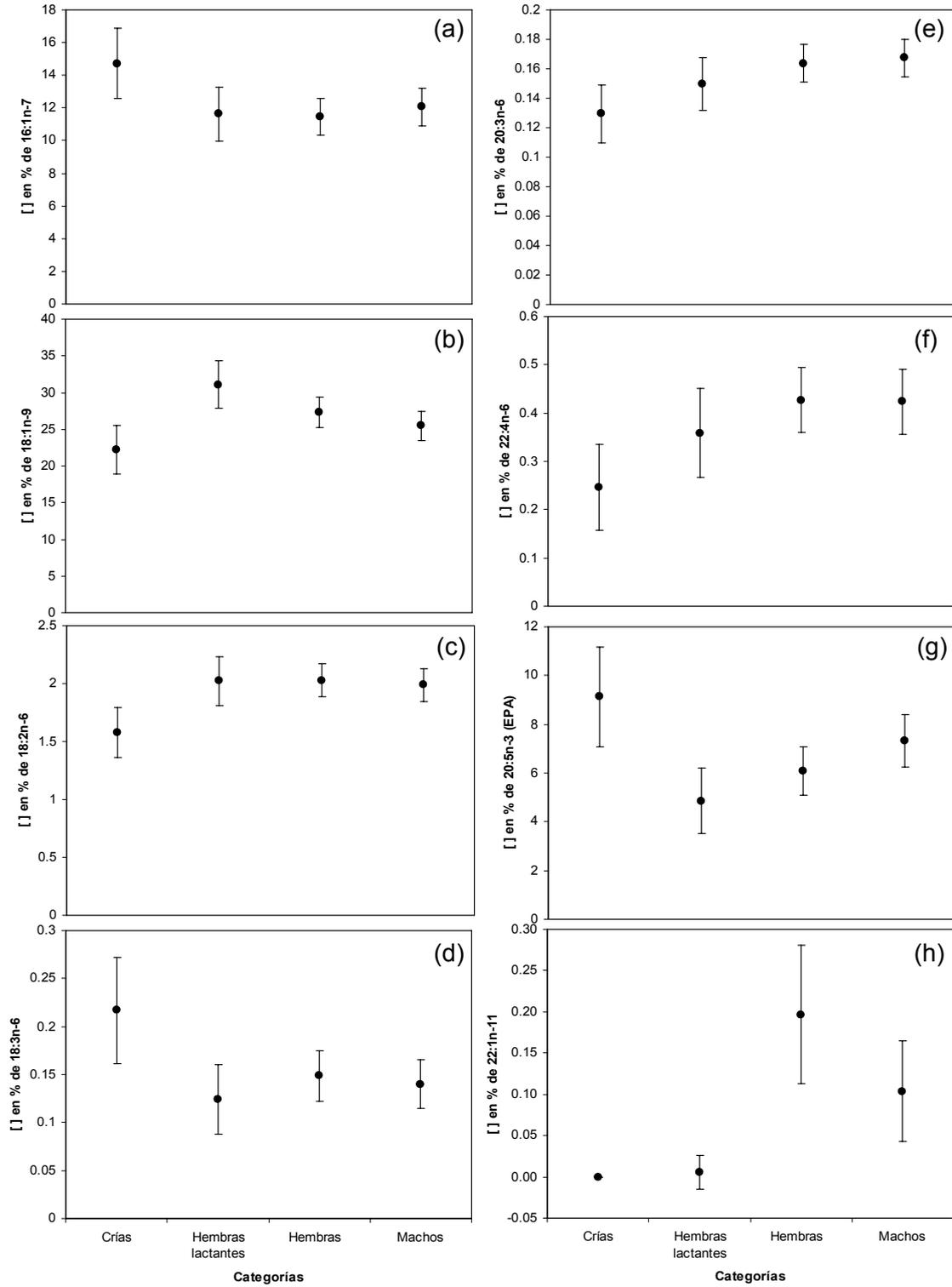


Figura 16. Concentración del 16:1n-7 (a), 18:1n-9 (b), 18:2n-6 (c), 18:3n-6 (d), 20:3n-6 (e), 22:4n-6 (f), 20:5n-3 (g) y 22:1n-11 (h) entre categorías de ballena azul.

VII.5. Relación entre depredador y presa

Se compararon los perfiles completos de los ácidos grasos de reserva de las 4 categorías de ballenas azules (Tabla VI) y de los eufáusidos juveniles indiferenciados, hembras y machos juveniles, hembras gastadas y machos adultos (Anexo 2). Se encontraron altos valores de correlación (R Canónica = 0.912. $J_i^2(20) = 145.73$, $p < 0.05$) entre todas las categorías de los eufáusidos y todas las categorías de ballenas azules, lo que sugiere que existe un reflejo de los ácidos grasos de los eufáusidos en los ácidos grasos de reserva de las ballenas azules, con excepción de los juveniles indiferenciados, con quienes las correlaciones son más bajas (Tabla VIII). La comparación gráfica de los perfiles de ácidos grasos de reserva de ambas especies (todas sus categorías) (Fig. 18) muestra que los ácidos grasos como el 16:0 y el 18:0 están presentes en menores concentraciones en las ballenas azules, mientras que ácidos grasos como el 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7 y 22:5 n-3 son más abundantes en las ballenas azules. Lo anterior nos confirma el análisis de correlaciones canónicas con ciertos ácidos grasos más dominantes en una especie que en la otra.

Tabla VIII. Correlación Canónica entre categorías de ballena azul y estadios de eufáusidos.

R Canónica = 0.912. $J_i^2(20) = 145.73$, $p < 0.05$

		Ballenas Azules			
		Crías	Hembras lactantes	Hembras	Machos
Eufáusidos <i>N. simplex</i>	Juveniles indiferenciados	0.64	0.62	0.64	0.64
	Hembras juveniles	0.69	0.67	0.69	0.70
	Hembras gastadas	0.74	0.71	0.74	0.75
	Machos juveniles	0.74	0.70	0.73	0.74
	Machos adultos	0.73	0.69	0.72	0.73

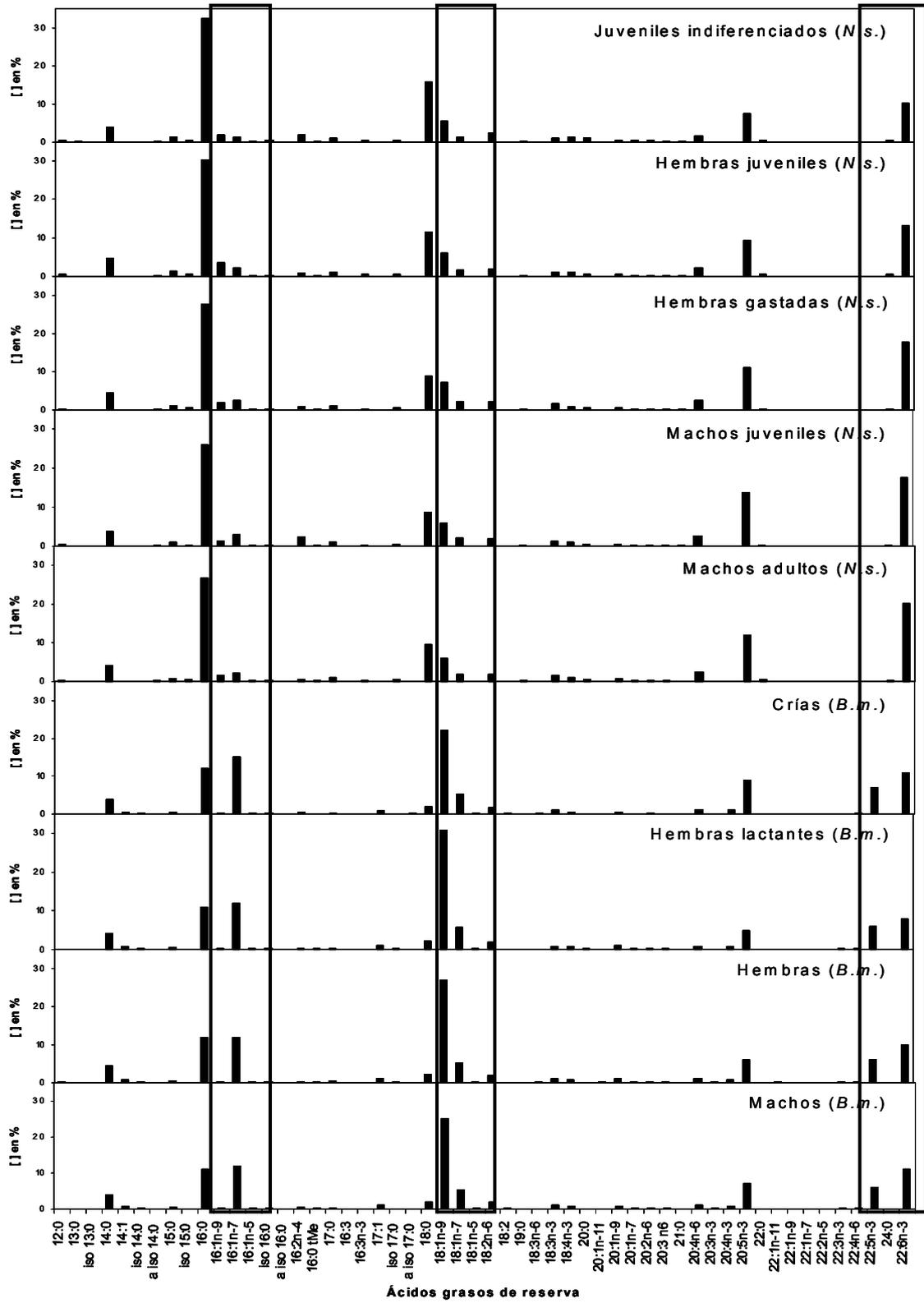


Figura 18. Perfiles de ácidos grasos de reserva de *Nyctiphanes simplex* (N.s.) y *Balaenoptera musculus* (B.m.).

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1. Clases lipídicas

El estudio histológico de la grasa de ballena azul permitió establecer una ausencia de estratificación de las clases lipídicas a lo largo de las biopsias, probablemente debido a que las puntas para obtener biopsias sólo penetran la capa externa de la grasa. Los resultados histológicos en grasa de odontocetos y misticetos varados muestran una clara estratificación a lo largo de la grasa (Ackman *et al.*, 1975b) con distribuciones distintas de las clases lipídicas (Koopman, 2007). Así por ejemplo, para la beluga, la clase lipídica predominante es la de los triglicéridos, mientras que para la orca y algunos zífidos es la de las ceras (Krahn *et al.*, 2004; Koopman, 2007). También existe variación según el sitio de muestreo en el cuerpo del organismo (Cruz-Vizcaíno, 2005) y la profundidad de la capa de grasa que se emplea puede influir en las proporciones de triglicéridos viéndose disminuidas hacia las capas más internas (Krahn *et al.*, 2004). Por lo que aparentemente nuestros resultados no son representativos de la capa de grasa completa.

Sin embargo, el rango del porcentaje de triglicéridos del 65 a 78% encontrados en las biopsias de ballena azul fue similar al porcentaje reportado para otros misticetos en la grasa completa. En ballenas de aleta cazadas, los triglicéridos constituyeron de 80 a 86% de los lípidos totales y no encontraron diferencias significativas entre sitios del cuerpo biopsiado (Ruchonnet *et al.*, 2006). Otros estudios reportan porcentajes similares de triglicéridos (55 a 63%) en grasa de ballena de aleta y sei, *Balaenoptera borealis* (Ackman *et al.*, 1968; Bottino, 1978 tomado de Ruchonnet *et al.*, 2006).

Al parecer esta dominancia de los triglicéridos no es particular de los misticetos, sino que también en algunos odontocetos se encuentran de forma abundante (entre 89 y 100%) (Koopman, 2007). En tres regiones de un cachalote varado, Cruz-Vizcaíno (2005) encontró separados los triglicéridos y fosfolípidos; sin embargo observó una mayor proporción de fosfolípidos en la región caudal, contrario a las regiones cefálicas y media del cuerpo donde los triglicéridos se

encontraron en mayor proporción (75.1% y 76.6% respectivamente). En el presente estudio se encontró una proporción similar en la grasa de ballena azul en biopsias obtenidas de la región media del cuerpo. En este sentido, se ha mostrado que el muestreo de la capa de grasa externa con biopsias en belugas y orcas de vida silvestre provee una buena estimación del porcentaje de lípidos totales de toda la capa de grasa analizada en organismos muertos (Krahn *et al.*, 2004). De acuerdo con lo anterior, las biopsias de grasa de ballena azul recolectadas en el Golfo de California coinciden con la proporción de clases lipídicas encontradas en la capa de grasa completa de otros cetáceos.

VIII.2. Lípidos totales

En este estudio pensamos que el porcentaje de lípidos totales obtenido por medio de biopsias representa el contenido de grasa total de las ballenas azules. Esto debido a que existe un estudio realizado en misticetos del Golfo de San Lorenzo, donde no se encuentran diferencias en el contenido de lípidos en la grasa de animales varados comparado a la grasa proveniente de biopsias (Gauthier *et al.*, 1997).

El presente trabajo corrobora la amplia variación en el porcentaje de lípidos totales (11 a 56%) reportado en ballena de aleta en vida libre (12 a 35%, Ruchonnet *et al.*, 2006). La amplia variación entre individuos de ballena azul fue asociada al estado de lactancia, de crianza, y del sexo, siendo consecuente con otros estudios que demuestran que la condición nutricional afecta el contenido de lípidos además del grosor de la capa de grasa en ballena de aleta capturadas (Lockyer, 1987; Aguilar y Borrell, 1990). Las hembras lactantes de ballena azul probablemente registran una amplia variación en los lípidos totales debido a que están sometidas a diversos requerimientos energéticos que van de acuerdo a su ciclo reproductivo (Aguilar y Borrell, 1990) como podrían ser el inicio o final de la lactancia, y el obtener energía suficiente para amamantar a su cría.

La cantidad de grasa en un mamífero marino varía estacionalmente en la mayoría de las especies debido a variaciones en los niveles de ingesta de alimento que están correlacionadas de alguna manera con la crianza, lactancia,

destete o muda (Birkeland *et al.*, 2005). Aunque las ballenas azules lactantes se siguen alimentando de eufáusidos (*N. simplex* principalmente) en el Golfo de California, éstas muestran fluctuaciones en la cantidad de lípidos probablemente debido al ciclo de la lactancia en el que se encuentran las hembras y la etapa de amamantamiento de las crías al momento de tomar la biopsia. De hecho la amplia variación registrada entre las crías coincide con esta idea. Aunque no se sabe con seguridad cuándo y dónde nacen las crías de ballenas azules en el Golfo de California, se ha notado el amplio rango en el tamaño de las crías durante el invierno (Gendron, 2002) por lo que es muy probable que el nacimiento y por lo tanto la etapa de amamantamiento tenga un amplio rango en el tiempo.

Mientras que Aguilar y Borrell (1990) mencionan que la capa externa de la grasa de ballenas de aleta no permite detectar cambios en el ciclo reproductivo de las hembras, en el presente estudio observamos que es posible distinguir a hembras lactantes de aquellas no lactantes, a pesar de que sólo se cuenta con la capa más externa de la grasa de los animales tomada por biopsias. Adicionalmente, la gran variabilidad en cuanto al porcentaje de lípidos totales sugiere que se estarían reflejando diferencias entre aquéllas hembras lactantes próximas al destete (Lockyer, 1987) y otras que apenas comienzan su fase de lactancia. Las hembras no lactantes tienen un rango de lípidos totales más restringido debido a que no presentan cambios en su ciclo reproductivo en el momento en el que se tomó la biopsia. Es decir, no tienen requerimientos energéticos tan grandes y variables como los presentan las hembras lactantes.

La amplia variación en el porcentaje de lípidos en ballena azul machos contrasta con lo reportado por Aguilar y Borrell (1990), quienes mencionan que en ballena de aleta machos, el contenido lipídico no varía con el estado de madurez sino que forman un grupo homogéneo. Estas ballenas de aleta migran entre Mauritania (22°N) donde se reproducen y Escocia (61°N) donde se alimentan, por lo que tienen un amplio rango de distribución (Aguilar y Borrell, 1990). En contraste, las ballenas azules del Pacífico Noreste se siguen alimentando en invierno en las aguas de la Península de Baja California (Gendron, 2002). En el presente estudio donde están incluidos organismos presumiblemente jóvenes hasta muy viejos, observamos que los machos de ballena azul poseen un rango

de lípidos totales muy amplio, lo que sugiere que en esta población de ballena azul, el contenido lipídico es afectado por la edad.

VIII.3. Ácidos grasos estructurales

Debido a que el presente estudio es pionero en la separación de ácidos grasos de reserva y estructurales en ballena azul, no se cuenta con un marco de referencia para su comparación. Por lo tanto se muestran aquí las primeras tendencias sobre el comportamiento de estos ácidos grasos estructurales cuando se analizan por separado.

La determinación de perfiles de ácidos grasos totales se han usado para evaluar dietas y separar cetáceos provenientes de distintos stocks o ecotipos, (Olsen y Grahl-Nielsen, 2003; Krahn *et al.*, 2004), sin embargo, al ser organismos de vida silvestre, el perfil de ácidos grasos totales no permite diseñar experimentos que indiquen si estas diferencias entre stocks están dadas por la dieta o por la genética propia de cada stock. A pesar de ello es importante recalcar que Krahn *et al.* (2004) menciona que dicha separación entre stocks de belugas y orcas se logró a partir de biopsias de grasa, sin importar la profundidad de la capa que se empleó para la comparación.

Al obtener perfiles de ácidos grasos de reserva y estructurales por separado se pudo precisar en qué ácidos grasos existieron diferencias para poder atribuirlos al alimento o a las características propias del stock. Para las ballenas azules del Golfo de California no se esperaba encontrar diferencias entre temporadas de invierno 2003, 2004 y 2005 o entre áreas de muestreo ni entre individuos, por ser parte de la misma población del Pacífico Noreste.

Nuestros resultados sugieren que los individuos de ballena azul biopsiados entre 2003 y 2005 pertenecen a una misma población, ya que aunque los perfiles de ácidos grasos estructurales fueron distintos entre las categorías, la variación registrada en cada categoría fue baja, ya que la probabilidad de que un individuo quedara mal clasificado fue pequeña. Cruz-Vizcaíno (2005) sugirió que existen dos poblaciones de cachalotes concurrendo en el Golfo de California, ya que

previamente se tenía la hipótesis mediante foto recapturas de que existían grupos de cachalotes en el verano que no estaban presentes en el invierno. Olsen y Grahl-Nielsen (2003) compararon dos poblaciones de ballena minke previamente establecidas por la Comisión Ballenera Internacional, así pudieron probar que los ácidos grasos fueron útiles para diferenciar dichas poblaciones.

La información sobre ácidos grasos estructurales propia de cada categoría de ballena azul, nos indican que estos son metabolizados y fijados en sus membranas celulares en forma particular dependiendo del estado fisiológico y edad de los individuos, y aunque en el caso del sexo se observa una separación, esta no es contundente (menor al 100%). Aún no se conocen las funciones de algunos fosfolípidos de los cuales se derivan los ácidos grasos estructurales (Christie, 1989) por lo que se cree que la existencia de estas diferencias entre categorías podría atribuirse a que estos ácidos grasos son utilizados para distintas funciones fisiológicas como la lactancia o bien para la creación de energía de forma diferencial para cada categoría dependiendo de sus requerimientos energéticos como se observa en las crías. Sin embargo, en virtud de que el tejido de reserva (triglicéridos) es el mayor constituyente de la grasa (70%) en las ballenas azules, no es lógico que se tuviera que movilizar los ácidos grasos estructurales para la obtención de suplementos energéticos.

Uno de los machos (ID 474) estuvo mal clasificado, agrupándose con las crías. Con base a su corto historial de avistamiento (se observó por primera vez al momento de biopsiarlo) este individuo podría ser un macho inmaduro (ver Anexo 1). Sin embargo, en un estudio paralelo sobre concentraciones de organoclorados y pesticidas, Flores-Lozano (2006) determinó este macho como adulto debido a sus altos niveles de contaminantes. Lo anterior indica que existen otros factores diferentes de la edad que intervienen en la semejanza de los perfiles de ácidos grasos estructurales con los de las crías. Esto sugiere que los perfiles de ácidos grasos estructurales probablemente no son buenos para indicar el estado de madurez (cría o joven inmaduro) de un individuo.

VIII.4. Ácidos grasos de reserva

Relación madre-cría

El primer resultado notorio en cuanto a los perfiles de ácidos grasos de reserva fue la relación de éstos entre ballenas azules lactantes y sus crías. En un estudio previo con beluga en cautiverio se mostraron cómo los perfiles de ácidos grasos totales de las crías se asemejaron a los de sus madres conforme fueron creciendo (Birkeland *et al.*, 2005).

Aún desconociendo la edad exacta de las crías de ballena azul se observó a un grupo de crías (ID 505, 425, 455, 478) con perfiles de ácidos grasos más similar a las hembras lactantes, que las crías ID 420 y 454 lo cual sugiere una diferenciación por edad (Fig.19). Además se encontraron mayores concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (como 18:3n-3 y 20:5n-3) en las crías que en las hembras lactantes y el inverso para los ácidos grasos monoinsaturados (como 18:1n-9 y 20:1n-7, Fig. 20) concordando con Birkeland *et al.* (2005) quienes reportaron mayores concentraciones de poliinsaturados y menores concentraciones de monoinsaturados para crías de beluga. Estas relaciones inversas entre ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados nos indican una transferencia diferencial entre los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (Fig. 17) y los ácidos grasos monoinsaturados entre madres y crías de ballena azul. Este mecanismo de transferencia diferencial pareciera tener implicaciones relevantes a nivel metabólico ya que también se ha observado en belugas (Birkeland *et al.*, 2005) y en focas (*Cystophora cristata*) (Iverson *et al.*, 1995).

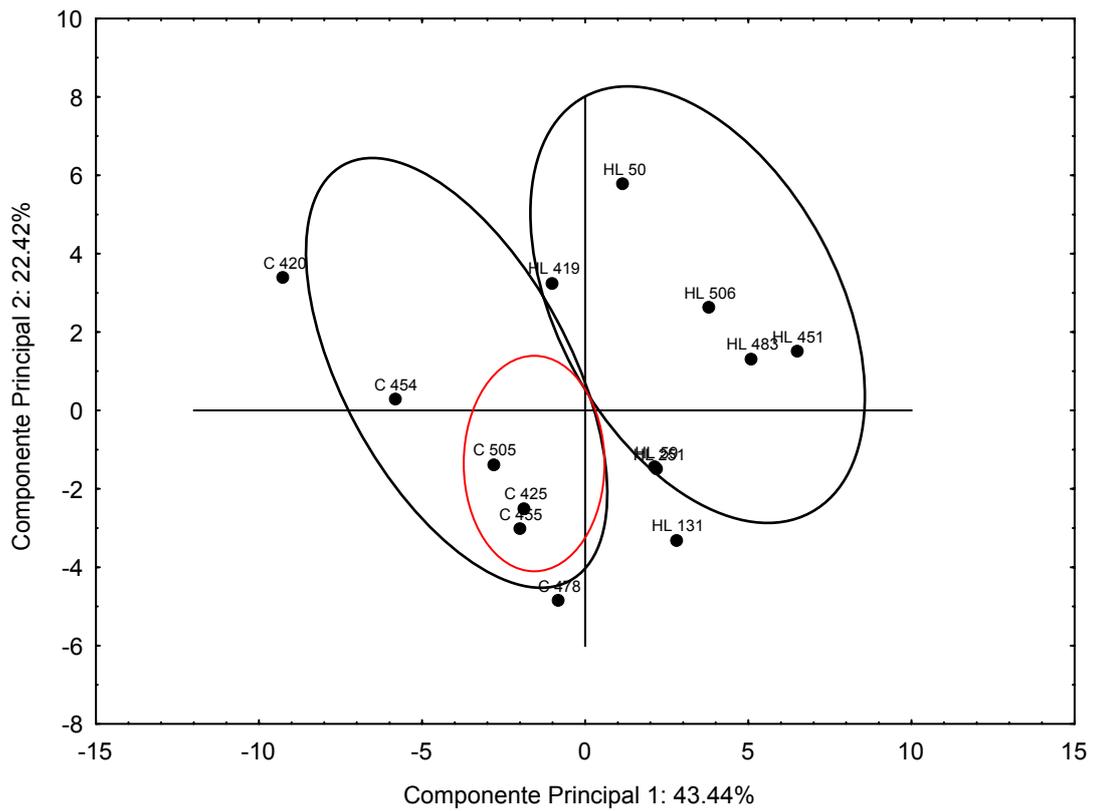


Figura 19. Análisis de componentes principales (ACP) en ácidos grasos de reserva de grasa subcutánea de crías y hembras lactantes de ballena azul.

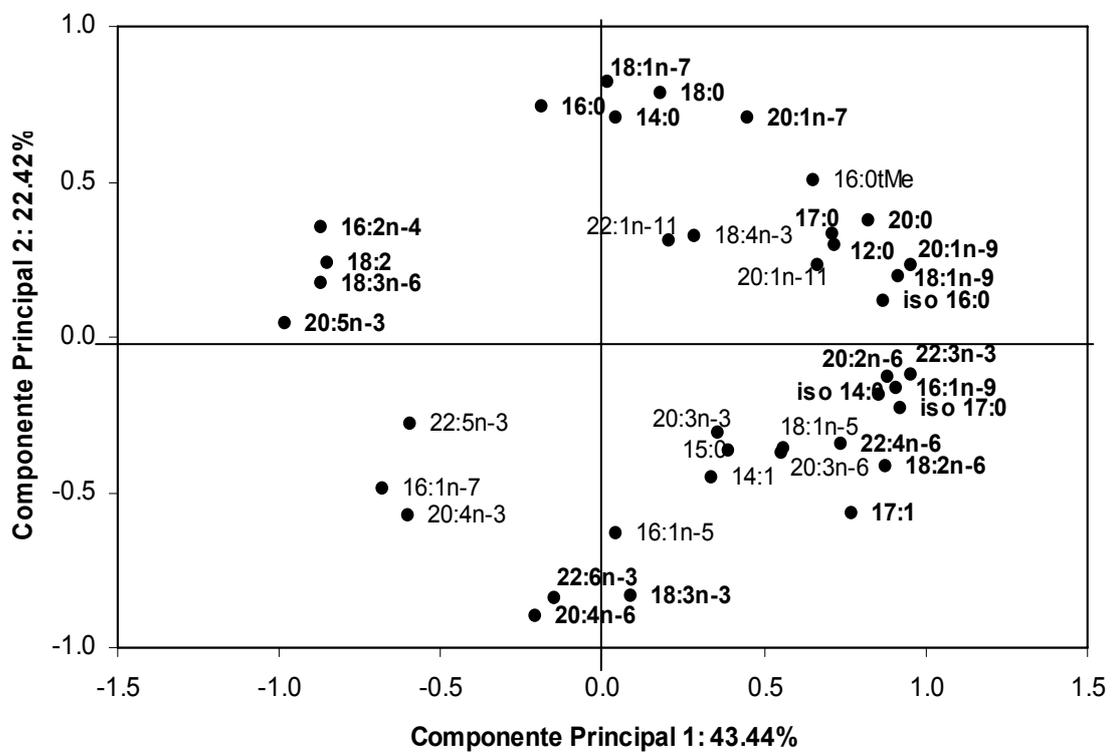


Figura 20. Proyección de las variables en un plano bidimensional. Los ácidos grasos de reserva en negritas son los que contribuyen en una mayor proporción a la separación de crías y hembras lactantes.

Crías, hembras lactantes, hembras y machos

En diversos estudios con misticetos se ha reportado que en la capa externa de mamíferos marinos existe una proporción alta de ácidos grasos monoinsaturados y una baja proporción de poliinsaturados y saturados (Ackman *et al.*, 1965; Lockyer *et al.*, 1984, Olsen y Grahl-Nielsen, 2003). En la capa externa de la grasa de ballenas azules los ácidos grasos monoinsaturados fueron los más abundantes (48%), seguidos por los poliinsaturados (30.4%) y por los saturados (19.5%), coincidiendo con lo encontrado en la capa externa de grasa de ballenas de aleta (Ruchonnet *et al.*, 2006). Es importante señalar que los ácidos grasos monoinsaturados fueron más abundantes en las ballenas azules lactantes como se ha observado en otros estudios con belugas lactantes (Birkeland *et al.*, 2005).

En ballena azul encontramos ácidos grasos dominantes, empezando por el 18:1n-9 (oléico) siendo el más abundante, seguido del 16:1n-7 (palmitoléico), 16:0 (palmítico), 22:6n-3 (DHA), 20:5n-3 (EPA), 22:5n-3, 18:1n-7 (vaccénico), 14:0 (mirístico), 18:0 (esteárico), 18:2n-6 (linoléico) y 20:4n-3. Cabe señalar que de estos ácidos grasos dominantes el 20:5n-3, 18:2n-6 y 20:4n-3 son ácidos grasos esenciales, y que tuvieron diferencias significativas entre las categorías de ballena azul (Tabla VI y Fig. 17), al igual que otros ácidos grasos esenciales como 18:3n-6, 20:3n-6 y 22:4n-6 pero que no fueron dominantes (Tabla VI y Fig. 17). Algunos de estos ácidos grasos dominantes son compartidos con las ballenas de aleta, como el oléico, que fue el ácido graso monoinsaturado dominante, seguido del palmítico, el palmitoléico, el 18:1n-7, el mirístico, el DHA, el 20:1n-9, el esteárico, el linoléico, el EPA y linolénico (Ruchonnet *et al.*, 2006). Lo anterior sugiere que dichos ácidos grasos pudieran ser requeridos o asimilados en las mismas proporciones por ambas especies de misticetos aunque no se alimenten de lo mismo.

Asimismo, estos ácidos grasos tienen una conexión entre sí ya que unos son precursores de otros. El ácido oléico (18:1n-9) por medio de una desaturación da lugar al 18:2n-6, este a su vez origina el resto de los ácidos grasos de la familia omega-6 (ω -6): ácido y linolénico (18:3n-6), ácido dihorno- γ -linolénico (20:3n-6), ácido araquidónico (20:4n-6), ácido adrénico (22:4n-6) y por último el

ácido docosapentaenoico (22:5n-6). Este último es sintetizado a partir del ácido adrenico en cantidades significativas bajo condiciones de prolongada deficiencia de ácidos grasos de la familia omega-3 (ω -3). La familia ω -3 se deriva del ácido α linolénico (18:3n-3) de donde se desprenden las siguientes reacciones: 18:4n-3, 20:4n-3, ácido eicosapentaenoico (20:5n-3), 22:5n-3, 24:5n-3, 24:6n-3 y por último el docosahexaenoico (22:6n-3) (Christie, 1989). La mayor proporción de ácidos grasos de la familia ω -3 en comparación a los de la familia ω -6 en crías (Tabla VI) sugiere que estos son transferidos directamente de las madres vía la leche, ya que al ser esenciales sólo pueden ser obtenidos a partir del alimento, con poca o nula modificación (Iverson, 1993).

VIII.5. Relación depredador-presa

Entre los estudiosos de los mamíferos marinos, no existe un consenso sobre si los ácidos grasos de una presa se reflejan fielmente en su depredador. Mientras algunos autores sugieren la asimilación y acumulación directa de los ácidos grasos de la dieta en la grasa de los misticetos (Ackman y Eaton 1966, tomado de Ruchonnet *et al.*, 2006), otros han encontrado diferencias entre los ácidos grasos de la dieta y la composición de la grasa del depredador, que sugieren que existen importantes cambios en los perfiles de los ácidos grasos durante su asimilación (Olsen y Grahl-Nielsen, 2003). Dichos autores y Hooker *et al.* (2001) concluyen que para determinar la influencia de los ácidos grasos de la dieta en el depredador se debe usar la capa interna de la grasa ya que es más activa metabólicamente en comparación a la externa, por lo que la interna podría reflejar los perfiles de ácidos grasos de la presa de una manera más certera. Incluso se ha observado que en algunas especies como belugas y orcas los perfiles de ácidos grasos de la capa externa e interna no se pueden relacionar con los perfiles de ácidos grasos de sus presas principales (Krahn *et al.*, 2004).

En este trabajo, se demuestra que la grasa de la capa externa de la ballena azul del Golfo de California proporciona un perfil de los ácidos grasos de reserva altamente correlacionado con los perfiles de su presa principal *N. simplex*. Este novedoso resultado contrasta lo anteriormente expuesto sobre las diferencias entre capas de grasas y concuerda con Iverson (1997) quien estipula

que los lípidos del alimento se depositan sin o con mínima alteración en la grasa del depredador.

A pesar de que machos, hembras y hembras lactantes se alimentan de la misma presa en el Golfo de California (*N. simplex*), los perfiles de ácidos grasos de reserva permiten discriminar perfectamente entre estas categorías (Fig. 15) incluyendo a las crías. Es probable que las crías se separen del resto de las categorías ya que su único y principal alimento es la leche que viene directamente de la madre. A pesar de ello, la correlación entre crías y eufáusidos es alta. Iverson (1993) sugiere que la leche se sintetiza a partir de los lípidos que se encuentran en circulación y que sólo son movilizados de la grasa materna en animales que no se están alimentando (en ayuno). Los resultados de este estudio sugieren que las ballenas azules lactantes que se alimentan en el Golfo de California, canalizan de manera directa con pocas alteraciones los lípidos que obtienen de *N. simplex* hacia la glándula mamaria para la síntesis de la leche consumida por las crías. Lo anterior coincide con los resultados de Iverson (1993) en focas y Cupa-Cedillo (2007) en lobos marinos de California.

Como ejemplo tenemos el ácido eicosapentanoico (20:5n-3), un ácido graso importante en el desarrollo y crecimiento de los organismos. En este estudio encontramos pequeñas cantidades de éste en las hembras lactantes movilizándolo hacia la leche que nutrió a las crías, quienes exhibieron altas proporciones de dicho ácido graso (Fig. 17).

En el caso del resto de las categorías de ballena azul (hembras lactantes, hembras y machos, Fig. 15, Tabla VII) la separación clara entre categorías, indica que la composición de ácidos grasos de la grasa no está determinada o regida exclusivamente por la composición de la dieta sino que también está influenciada por aspectos relacionados con las propiedades funcionales y fisiológicas de la propia grasa coincidiendo con Birkeland *et al.* (2005). Esto es, que a pesar de que el alimento es el mismo para las 3 categorías de ballena azul, los ácidos grasos de reserva de *N. simplex* parecen ser asimilados o metabolizados de forma diferencial, dependiendo de los requerimientos energéticos propios de cada categoría (*vgr.* la lactancia).

Por otro lado la segregación geográfica por categoría de ballena podría contribuir a esta separación. La diferenciación entre las ballenas azules lactantes del resto de ballenas coincide con la preferencia de estas hembras por la región costera (Gendron, 2002), las cuales se alimentan de ejemplares de *N. simplex* de mayor tamaño (Mejía-Acosta, 2003). Es probable que los ácidos grasos de los eufáusidos más grandes, con huevos y larvas preponderantes en agregaciones superficiales costeras (Gendron, 1992), se reflejen de forma diferencial en el perfil de ácidos grasos de las ballenas que los consumen. Es probable incluso que los eufáusidos tengan fuentes de alimento distintas entre la zona costera y la oceánica.

El ácido graso 22:1n-11 fue menos concentrado en ballenas azules lactantes y crías con respecto a las demás (Fig. 17), por lo que podríamos pensar que las cantidades en que este ácido graso es sintetizado en ambas categorías son muy bajas, o bien que es metabolizado rápidamente. Otra explicación es que este ácido graso junto con el 20:1n-9 y el 22:1n-9 ocurren en mayores proporciones en la capa interna de la grasa como fue encontrado en beluga (Birkeland *et al.*, 2005) y por lo tanto fue en menores concentraciones en nuestro estudio ya que trabajamos con la capa externa. Incluso es posible que las crías y hembras lactantes tengan una capa de grasa externa más activa en comparación a machos y hembras, y que por lo tanto no logren almacenar grandes cantidades de estos ácidos grasos. En contraste, Ruchonnet *et al.* (2006) encontraron valores más altos de los ácidos grasos 20:1 y 22:1 en la capa externa que en la interna de ballena de aleta, sugiriendo que la capa externa refleja la alimentación a largo plazo ya que el alto contenido de estos ácidos grasos es más propio en los eufáusidos del Atlántico que en los del Mediterráneo, donde se realizó el estudio. Suponemos entonces que el comportamiento de esta clase de ácidos grasos monoinsaturados probablemente sea específico para cada especie.

Por último es importante señalar que aunque el ácido graso 22:1n-11 está presente en las ballenas azules, no lo está en *N. simplex* empleados para las correlaciones. Posiblemente las ballenas azules lo pueden biosintetizar en pequeñas cantidades (Cooper, 2006) o bien lo obtienen de otra fuente de alimento como podría ser los eufáusidos de la región de California (*Euphausia pacifica* y/o

Thysanoessa spinifera), principales presas de la ballena azul en las zonas de alimentación del verano y otoño (Fiedler *et al.*, 1998). Se ha reportado que en embriones de *E. pacifica* y *T. spinifera* (Ju *et al.*, 2006) del sistema de surgencias de Oregon, E.U.A., están presentes los ácidos grasos 20:1 y 22:1 pero en bajas concentraciones e incluso en niveles traza. De igual manera en adultos de *E. pacifica*, del Océano Pacífico en la Bahía Funka en Japón, están presentes ácidos grasos de la familia 20:1 y el 22:1n-9 en bajas concentraciones (Kusumoto *et al.*, 2004).

IX. CONCLUSIONES

La grasa de la capa externa proveniente de biopsias de la región dorsal de ballenas azules está conformada en un 70% por triglicéridos (tejido de reserva) y un 30% de fosfolípidos (tejido estructural) sin presentar un patrón de estratificación definido.

Los lípidos totales contenidos en las biopsias de ballenas azules presentaron una amplia variación entre las categorías y no se encontraron diferencias significativas entre éstas.

La capa más externa de la grasa de las ballenas azules revela una variabilidad conspicua en los perfiles de ácidos grasos estructurales y de reserva, que permite detectar diferencias entre sexo, estado de lactancia y crianza, así como para determinar relaciones depredador-presa.

Los ácidos grasos estructurales encontrados en biopsia de ballena azul sugieren que el metabolismo entre sexos y la condición fisiológica como la lactancia, son factores importantes en la asimilación, almacenamiento y uso de los ácidos grasos estructurales.

Los ácidos grasos de reserva encontrados en biopsia de ballena azul son excelentes indicadores del sexo en adultos, estado de lactancia así como diferenciación de crías con respecto al resto de las categorías.

Los resultados del presente estudio sugieren la existencia de un mecanismo de transferencia de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de reserva de las madres a las crías de ballenas azules.

Existe una correlación estadística entre el perfil de ácidos grasos de reserva del eufáusido *N. simplex* y el perfil de ácidos grasos de reserva de las ballenas azules.

X. RECOMENDACIONES

Es importante realizar análisis histológicos de la grasa de la especie a estudiar ya que sabemos que puede o no existir una estratificación y que las clases lipídicas varían en función de especie y sitio del cuerpo muestreado. Así que es de suma importancia tener un registro de qué parte del animal es empleada y si la grasa proviene de una biopsia o una muestra completa.

Como observamos, los perfiles de ácidos grasos de reserva y estructurales varían dependiendo de la categoría o sexo, por lo que en futuros estudios enfocados a ecología de poblaciones es muy importante saber en qué categoría estaría clasificado un organismo, ya que las conclusiones a las que se puedan llegar dependería de una buena categorización de los individuos.

En cuanto a las relaciones del depredador con su dieta considero que en la medida posible sería útil contar con la capa interna del depredador para ver cómo se refleja el alimento en ésta. Así mismo es esencial contar con las diferentes presas potenciales del depredador para tener una mejor idea de qué clase de alimento se está viendo reflejado en el depredador.

XI. LITERATURA CITADA

Ackman, R.G. & C.A. Eaton. 1966. Lipids of the fin whale (*Balaenoptera physalus*) from North Atlantic waters. III. Occurrence of eicosenoic and docosenoic fatty acids in the zooplankter *Meganyctiphanes norvegica* (M.Sars) and their effect on whale oil composition. *Can. J. Biochem.* 44: 1561-1566.

Ackman, R.G., C.A. Eaton, & S.N. Hooper. 1968. Lipids of the fin whale (*Balaenoptera physalus*) from North Atlantic waters. IV. Fin whale milk. *Can. J. Biochem.* 46: 197-203.

Ackman, R.G., J.H. Hingley, C.A. Eaton, & J.C. Sipos. 1975a. Blubber fat deposition in mysticeti whales. *Can. J. Zool.* 53: 1332-1339.

Ackman, R.G., J.H. Hingley, C.A. Eaton, V.H. Logan, & P.H. Odense. 1975b. Layering and tissue composition in the blubber of the northwest Atlantic sei whale (*Balaenoptera borealis*). *Can. J. Zool.* 53: 1340-1344.

Aguilar, A. & A. Borrell. 1990. Patterns of lipid content and stratification in the blubber of fin whales (*Balaenoptera physalus*). *J. Mamm.* Vol. 71(4): 544-554.

Álvarez-Borrego, S. 1983. Gulf of California in: *Ecosystems of the World 26/ Estuaries and Enclosed seas.* 17: 427-449.

Álvarez-Borrego, S. & Lara-Lara, J.R. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. 555-567. En: Dauphin, J.P. & B. Simoneit (eds). *The gulf and peninsular province of the Californias. Amer. Assoc. of Petrol. Geol. Memoir 47.*

Birkeland, A., K.M. Kovacs, C. Lydersen & O. Grahl-Nielsen. 2005. Transfer of fatty acids from mothers to their calves during lactation in white whales *Delphinapterus leucas*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 298: 287-294.

Bligh, E.G. & W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:910-918.

Borobia, M., P.J. Gearing, Y. Simard, J.N. Gearing & P. Béland. 1995. Blubber fatty acids of finback and humpback whales from the Gulf of St. Lawrence. *Mar. Biol.* 122: 341-353.

Bottino, N.R. 1978. Lipids of the Antarctic sei whale, *Balaenoptera borealis*. *Lipids.* 13: 18-23.

Bradshaw, C.J.A., M.A. Hindell, N.J. Best, K.L. Phillips, G. Wilson & P.D. Nichols. 2003. You are what you eat: describing the foraging ecology of southern elephant seals (*Mirounga leonina*) using blubber fatty acids. *Proc. R. Soc. Lond.* 270: 1283-1292.

Brinton, E. & A.W. Townsend. 1980. Euphausiids in the Gulf of California – the 1957 cruises. *CalCOFI Rep.* 21: 211-236.

Budge, S.M., S.J. Iverson & H.N. Koopman. 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Mar. Mamm. Sci.* 22(4): 759-801.

Calambokidis, J., G.H. Steiger, J.C. Cabbage, K.C. Balcomb, C. Ewald, S. Kruse, R. Wells, & R. Sears. 1990. Sightings and movements of blue whales off Central California 1986-1988 from photoidentification of individuals. *Rep. Int. Whal. Commn. Spec. Iss.* 12: 343-348.

Christie, W.W. 1989. Gas chromatography and lipids. A practical guide. The oily press, Bridgwater, Somerset. 191pp.

Cooper, M.H., S.J. Iverson & K. Rouvinen-Watt. 2006. Metabolism of dietary cetoleic acid (22:1n-11) in mink (*Mustela vison*) and gray seals (*Halichoerus grypus*) studied using radiolabeled fatty acids. *Phys. and Biochem. Zool.* 79(4): 820-829.

Cruz-Vizcaíno, M. 2005. Relación del perfil de ácidos grasos del cachalote (*Physeter macrocephalus*) y el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California. Tesis de Maestría, CICIMAR, B.C.S., México. 72pp.

Cupa-Cedillo, L. 2007. Evaluación de los perfiles de ácidos grasos del lobo marino de California *Zalophus californianus* en estudios de alimentación. Tesis de Maestría, CICIMAR, B.C.S., México. 124pp.

Del Ángel-Rodríguez, J. 1997. Hábitos alimentarios y distribución espacio-temporal de los rorcuales comunes (*Balaenoptera physalus*) y azul (*Balaenoptera musculus*) en la Bahía de la Paz, B.C.S. México. Tesis de Maestría, CICIMAR, B.C.S., México. 68pp.

Engelhardt, F.R. & B.L. Walker. 1974. Fatty acid composition of the harp seal, *Pagophilus groenlandicus* (*Phoca groenlandica*). *Comp. Biochem. Physiol.* 47: 169-179.

Fiedler, P.A., S.B. Reilly, R.P. Hewitt, D. Demer, V.A. Philbrick, S. Smith, W. Armstrong, D.A. Croll, B.R. Terchy & B.R. Mate. 1998. Blue whale habitat and prey in the California Channel Islands. *Deep-Sea Res.* II 45: 1781-1801.

Flores-Lozano, N.A. 2006. Plaguicidas organoclorados y bifenil policlorados como indicadores de la estructura poblacional de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) del Golfo de California. Tesis de Maestría, CICIMAR, B.C.S., México. 94pp.

Folch, J., M. Less & G.H.S. Stanley. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. of Biol. and Chem.* 226: 497-509.

Gauthier, J.M., C.D. Metcalfe & R. Sears. 1997. Validation of the blubber biopsy technique for monitoring of organochlorine contaminants in balaenopterid whales. *Mar. Environ. Res.* 43(3): 157-179.

Gendron, D. 1992. Population structure of daytime surface swarms of *Nyctiphanes simplex* (Euphausiacea: Crustacea) in the Gulf of California, Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 87: 1-6.

Gendron, D. & S.L. Mesnick. 2001. Sloughed skin: a method for the systematic collection of tissue samples from Baja California blue whales. *J. Cetacean Res. Manage.* 3(1): 77-79.

Gendron, D. 2002. Ecología poblacional de la ballena azul, *Balaenoptera musculus*, de la Península de Baja California. Tesis Doctoral. CICESE, B.C., México. 112pp.

Grahl-Nielsen, O. 2004. Fatty acid profiles as natural marks for stock identification. In: Stock identification methods. Academic Press. 239-261.

Grahl-Nielsen, O. & O. Mjaavatten. 1991. Dietary influence of fatty acid composition of blubber fat of seals as determined by biopsy: a multivariate approach. *Mar. Biol.* 110: 59-64.

Gurr, M.I. & J.L. Harwood. Lipid biochemistry. An introduction. Assimilation of lipids by the body, Ch. 1 & 5. pp. 1-9,191-220. Great Britain: St. Edmundsbury Press. pp. 406

Hooker, S.K., S.J. Iverson, P. Ostrom & S.C. Smith. 2001. Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty acid and stable isotope analyses of biopsy samples. *Can. J. Zool.* 79: 1442-1454.

Iverson, S.J. 1993. Milk secretion in marine mammals in relation to foraging: can milk fatty acids predict diet?. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 66: 263-291.

Iverson, S.J., O.T. Oftedal, W.D. Bowen, D.J. Boness & J. Sampugna. 1995. Prenatal and postnatal transfer of fatty acids from mother to pup in the hooded seal. *J. Comp. Physiol. B.* 165: 1-12.

Iverson, S.J., K.J. Frost & L.F. Lowry. 1997. Fatty acid signatures reveal fine scale structure of foraging distribution of harbor seals and their prey in Prince William Sound, Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151: 255-271.

Jangard, P.M. & P.J. Ke. 1968. Principal fatty acids of depot fat and milk lipids from harp seal (*Pagophilus groenlandica*) and hooded seal (*Cystophora cristata*). *J. Fish. Res. Bd Can.* 25: 2419-2426.

Ju, S.J., H.R. Harvey, J. Gómez-Gutiérrez & W.T. Peterson. 2006. The role of lipids during embryonic development of the euphausiids *Euphausia pacifica* and *Thysanoessa spinifera*. *Limnol. Oceanogr.* 51(5): 2398-2408.

Jump, D.B. 2002. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 277(11): 8755-8758.

- Koopman, H. 2007. Phylogenetic, ecological, and ontogenetic factors influencing the biochemical structure of the blubber of odontocetes. *Mar. Biol.* Vol. 151: 277-291.
- Krahn, M.M., D.P. Herman, G.M. Ylitalo, C.A. Sloan, D.G. Burrows, R.C. Hobbs, B.A. Mahoney, G.K. Yanagida, J. Calambokidis & S.E. Moore. 2004. Stratification of lipids, fatty acids and organochlorine contaminants in blubber of white whales and killer whales. *J. Cetacean Res. Manage.* 6(2): 175-189.
- Kusumoto, N., Y. Ando, R. Matsukura & T. Mukai. 2004. Lipid profile of krill *Euphausia pacifica* collected in the Pacific Ocean near Funka Bay, Hokkaido, Japan. *J. Oleo Sci.* 53(1): 45-51.
- Lockyer, C.H., L.C McConnell & T.D. Waters. 1984. The biochemical composition of fin whale blubber. *Can. J. Zool.* 62: 2553-2562.
- Lockyer, C.H. 1987. Evaluation of the role of fat reserves in relation to the ecology of North Atlantic fin and sei whales. Pp. 183-203, in *Approaches to marine mammal energetics* (A.C. Huntley et al., eds.). Special Publication, The Society for Marine Mammalogy, pp. 253.
- Magomaev, A.A. 1966. The effect of some biological factors on the composition of the fat of the Caspian seal. *Ryb. Khoz.* 42: 71-78.
- Marsh, B.J. & B.D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. of Lipid Res.* 7: 574-576.
- Mate, B.R., B.A. Lanerquist & J. Calambokidis. 1999. Movements of north pacific blue whales during the feeding season of southern California and their southern fall migration. *Mar. Mamm. Sci.* 15: 1246-1257.
- Mejía-Acosta, S. 2003. Hábitos alimentarios de ballena azul en el suroeste del Golfo de California, con base en el contenido en heces. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 57pp.
- Olsen, E. & O. Grahl-Nielsen. 2003. Blubber fatty acids of minke whales: stratification, population identification and relation to diet. *Mar. Biol.* 142: 13-24.
- Reilly, S.B. & V.G. Thayer. 1990. Blue whale (*Balaenoptera musculus*) distribution in the Eastern Tropical Pacific. *Mar. Mamm. Sci.* 6: 265-277.
- Roden, G.I. 1964. Oceanographic aspects of the Gulf of California in: T.H. van Andel y G.S. Shore (Eds.). *Marine Geology of the Gulf of California*. American Association of Petroleum Geologists Memoirs No. 3: 30-58.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) Bivalvia: Pinnidae. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S, México. 74 pp.

Ruchonnet, D., M. Boutoute, C. Guinet & P. Mayzaud. 2006. Fatty acid composition of Mediterranean fin whale *Balenoptera physalus* blubber with respect to body heterogeneity and trophic interaction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 311: 165-174.

Samuel, A.M & G.A.J. Worthy. 2004. Variability in fatty acid composition of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) blubber as a function of body site, season, and reproductive state. *Can. J. Zool.* 82: 1933-1942.

Santamaría-del-Ángel, E., S. Álvarez-Borrego & F.E. Müller-Karger. 1994. Gulf of California biogeographic regions based on coastal zone color scanner imagery. *J. Geoph. Res.* 99(C4): 7411-7421.

Sears, R., J.M. Williamson, F.W. Wenzel, M. Bérubé, D. Gendron & P.W. Jones. 1990. Photographic identification of the blue whale (*Balaenoptera musculus*) in the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Rep. Int. Whal. Comm. Spec. Iss.* 12: 335-342.

Stull, J.W., W.H. Brown & G.L. Kooyman. 1967. Lipids of the Weddell seal, *Leptonychotes weddelli*. *J. Mammal.* 48: 642-645.

West, G.C., J.J. Burns & M. Modafferi. 1979. Fatty acid composition of blubber from the four species of Bering Sea phocid seals. *Can. J. Zool.* 57: 189-195.

Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. 4th. Ed. Prentice Hall, USA. 662 pp.

XII. ANEXOS

ANEXO 1. Historial de avistamiento de los individuos de ballena azul con biopsias para este estudio. (C = cría; HL = hembra lactante; H = hembra; M = macho).

Biopsia	ID	Categoría	Fecha de muestreo (mes/año)	1er Año avistada	Edad Mínima (años)	Observaciones
397b	425	C	Mar/2003	2003	< 1	
379b	420	C	Mar/2003	2003	< 1	Cría de 378b
415b	454	C	Mar/2004	2004	< 1	Cría de 416b
417b	455	C	Mar/2004	2004	< 1	Cría de 418b
457b	478	C	Feb/2005	2005	< 1	Cría de 456b.
489b	505	C	Abr/2005	2005	< 1	Cría de 488b.
386b	----	H	Mar/2003	-----	Se desconoce	
387b	334	H	Mar/2003	2001	3	
395b	303	H	Mar/2003	2000	9	Tuvo cría en 1999
462b	303	H	Feb/2005	2000	9	Tuvo cría en 1999
419b	458	H	Mar/2004	2004	>1	
410b	4	H	Mar/2004	1988	16	Tuvo cría en 1988 y 2000.
471b	396	H	Mar/2005	2002	4	
469b	304	H	Mar/2005	2000	6	
484b	175	H	Abr/2005	1997	9	
479b	251	H	Mar/2005	1998	8	Tuvo cría en 2004.
473b	492	H	Mar/2005	2005	>1	
480b	484	H	Mar/2005	2005	>1	
482b	501	H	Abr/2005	2005	>1	
483b	520	H	Abr/2005	2005	>1	
486b	498	H	Abr/2005	2005	>1	
492b	503	H	Abr/2005	2005	>1	
453b	99	H	Feb/2005	1995	15	Tuvo cría en 1995
459b	127	H	Feb/2005	1996	9	Tuvo cría en 2001

						y 2004.
378b	419	HL	Mar/2003	2003	6	
381b	59	HL	Mar/2003	1985	18	Tuvo cría en 1994, 1999 y 2003.
377b	131	HL	Mar/2003	1991	13	Tuvo cría en 1997, 2000 y 2003.
418b	251	HL	Mar/2004	1998	7	
416b	50	HL	Mar/2004	1994	15	Tuvo cría en 1994 y 2004.
488b	506	HL	Abr/2005	2005	6	
456b	451	HL	Feb/2005	2001	10	Tuvo cría en 2001 y 2005.
477b	483	HL	Mar/2005	2005	6	
389b	249	M	Mar/2003	1998	5	
398b	445	M	Mar/2003	2003	>1	
414b	376	M	Mar/2004	2002	3	Cría en 2002.
436b	468	M	Mar/2004	2004	>1	
463b	12	M	Feb/2005	1990	16	
461b	7	M	Feb/2005	1988	18	
481b	486	M	Mar/2005	1997	19	
465b	508	M	Mar/2005	2005	>1	
466b	487	M	Mar/2005	2005	>1	
470b	491	M	Mar/2005	2005	>1	
474b	519	M	Mar/2005	2005	>1	
475b	494	M	Mar/2005	2005	>1	
476b	517	M	Mar/2005	2005	>1	
485b	499	M	Abr/2005	2005	>1	
490b	499	M	Abr/2005	2005	>1	
487b	504	M	Abr/2005	2005	>1	
478b	482	M	Mar/2005	2005	>1	
472b	482	M	Mar/2005	2005	>1	

Anexo 2. Lista de ácidos grasos de reserva reportados para *Nyctiphanes simplex*. Concentración promedio (%) \pm el intervalo de confianza al 95%.

	Juvenil indiferenciado	Hembras juveniles	Hembras gastadas	Machos juveniles	Machos adultos
12:0	0.68 \pm 1.08	0.65 \pm 0.78	0.35 \pm 0.60	0.49 \pm 1.05	0.34 \pm 0.24
13:0	0.15 \pm 0.30	0.12 \pm 0.17	0.10 \pm 0.12	0.13 \pm 0.27	0.09 \pm 0.07
14:0	3.94 \pm 2.63	4.78 \pm 2.30	4.32 \pm 2.00	3.92 \pm 1.16	4.07 \pm 1.53
a iso 14:0	0.38 \pm 0.80	0.29 \pm 0.26	0.34 \pm 0.26	0.23 \pm 0.14	0.30 \pm 0.14
15:0	1.31 \pm 0.93	1.44 \pm 1.55	1.14 \pm 0.68	0.97 \pm 0.55	0.92 \pm 0.20
iso 15:0	0.62 \pm 0.61	0.52 \pm 0.30	0.45 \pm 0.32	0.35 \pm 0.26	0.45 \pm 0.24
16:0	32.42 \pm 14.34	30.22 \pm 6.34	27.71 \pm 3.77	26.17 \pm 7.91	26.81 \pm 2.94
16:1n-9	1.83 \pm 3.82	3.45 \pm 8.26	1.84 \pm 3.70	1.24 \pm 1.33	1.53 \pm 1.01
16:1n-7	1.50 \pm 1.49	2.25 \pm 1.99	2.52 \pm 1.48	2.89 \pm 2.35	2.24 \pm 0.65
16:1n-5	0.36 \pm 0.45	0.27 \pm 0.27	0.26 \pm 0.24	0.27 \pm 0.23	0.19 \pm 0.15
iso 16:0	0.43 \pm 0.31	0.34 \pm 0.21	0.30 \pm 0.14	0.36 \pm 0.25	0.30 \pm 0.08
16:2n-4	1.81 \pm 8.03	0.75 \pm 0.96	0.87 \pm 4.17	2.31 \pm 7.38	0.56 \pm 0.49
16:0 tMe	0.26 \pm 0.28	0.40 \pm 0.44	0.30 \pm 0.23	0.38 \pm 0.38	0.34 \pm 0.16
17:0	1.25 \pm 0.75	1.18 \pm 0.32	1.14 \pm 0.18	1.07 \pm 0.35	1.07 \pm 0.11
16:3n-3	0.50 \pm 0.74	0.54 \pm 1.21	0.27 \pm 0.31	0.34 \pm 0.51	0.20 \pm 0.17
iso 17:0	0.69 \pm 0.72	0.54 \pm 0.27	0.47 \pm 0.23	0.44 \pm 0.22	0.50 \pm 0.24
18:0	15.74 \pm 15.41	11.62 \pm 8.17	8.91 \pm 7.37	8.57 \pm 5.78	9.69 \pm 6.94
18:1n-9	5.49 \pm 7.93	5.98 \pm 5.07	7.12 \pm 4.00	6.10 \pm 3.87	5.97 \pm 1.77
18:1n-7	1.44 \pm 1.09	1.72 \pm 0.91	2.20 \pm 0.92	2.13 \pm 0.77	1.94 \pm 0.62
18:2n-6	2.46 \pm 9.00	1.91 \pm 1.18	2.15 \pm 2.24	1.87 \pm 1.14	1.90 \pm 0.40
19:0	0.40 \pm 0.60	0.35 \pm 0.28	0.35 \pm 0.35	0.32 \pm 0.30	0.31 \pm 0.36
18:3n-3	1.17 \pm 1.14	1.22 \pm 0.87	1.54 \pm 0.85	1.42 \pm 0.71	1.60 \pm 0.69
18:4n-3	1.25 \pm 2.31	0.97 \pm 1.51	0.92 \pm 1.53	1.09 \pm 0.94	1.02 \pm 0.77
20:0	1.05 \pm 2.11	0.61 \pm 0.32	0.62 \pm 1.29	0.59 \pm 0.70	0.46 \pm 0.26
20:1n-9	0.54 \pm 0.38	0.56 \pm 0.47	0.59 \pm 0.27	0.63 \pm 0.33	0.73 \pm 0.32
20:1n-7	0.52 \pm 0.85	0.34 \pm 0.30	0.30 \pm 0.30	0.33 \pm 0.65	0.30 \pm 0.15
20:2n-6	0.48 \pm 1.77	0.35 \pm 0.29	0.34 \pm 0.25	0.31 \pm 0.15	0.37 \pm 0.20
20:3 n6	0.41 \pm 0.83	0.29 \pm 0.21	0.22 \pm 0.16	0.26 \pm 0.24	0.19 \pm 0.17
21:0	0.30 \pm 0.48	0.28 \pm 0.23	0.16 \pm 0.14	0.19 \pm 0.29	0.13 \pm 0.07
20:4n-6	1.67 \pm 1.29	2.19 \pm 1.62	2.64 \pm 1.44	2.68 \pm 1.23	2.51 \pm 1.14
20:5n-3	7.37 \pm 6.09	9.47 \pm 7.15	11.06 \pm 5.90	13.71 \pm 6.92	11.95 \pm 2.86
22:0	0.65 \pm 0.78	0.61 \pm 0.51	0.36 \pm 0.16	0.40 \pm 0.31	0.49 \pm 0.34
24:0	0.56 \pm 0.58	0.63 \pm 0.97	0.38 \pm 0.42	0.28 \pm 0.21	0.37 \pm 0.23
22:6n-3	10.37 \pm 11.02	13.16 \pm 8.38	17.79 \pm 7.04	17.59 \pm 7.16	20.16 \pm 7.45