



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS
ESTRATOS DE LA CAPA DE GRASA (BLUBBER) DE LA
BALLENA GRIS *Eschrichtius robustus* (LILLJEBORG, 1861).

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biología Marina)

Presenta

Domenica Libertad Hernández Aguirre.

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2012

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 09:00 horas del día 27 del mes de noviembre del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Análisis de la composición de ácidos grasos de los diferentes estratos de la capa de grasa de la ballena gris *Eschrichtius robustus*”.

Presentada por el alumno:

Domenica Libertad Hernández Aguirre.

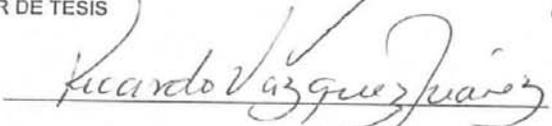
Aspirante al grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina**

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


Dr. Javier Caraveo Patiño,
DIRECTOR DE TESIS


Dr. Aaron Fernando González Córdova,
CO-TUTOR


Dr. Ricardo Vázquez Juárez,
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Javier Caraveo Patiño

Director de Tesis

CIBNOR

Dr. Aaron Fernando González Córdova

Co-Tutor

CIAD

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Co- Tutor

CIBNOR

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Javier Caraveo Patiño

Dr. Aaron Fernando González Córdova

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Javier Caraveo Patiño

Dr. Aaron Fernando González Córdova

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Suplente:

Dr. Juan Gabriel Díaz Uribe

CRIP

RESUMEN

Los mamíferos marinos como la ballena gris *Eschrichtius robustus* poseen un tejido adiposo hipodérmico especializado también llamado “blubber”, el cual entre otras funciones actúa como un reservorio de energía metabólica, al estar constituido principalmente por ácidos grasos integrados en triglicéridos. La composición de este tejido está dada por la interacción de distintos procesos de asimilación, movilización, biosíntesis y transporte de lípidos que ocurren en el organismo, dando como resultado una estratificación vertical diferencial de los lípidos. En las ballenas barbadas (misticetos) el grosor y la presencia de determinados ácidos grasos puede variar dependiendo de la estación del año y de la etapa de vida en el que se encuentran los organismos (ej. madres o crías). En el presente trabajo se seleccionó un método remoto de colecta de biopsias profundas que nos permitió obtener muestras representativas de gran parte de la columna completa del tejido graso de dos grupos de edad: hembras lactantes y crías. Se identificó la composición de ácidos grasos en los diferentes estratos de la capa de grasa y se determinó si existían diferencias entre ambos grupos de edad. Para el grupo de las hembras se lograron describir tres estratos en su capa de grasa: estrato externo (A), estrato intermedio (B) y estrato interno (C). En este grupo los ácidos grasos 16:0 y 18:0, así como HUFAs (EPA, DHA y el ARA) disminuyeron progresivamente las abundancias relativas del estrato interno al externo, mientras que los MUFAs (16:1n-7 y 18:1n-9) presentaron la tendencia opuesta, incrementando sus abundancias relativas hacia el estrato externo. En la capa de grasa de las crías solo se colectaron dos estratos: estrato externo (A) y estrato intermedio (B). El 16:0 y 18:0 presentaron un patrón semejante a las madres, las mayores abundancias relativas se ubicaron en el estrato intermedio y las menores en el externo. Mientras que otros ácidos grasos presentaron un patrón diferente, como el 16:1n-7 y HUFAs, que se presentan en mayor abundancia en el estrato externo disminuyendo su presencia hacia el estrato intermedio, y el 18:1n-9 una mayor abundancia en el estrato intermedio. Las diferencias encontradas en los patrones de abundancia relativas de los ácidos grasos que componen la capa de grasa de las hembras lactantes y crías de ballena gris pueden estar señalando diferencias ontogénicas entre los dos grupos de edad, ya que la modulación de la presencia y acumulación de los ácidos grasos en el blubber está estrechamente relacionada con la historia de vida de los organismos y con los acontecimientos fisiológicos que ocurren durante cada etapa.

Palabras clave: capa de grasa, misticetos, grupos de edad.

ABSTRACT

All the marine mammals possess a specialized hypodermic adipose tissue called “blubber”, which functions as a metabolic reservoir. Different studies suggest that the fatty acid composition of the blubber is a direct consequence of the fatty acid that were consumed in the diet. However, there is evidence, which indicates that the lipid composition of the blubber in marine mammals is strongly regulated by other factors besides diet like: variations in levels in food intake, breeding, lactation and molting; resulting in differences between organisms of different sexes or experiencing different cycles during the life history. The blubber of the cetaceans is characterized for being a fairly well stratified tissue. This stratification might exist because of the constant mobilization and replenishment of fatty acids in the organisms, which are ruled by numerous physiological processes. For that reason we chose a sampling method that allowed us to obtain complete blubber samples, which meant getting deeper portions of the tissue, in order to get representative data. The objective of the present study was to identify the fatty acid composition of the different layers of the blubber of mothers and calves of gray whales, in order to gather information relative to their eco-physiology. We were able to identify three different layers in the blubber of the mothers: outer blubber (A), medium blubber (B) and inner blubber (C). In this group the FA 16:0 and 18:0, as well as the HUFAs (EPA, DHA & ARA) presented higher values from the inner to the outer blubber, while the MUFAs (16:1n-7 & 18:1n-9) appeared in higher amounts in the outer blubber. The blubber of the calves revealed only two layers: outer blubber (A) and medium blubber (B). The SFAs 16:0 and 18:0 showed a similar tendency as the females, being more abundant in the inner blubber and decreasing its values closer to the outer blubber. However the 18:1n-7 and the HUFAs presented the opposite tendency compared to the mothers, accounting for the higher values in the outer blubber. The variation in the relative amounts of certain FAs found in the blubber of the two age groups might be pointing out ontogenetic differences.

Key words: blubber, mysticetes and group of age.

DEDICATORIA

Le dedico este testimonio de progreso académico en mi vida, a las personas cuya presencia me ha impulsado y ayudado a avanzar en mi propia historia.

A mis padres, por enseñarme que el éxito, la libertad y la vida se alcanzan con la conciencia en la mano.

A Arturo, por demostrarme que la vida cobra sentido cuando se hace de ella una aspiración a no renunciar a nada, a valorarlo y disfrutarlo todo.

A mi hermano, por ser un ejemplo de conquistador de metas e ideales.

Al Dr. Javier Caraveo, porque cuando un profesor trabaja para la eternidad, nadie puede decir hasta dónde acabará su influencia.

AGRADECIMIENTOS

Gracias...

A mi director de tesis, el Dr. Javier Caraveo Patiño, por su guía y su infinita paciencia ofrecida durante la construcción de cada palabra y cada idea que ayudó a crear este trabajo.

Al Dr. Aaron González Córdova, por haberme permitido incluirme en su equipo de trabajo y brindarme la asesoría y apoyo necesario para realizar este proyecto.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez, por el apoyo brindado para la elaboración y culminación de este trabajo.

Al Dr. Juan Gabriel Díaz Uribe por apoyarme con la revisión y culminación de mi trabajo.

A la Dra. Belinda Vallejo Galland, por todo el apoyo recibido durante mi estancia en el Laboratorio de Lácteos, y las facilidades otorgadas para la realización de parte de mi proyecto en el CIAD campus Hermosillo, Sonora.

A la M. en C. María del Carmen Estrada Montoya, por el apoyo técnico recibido durante el análisis de las muestras.

A Guillermo García Cortés del CIBNOR, por haber participado en la elaboración del diseño del dispositivo de obtención de biopsias utilizado durante el trabajo de campo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico ofrecido con las becas otorgadas.

A Exportadora de Sal, S. A., por todas las facilidades ofrecidas durante la realización del trabajo en campo.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por la oportunidad de la realización del presente proyecto de tesis.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., por los apoyos logísticos otorgados.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Estratificación de la capa de grasa.....	1
Diferencias en el perfil de la capa de grasa entre sexos y grupos de edad.....	2
ANTECEDENTES.....	3
La ballena gris, <i>Eschrichtius robustus</i> un caso de estudio ecofisiológico.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	5
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Particulares.....	7
MATERIAL Y MÉTODO.....	8
Área de estudio.....	8
Colecta de muestras.....	9
Análisis de laboratorio.....	10
Análisis de ácidos grasos.....	11
Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS.....	15
Obtención de biopsias.....	15
Composición lipídica de la capa de grasa.....	16
Lípidos polares (LP).....	16
Lípidos neutros (LN).....	16
Análisis por clases de ácidos grasos.....	18
Estratificación de la capa de grasa en hembras lactantes.....	20
Estratificación de la capa de grasa de crías.....	28
DISCUSIÓN.....	35
Metodología de muestreo.....	35
Ácidos grasos de la capa de grasa.....	35
Lípidos polares.....	37
Lípidos neutros.....	37
Estratificación de la capa de grasa.....	39
Hembras lactantes.....	40

Crías.....	40
CONCLUSIONES	42
LITERATURA CITADA.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de la Laguna de Ojo de Liebre, BCS.....	8
Figura 2. Esquema del dispositivo de obtención de biopsias.....	10
Figura 3. Submuestras de una biopsia del blubber correspondiente a una hembra lactante.	11
Figura 4. Perfil típico de ácidos grasos en una muestra correspondiente a una cría.	13
Figura 5. Composición de ácidos grasos de reserva (concentración relativa) más abundantes en la columna completa de la capa de grasa de hembras lactantes y crías.	17
Figura 6. Comparación de SFAs (a), MUFAs (b), PUFAs (c), HUFAs (d) entre hembras lactantes (M) y crías (C).....	19
Figura 7. Relación EPA/ARA (20:5n-3/20:4n-6) entre las diferentes biopsias de hembras lactantes (a) y crías (b). Valores promedio (línea media de los diamantes), desviación estándar (líneas horizontales), error estándar (líneas verticales), valores individuales (puntos) y promedio general dentro del grupo de edad (línea horizontal que divide el gráfico a la mitad) y diferencias entre biopsias (círculos).	20
Figura 8. Biopsia de madre lactante “M4” subdividida en tres estratos identificados: A. estrato externo, B. estrato intermedio y C. estrato interno.....	21
Figura 9. Diferenciación entre estratos A y B en cada una de las biopsias de hembras lactantes. Desviación estándar (líneas horizontales), error estándar (líneas verticales), valores individuales (puntos) y promedio general dentro del grupo de edad (línea horizontal que divide el gráfico a la mitad) y diferencias entre estratos de la capa de grasa (círculos).	23
Figura 10. Abundancia relativa de los 7 AGS en los tres diferentes estratos de la capa de grasa correspondiente al subgrupo de hembras lactante “I”. En cada gráfico se señalan la desviación estándar (rayas horizontales), error estándar (líneas verticales), unión de las medias de cada estrato, valores individuales (puntos) y diferencias entre estratos de la capa de grasa (círculos).	26
Figura 11. Abundancia relativa de los 7 AGS en los tres diferentes estratos de la capa de grasa correspondiente al subgrupo de hembras lactante “II”. En cada gráfico se señalan la desviación estándar (rayas horizontales), error estándar (líneas verticales), unión de las medias de cada estrato, valores individuales (puntos) y diferencias entre estratos de la capa de grasa (círculos).	27
Figura 12. Diferenciación entre estratos A y B en cada una de las biopsias de crías considerando los valores del 16:0. Desviación estándar (líneas horizontales), error estándar (líneas verticales),	

valores individuales (puntos) y promedio general dentro del grupo de edad (línea horizontal que divide el gráfico a la mitad) y diferencias entre estratos de la capa de grasa (círculos). 29

Figura 13. Biopsia de cría subdividida en dos estratos identificados: A. estrato externo, B. estrato intermedio. 30

Figura 14. Abundancia relativa de los 7 AGS en los dos diferentes estratos de la capa de grasa correspondiente al subgrupo de crías “i”. En cada gráfico se señalan la desviación estándar (rayas horizontales), error estándar (líneas verticales), unión de las medias de cada estrato, valores individuales (puntos) y diferencias entre estratos (círculos). 33

Figura 15. Abundancia relativa de los 7 AGS en los dos diferentes estratos de la capa de grasa correspondiente al subgrupo de crías “ii”. En cada gráfico se señalan la desviación estándar (rayas horizontales), error estándar (líneas verticales), unión de las medias de cada estrato, valores individuales (puntos) y diferencias entre estratos (círculos). 34

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Número de biopsias obtenidas durante el muestreo y sus longitudes correspondientes.	15
Tabla II. Abundancia relativa promedio y desviaciones estándar del perfil de ácidos grasos en lípidos neutros de grasa subcutánea de hembras lactantes y crías de ballena gris.	16
Tabla III. Series de valores de abundancias relativas del AG 16:0 en los diferentes estratos de las biopsias de hembras lactantes correspondientes a ambos subgrupos.....	21
Tabla IV. Valores de ANOVA de una vía y Welch correspondientes a ambos grupos de hembras lactantes (I y II).	22
Tabla V. Ácidos grasos correspondientes a las biopsias de los subgrupos de hembras lactantes que presentaron estratificación con respecto a la profundidad de la capa de grasa.	24
Tabla VI. Valores de la ANOVA de una vía y Welch correspondientes a la abundancia relativa de ciertos AGS en la capa de grasa de los subgrupos de hembras lactantes I y II.	25
Tabla VII. Valores de la prueba no paramétrica de Wilcoxon correspondientes a la abundancia relativa de los siete AGS en la capa de grasa de los subgrupos de hembras lactantes I y II.	25
Tabla VIII. Series de valores de abundancias relativas del AG 16:0 en los diferentes estratos de las biopsias de crías correspondientes a los subgrupos i y ii.	28
Tabla IX. Valores de ANOVA de una vía.	29
Tabla X. Valores de la prueba no paramétrica de Wilcoxon.....	29
Tabla XI. Ácidos grasos correspondientes a las biopsias de los dos subgrupos de crías que presentaron estratificación con respecto a la profundidad de la capa de grasa. En color rojo los ácidos grasos que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). En color negro se señalan los ácidos grasos cuyas concentraciones no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).	30
Tabla XII. Valores de la ANOVA de una vía y Welch correspondientes a la abundancia relativa de ciertos AGS en la capa de grasa de los subgrupos de crías i y ii.....	31
Tabla XIII. Valores de la prueba no paramétrica de Wilcoxon correspondientes a la abundancia relativa de los siete AGS en la capa de grasa de los subgrupos de crías i y ii.	32

INTRODUCCIÓN

Los mamíferos marinos (e. g. ballenas, pinnípedos, osos polares y delfines) cuentan con un tejido adiposo subcutáneo altamente especializado para sobrevivir en las condiciones impuestas por el ambiente acuático. La estructura de este tejido, comúnmente llamado capa de grasa o “blubber” funciona como un reservorio de energía metabólica (Beck *et al.*, 2000), y puede llegar a representar hasta un 50% del total de la masa corporal (Iverson *et al.*, 2009). Dicho tejido también es responsable de otras funciones como: 1) el aislamiento térmico, 2) flotabilidad y 3) proporciona una forma hidrodinámica corporal (Fish, 2000; Iverson, 2002). En general la composición lipídica del blubber de todos los mamíferos marinos se basa principalmente en ácidos grasos integrados en triglicéridos, moléculas que pueden ser rápidamente metabolizadas durante largos periodos de ayuno, los cuales son comúnmente experimentados por los misticetos o ballenas de barbas durante sus movimientos migratorios (Grahl-Nielsen y Mjaavatten, 1991).

La composición de ácidos grasos en el blubber resulta de la interacción simultánea y coordinada de distintos procesos complejos de asimilación, movilización, biosíntesis y transporte de lípidos que suceden en un organismo, por lo que se ha demostrado que la capa de grasa puede ser un indicador de la composición integral de la dieta a lo largo de un periodo de semanas o meses (Iverson *et al.*, 2004) así como una estructura que aporte información referente al metabolismo de individuos (Grahl- Nielsen *et al.*, 2003).

Estratificación de la capa de grasa

La capa de grasa suele presentar en ciertos grupos de mamíferos marinos, principalmente en cetáceos una estratificación vertical entre la dermis y la masa muscular (Ackman *et al.*, 1975; Koopman, 2001; Grahl-Nielsen *et al.*, 2003; Budge *et al.*, 2008). Koopman y colaboradores (1996) señalaron que la estratificación del blubber implica que existe una tasa de asimilación, movilización y recambio diferencial de ácidos grasos entre los diferentes estratos que la constituyen, cuya posición y concentración de dichas

moléculas a diferentes profundidades contribuyen con las diferentes funciones que este tejido desempeña.

El estrato externo de la capa de grasa, el más cercano a la piel, se considera el más estable debido a su baja tasa de recambio. Este suele almacenar en la mayoría de los casos ácidos grasos de cadena corta (menores de 18 carbonos principalmente) con un punto de fusión más bajo, los cuales se piensa operan como una estructura termorreguladora e incrementan la movilización de AG de este tejido a temperaturas bajas, condición ambiental que podría limitar las reacciones enzimáticas y otros procesos metabólicos (Käkelä y Hyvärinen, 1996; Pond, 1998). En este mismo estrato también suelen ubicarse aquellos ácidos grasos que son sintetizados *de novo* por el organismo (Koopman *et al.*, 1996). Conforme se avanza en la profundidad aumenta la abundancia de los lípidos de mayor importancia metabólica, es decir, de aquellos que forman parte fundamental de las estructuras celulares de los tejidos activos en los organismos. La presencia de dichos ácidos grasos de cadena larga y altamente insaturados, HUFA's por sus siglas en inglés, son consumidos en la dieta y depositados en el estrato interno cercano al músculo, ello podría ser indicador de que este estrato es metabólicamente más dinámico y fisiológicamente más importante para poder llevar a cabo el aprovechamiento de las moléculas almacenadas (Ackman *et al.*, 1975; Lockyer *et al.*, 1984; Koopman, 2007). Lo anterior ha permitido aseverar que los mamíferos marinos limitan importantes y frecuentes actividades metabólicas solo al estrato interno (Koopman *et al.*, 2007).

Diferencias en el perfil de la capa de grasa entre sexos y grupos de edad.

La modulación, presencia y acumulación de los ácidos grasos en el blubber de los mamíferos marinos está estrechamente relacionada con su ecología alimenticia e historia de vida. La composición lipídica se correlaciona con eventos importantes como sus dinámicas alimenticias y reproductivas. En las temporadas de alimentación, cuando el alimento es excedente, ciertos lípidos son almacenados para estar disponibles posteriormente cuando los requerimientos energéticos se incrementen durante la actividad reproductiva (apareamiento, gestación y lactancia) (Fisher y Harrison, 1970; Gaskin *et al.*, 1984, 1992).

Diversas especies de mamíferos marinos han sido estudiadas con el propósito de corroborar posibles diferencias en la composición de la capa de grasa entre sexos y entre diferentes grupos de edad. La información existente en este tópico es escasa en misticetos, la que existe proviene de estudios con algunas especies de odontocetos. Samuel y Worthy (2004) encontraron diferencias entre la composición de ácidos grasos en la capa más interna de machos y hembras en toninas (*Tursiops truncatus*). En delfínidos, otáridos y fócidos también se han registrado diferencias entre los diferentes estratos del blubber de madres. Sin embargo aún falta información que permita saber si dichas diferencias son provocadas por el tipo de dieta o bien por factores fisiológicos (Iverson *et al.*, 1995; Grahl-Nielsen *et al.*, 2005).

ANTECEDENTES

La noción ortodoxa señala que todos los misticetos ayunan durante las migraciones cuando estos se dirigen hacia sus áreas de reproducción, donde ocurre el apareamiento, alumbramiento e inicio de lactancia. Este periodo de ayuno es posible gracias a las reservas energéticas del blubber que deben satisfacer todas las necesidades metabólicas que dichos eventos demandan (Oftedal, 1993).

En distintas especies de misticetos se han encontrado diferencias estacionales con respecto a los tipos de ácidos grasos constituyentes de la capa de grasa, esto sugiere que la composición de este tejido está efectivamente relacionada con las áreas de alimentación que frecuentan las ballenas en las diferentes estaciones del año, y en consecuencia al tipo de presas que consumen en ellas (Budge *et al.*, 2008). En algunos estudios se ha comparado el perfil general de ácidos grasos tanto del estrato interno como del externo con aquel de las presas, y se ha demostrado que el perfil de ácidos grasos del estrato más interno presenta mayor similitud con aquel de la dieta, por lo que se puede aseverar que la movilización temporal y diferencial de ácidos grasos específicos altera los perfiles de estas moléculas en la capa de grasa (Grahl-Nielsen *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2004).

La ballena gris, *Eschrichtius robustus* un caso de estudio ecofisiológico.

La ballena gris, *Eschrichtius robustus*, es la única especie de la familia Eschrichtiidae. Esta especie se caracteriza por tener los movimientos migratorios más largos y prolongados dentro de todos los mamíferos marinos (superiores a los 10000 km). Este movimiento relaciona a los mares de Bering y Chukchi, sus principales áreas de alimentación en verano, con las lagunas costeras de la Península de Baja California (Laguna Ojo de Liebre, Laguna San Ignacio y Complejo lagunar Bahía Magdalena-Almejas) en México, donde ocurre el nacimiento de crías, inicio del periodo lactancia y el apareamiento (Rice y Wolman, 1971).

Cada año durante el verano, las ballenas grises succionan del suelo marino grandes cantidades de anfípodos principalmente de la especie *Ampelisca macrocephala*, la cual domina las comunidades bentónicas de las áreas árticas de alimentación (Highsmith y Coyle, 1990). Dichas presas brindan a esta especie de misticeto los nutrientes y aceites indispensables que requiere para almacenar en su capa de grasa, los cuales le servirán como sustento durante su migración reproductiva.

Sin embargo, evidencia reciente mediante isótopos estables ha demostrado que esta especie consume alimento de las redes tróficas de sus áreas de reproducción e incluso a lo largo de su corredor migratorio (Caraveo-Patiño y Soto, 2005; Caraveo-Patiño *et al.*, 2007). A su vez, información sobre la composición de ácidos grasos de los tejidos activos de esta especie ha sugerido que la migración de la ballena gris y en general de todos los mamíferos marinos podría estar vinculada con la necesidad de satisfacer ciertos requerimientos específicos de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's), particularmente del ácido graso araquidónico (ARA) (Caraveo-Patiño *et al.*, 2009). Estudios recientes con otras especies de ballenas como *Balenoptera musculus*, del Pacífico Noroeste, señalan que estos misticetos tienen una amplia zona de alimentación, la cual incluyen tanto las zonas polares en Alaska, como las regiones de crianza y apareamiento en el Golfo de California y hasta el Domo de Costa Rica (Espino, 2009). Este mismo estudio ha corroborado que el alimento de

diferentes regiones geográficas contribuyen con el llenado de la capa de grasa (Espino, 2009).

Lo anterior conlleva a plantear la incógnita de si este tipo de nutrientes, fisiológicamente importantes para los mamíferos marinos, en particular para los mysticetos, se relacionan con la composición lipídica del blubber en sus diferentes estratos.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de la clara importancia fisiológica del “blubber” en la dinámica reproductiva de los mamíferos marinos, su estructura, composición lipídica y como esta varía entre diferentes especies no es del todo comprendido.

La estratificación que presenta la capa de grasa es por si misma un fenómeno que parece ser universal en los mamíferos marinos, el grado de esta variación parece fluctuar entre las diferentes especies que existen. La sistematización de las similitudes encontradas en todas las especies de mamíferos marinos, sugiere que la composición de la capa de grasa está determinada por los mismos mecanismos (e.g. almacenamiento diferencial entre ácidos grasos, requerimientos diferenciales de ácidos grasos en relación a la edad, sexo y estado reproductivo). Sin embargo, se reconoce que diferentes especies muestran diferencias específicas en cuanto a la composición de ácidos grasos, que obedecen a diferentes factores como su distribución geográfica y grupo taxonómico (Koopman, 2001; Grahl-Nielsen *et al.*, 2003). En el caso concreto de los mysticetos, se ha reportado que los cambios estacionales en la composición de ácidos grasos de su capa de grasa pueden ser atribuidos a las migraciones o cambios en sus sitios de alimentación (Budge *et al.*, 2008).

El análisis de ácidos grasos del blubber de los mamíferos marinos de diversos hábitats resultan útiles para entender la ecología trófica de este tipo de depredadores, ya que estos pueden proveer información acerca de los patrones de alimentación a múltiples escalas espacio-temporales (Iverson *et al.*, 1997), así como el estado nutricional, tasa metabólica y de recambio lipídico de una especie determinada (Ackman *et al.*, 1975).

Además, al ser una herramienta útil para el estudio de las interacciones tróficas entre distintas especies de organismos, también aporta información relacionada con la estructura de los ecosistemas, lo que nos brinda la oportunidad de vincular toda esa información y considerarla en pro de la generación de mejores planes de manejo y conservación del ambiente marino.

Desde 1984 que Bryant y colaboradores comenzaron a realizar los primeros censos de la población de ballenas grises correspondiente al Pacífico Oriental, se ha documentado fluctuaciones anuales en el número de pares de madres y crías de estas ballenas en las principales lagunas de reproducción ubicadas en territorio mexicano. Las causas no son claras a la fecha. Algunos investigadores señalan que el decremento de la productividad de crías de ballena gris puede explicarse en base a fenómenos oceanográficos y atmosféricos como El Niño y La Niña, los cuales alteran la temperatura superficial del mar, obligando a las ballenas a modificar su distribución latitudinal, y convertirse así en una posible causa de su mortalidad (Urbán *et al.*, 2003b). Otros aseveran que los cambios drásticos en abundancia de esta especie son un reflejo del cambio climático y de la disminución de las poblaciones de sus principales presas (*Ampelisca macrocephala*) en las áreas polares del Ártico, incluso han llegado a sugerir que esta población de cetáceos esté muy cerca de exceder la capacidad de carga de dicho ecosistema (Le Boeuf *et al.*, 2000; Perryman *et al.*, 2000, 2010; Moore *et al.*, 2001). Sin embargo el aumento y decremento súbito de las cifras de ballenas de un año con respecto al siguiente, sigue siendo una incógnita, que posiblemente está relacionado con procesos sinérgicos que ocurren en los ecosistemas costeros por los que estos mysticetos transitan, los cuales posiblemente contribuyen de manera muy importante a su nutrición y a la eficiente formación de reservas grasas determinantes para poder favorecer su éxito reproductivo.

HIPÓTESIS

- I. La capa de grasa de los mamíferos marinos y la de la ballena gris refleja la composición lipídica de sus presas, por lo que resulta necesario estudiarla considerando todos los estratos con respecto a su profundidad.
- II. Dado que la composición de ácidos grasos en la capa de grasa de la ballena gris difiere en sus diferentes estratos, los ácidos grasos metabólicamente importantes para sus tejidos activos como el ARA, se ubicará en el estrato interno que tienen mayor movilización de lípidos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar la composición de ácidos grasos en los diferentes estratos de la capa de grasa de la ballena gris *Eschrichtius robustus*.

Objetivos Particulares

- Corroborar si el método de muestreo de biopsias de Reeb y Best (2006) es útil para obtener biopsias completas del blubber de hembras lactantes y crías de ballena gris *Eschrichtius robustus*.
- Identificar y cuantificar lípidos neutros y polares de la capa de grasa de hembras lactantes y crías de ballena gris.
- Determinar si existen diferencias en la composición de ácidos grasos de los lípidos neutros entre los diferentes grupos de edad de ballena gris (hembras y crías).
- Determinar si existen diferencias en la composición de los ácidos grasos en los diferentes estratos de la ballena gris (hembras y crías).

MATERIAL Y MÉTODO

Área de estudio

Los registros históricos señalan que Laguna Ojo de Liebre es el sitio más importante dentro de los litorales mexicanos para la reproducción y crianza de las ballenas grises. Esta se ubica en la costa occidental del estado de Baja California Sur, muy cercana a los límites de la frontera con el estado de Baja California Norte, en el municipio de Mulegé (latitud 28°11'28.46'' N, longitud 114°24'09.88'' O). Es parte de la Reserva de la Biósfera de El Vizcaíno (Figura 1), es un cuerpo de agua hipersalino que cuenta con una extensión aproximada de 36, 600 ha. En general es una laguna somera pero presenta canales de más de 20 m de profundidad cerca de la boca. En sus márgenes hay diversos ambientes como dunas inestables, salitrales, matorrales halófilos, marismas y se caracteriza por poseer ecosistemas de tipo lagunar costero marino, siendo los más representativos los canales de marea o planicies intermareales, ya que su batimetría es muy irregular con una gran cantidad de bajos e islas planas que se hacen evidentes durante las bajamares.

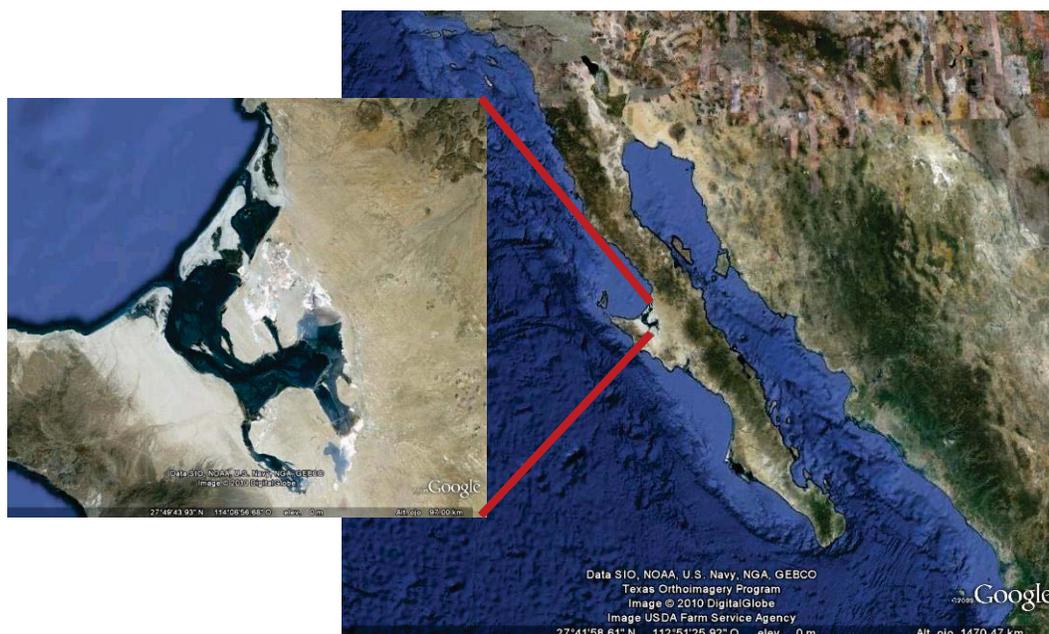


Figura 1. Ubicación geográfica de la Laguna de Ojo de Liebre, BCS.

Colecta de muestras

Durante las últimas dos semanas del mes de febrero del año 2011, se realizaron recorridos utilizando una embarcación con motor fuera de borda en la laguna Ojo de Liebre, B.C.S. para llevar a cabo la colecta de muestras profundas del blubber de hembras lactantes y crías de ballena gris. Los organismos fueron muestreados en la región torácica dorsal, ya que además de ser una de las partes corporales en la que más grasa se acumula, la composición subcutánea del tejido adiposo de esta área parece ser relativamente homogénea a su alrededor, característica consistente en la mayoría de las especies de misticetos.

Debido al grosor y la estratificación que presenta la capa de grasa de la ballena gris (Rice y Wolman, 1971), fue importante seleccionar un sistema de colecta de biopsias que permitiera recuperar el tejido de la capa más profunda del blubber, con el fin de asegurar la obtención del estrato más cercano al músculo, por esta razón se escogió el método descrito por Reef y Best (2006). El cual considera una punta metálica de acero inoxidable hueca, de 20 cm de largo y 0.6 cm de grosor (Figura 2) para las madres y de 10 cm de largo y 0.6 cm de grosor para las crías. En todos los casos se procuró obtener biopsias que abarcaran toda la profundidad del tejido graso de las ballenas, es decir desde la piel hasta la capa más externa del músculo (≈ 20 cm y ≈ 10 cm respectivamente para madres y crías). Las muestras se expulsaron de la punta metálica con ayuda de una varilla metálica esterilizada de punta redondeada.

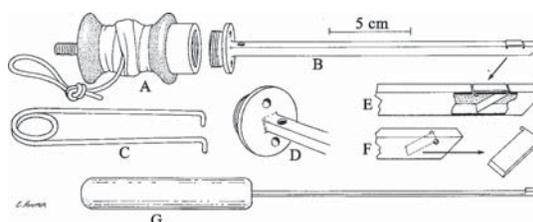


Figura 2. Esquema del dispositivo de obtención de biopsias.

Todas las muestras fueron colocadas en papel aluminio estéril para protegerlas de la luz e introducidas en bolsas estériles individuales etiquetadas y se transportaron en hieleras hasta el laboratorio donde se preservaron en ultracongelación (-80°C) hasta su análisis.

Análisis de laboratorio

De cada una de las biopsias de la capa de grasa colectada, se tomaron submuestras cada centímetro utilizando un bisturí estéril sobre una lámina estéril metálica helada para evitar el descongelamiento de la grasa y que esta sufriera oxidación o bien pérdida de material. Los cortes se llevaron a cabo desde el estrato interno (porción más cercana al músculo), hasta el estrato más externo (más cercano a la dermis) (Figura 3).



Figura 3. Submuestras de una biopsia del blubber correspondiente a una hembra lactante.

Análisis de ácidos grasos

Extracción de lípidos totales

Los lípidos de cada muestra se extrajeron utilizando el método de Folch *et al.* (1957) técnica que ha sido señalada como la más eficiente para la extracción de lípidos de la grasa de diferentes especies de misticetos (Rueda- Flores, 2007; Espino, 2009). Se procuró que cada una de las submuestras pesara aproximadamente 50 mg, y a cada una se le hicieron varios cortes para que penetraran los solventes más fácilmente. Posteriormente se colocó la muestra en un tubo de ensayo pesado previamente. A la muestra se le agregaron 2 mL de cloroformo, 10 μ L del antioxidante BHT (Butil hidroxitolueno) (dependiendo de la cantidad de muestra) y 1 mL de metanol. Con el propósito de desintegrar el tejido se colocaron los tubos en un sonicador con hielo por 20 minutos y finalmente se cambió la atmósfera de los tubos de O_2 a una de N_2 y se taparon con septas de teflón, almacenándolos en estas condiciones en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Para proseguir con la extracción de los lípidos se le agregó 1 mL de agua destilada a cada tubo, agitándose con vortex y sonicándose por 20 minutos. Después se colocaron los tubos balanceados en la centrífuga por 10 minutos a 3.5 rpm a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los lípidos (fase de abajo) se extrajeron utilizando una pipeta Pasteur para cada muestra y se pasaron a un nuevo tubo pesado previamente. Los tubos que contenían el primer extracto se les agregaron 2 mL de cloroformo, y se repitió el procedimiento de agitarlos con vortex,

sonicarlos y centrifugarlos en las mismas condiciones para pasarlos a los tubos correspondientes que ya contenían la primera parte del extracto.

Una vez concluida la extracción, los tubos fueron llevados a sequedad con nitrógeno gaseoso para poder obtener y pesar los lípidos totales (LT) de cada muestra y registrar los valores en una base de datos. Los LT obtenidos de cada submuestra se resuspendieron con 500 μ L de cloroformo para proseguir con la separación de los lípidos neutros o de reserva (LN) y lípidos polares o estructurales (LP).

Separación de lípidos neutros y polares.

Para poder llevar a cabo la separación de las clases de lípidos se optó por utilizar la técnica de goteo constante propuesta por Palacios *et al.* (2001) y Christie, (2003), con algunas modificaciones. Esta metodología fue probada primeramente con una serie de 6 submuestras correspondientes al mismo estrato (misma profundidad) de una muestra de tejido graso de una ballena varada encontrada en el trabajo de campo realizado el presente año, con el propósito de identificar si las modificaciones provocadas al procedimiento original resultaban en la obtención de los mismos ácidos grasos y en las mismas proporciones. Finalmente el procedimiento de separación consistió en la utilización de microcolumnas (pipetas Pasteur) de sílica gel (previamente introducida en un mufla a 300 °C/4 h e hidratada al 6% del peso con agua destilada) y fibra de vidrio. Las microcolumnas con la muestra fueron acopladas a columnas de vidrio de separación que incluía un mecanismo de regulación de flujo. Para obtener las dos clases de se agregaron 6 mL de cloroformo para eluir los lípidos neutros y posteriormente se le agregaron 3 mL de metanol para eluir los lípidos polares. Una vez contenidos los LN y LP en diferentes tubos previamente pesados, se llevaron a sequedad con nitrógeno gaseoso para poder pesarlos y conocer la cantidad obtenida de cada uno.

Derivatización de ácidos grasos.

Los lípidos neutros y polares fueron metil esterificados mediante una derivatización ácida adicionándoles 2.5 mL de HCl:CH₃OH (5:95 v/v) y colocándolos 2.5 h en baño

María a 85 °C en un termo-baño. Los metil-ésteres resultantes fueron extraídos mediante dos lavados con hexano de 1.5 mL cada uno. Las muestras con los metil-ésteres obtenidos fueron inyectados en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 en el Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) ubicado en Hermosillo, Sonora, México.

Cuantificación de los ácidos grasos.

La identificación de los ácidos grasos presentes en cada una de las submuestras se llevó a cabo considerando el tiempo de retención de una mezcla de 37 estándares de metil-ésteres de ácidos grasos SUPELCO. Para su cuantificación se consideró la concentración de todos los ácidos grasos presentes en el perfil y se calcularon las abundancias relativas de cada uno de ellos con respecto al total de ácidos grasos contenidos en cada muestra (Figura 4). Para el análisis general de la composición de ácidos grasos (AG), se seleccionaron únicamente aquellos AG cuya presencia en los tejidos activos fue relevante. A este grupo de moléculas se le denominó “ácidos grasos seleccionados” (AGS).

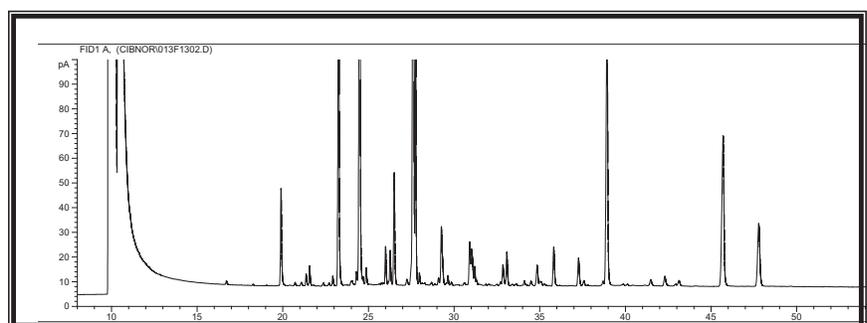


Figura 4. Perfil típico de ácidos grasos en una muestra correspondiente a una cría.

Análisis estadístico

Con la finalidad de identificar diferencias en las concentraciones de los ácidos grasos seleccionados que componen la capa de grasa de los diferentes grupos de estudio (adultos-crías) se realizaron análisis de varianza (ANOVA's). Para aquellas series de datos que no cumplieron con los supuestos de homocedasticidad se realizaron ANOVAs de

Welch, el cual es una alternativa al estadístico F debido a que es poco sensible a la homogeneidad de varianzas. Para los set de datos que no cumplieron con el supuesto de normalidad se utilizaron pruebas no paramétricas de Wilcoxon.

Para poder identificar si existía estratificación en la capa de grasa de hembras lactantes y crías de ballena gris, se tomaron como referencia las biopsias de mayor longitud y más profundas obtenidas para grupo de edad durante el muestreo en campo. La biopsia seleccionada para el grupo de hembras lactantes midió 18.2 cm de largo y se catalogó como “M4”, mientras que para el grupo de las crías se seleccionó una biopsia de 7 cm de longitud, catalogada como “C2” (Tabla 1). De todos los valores correspondientes a la concentración relativa de cada AGS presente en las diferentes submuestras obtenidas a largo de la biopsia se eliminaron los valores extremos o raros. El ácido graso que se seleccionó para tal fin fue el ácido graso saturado 16:0 (ác. palmítico). La razón de usar este ácido como indicador de una posible estratificación dentro de la capa de grasa, se debió a su importancia estructural en los tejidos activos en mamíferos terrestres (Holub, 1978) o marinos (Caraveo *et al.*, 2009).

Posteriormente las series de valores de abundancias relativas del 16:0 correspondientes a las biopsias “M4” y “C2” se sometieron a un promedio móvil de periodo de 3 para el caso de las hembras lactantes y de 2 para el grupo de las crías, ello con el propósito de eliminar la variabilidad a nivel de centímetros y poder identificar patrones de abundancia de este AG (estratos) en relación a la profundidad. Se definió un estrato cuando la abundancia relativa del AG 16:0 se mantenía relativamente constante en diferentes centímetros de la profundidad del blubber. Posteriormente los diferentes estratos se validaron por medio de ANOVAs y pruebas de diferencia de medias *post-hoc* Hsu’s MCB ó “Tukey-Kramer” para identificar los estratos que eran estadísticamente diferentes.

Finalmente se realizaron análisis de varianza para encontrar las diferencias entre las abundancias relativas de los AGS, así como de otras variables originadas al relacionar AGS (ej. EPA/ARA) en los diferentes estratos de la capa de grasa previamente identificados.

Nuevamente se realizaron análisis de diferencias de medias *post-hoc* para detectar cuáles fueron los casos en lo que existieron diferencias significativas.

RESULTADOS

Obtención de biopsias

El método de muestreo remoto de Reeb y Best (2006) fue seleccionado para la obtención de biopsias completas y profundas de la capa de grasa de ballenas gris. Esta metodología permitió recolectar con éxito tejido graso hipodérmico de madres y de crías de *E. robustus* llegando a incidir en áreas profundas (regiones cercanas al músculo) de la capa de grasa obteniéndose un total de 11 biopsias de tejido graso subcutáneo de profundidad considerable ($\approx 18\text{cm}$ en madre y $\approx 7\text{cm}$ en crías) en muy buen estado (Tabla I). Las biopsias fueron obtenidas en dos días consecutivos. Durante el primer día se consiguieron 7 biopsias, entre las 10:00 am a las 13:13 pm, es decir durante 3 horas aproximadamente. En el segundo día se lograron coleccionar únicamente 4 biopsias, entre las 12:14pm a la 13:35pm, durante una hora y media aproximadamente.

Tabla I. Número de biopsias obtenidas durante el muestreo y sus longitudes correspondientes.

Grupo de edad	Clave	Hora de muestreo	Longitud de la biopsia (cm)
Cría	C1	10:30	5.0
Cría	C2	11:55	7.0
Cría	C3	12:39	6.3
Cría	C4	12:14	5.8
Cría	C5	12:37	5.5
Madre	M1	11:05	12.0
Madre	M2	12:05	13.5
Madre	M3	12:47	15.0
Madre	M4	13:13	18.2
Madre	M5	12:30	13.5
Madre	M6	13:35	12.0

Composición lipídica de la capa de grasa

Los resultados de este trabajo señalan que el tejido graso hipodérmico de las ballenas grises está constituido principalmente por lípidos de reserva o lípidos neutros (80%) y en una proporción más pequeña por lípidos estructurales o también llamados lípidos polares (20%).

Lípidos polares (LP).

Tanto en crías como en hembras lactantes se identificaron 31 ácidos grasos. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) correspondientes a la abundancia relativa de cada molécula entre los dos grupos de edad (hembras lactantes y crías).

Lípidos neutros (LN).

En ambos grupos de edad se identificaron 31 ácidos grasos correspondientes a los lípidos de reserva, de los cuales 7 fueron AGS (16:0, 18:0, 16:1n-7, 18:1n-9c, 20:4n-1 20:5n-3, 22:6n-3), por ser de los más abundantes en el tejido graso y porque coinciden con los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de las membranas plasmáticas de los mamíferos marinos (Christie, 2003; Caraveo *et al.*, 2009).

Tabla II. Abundancia relativa promedio y desviaciones estándar del perfil de ácidos grasos en lípidos neutros de grasa subcutánea de hembras lactantes y crías de ballena gris.

Ácido graso	Hembras lactantes	Crías
	SFA	
12:0	0.23 ± 0.10	0.11 ± 0.21
13:0	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
14:0	4.08 ± 0.35	3.15 ± 0.36
15:0	0.57 ± 0.08	0.53 ± 0.09
16:0	13.54 ± 0.95	12.79 ± 1.33
17:0	0.60 ± 0.20	0.55 ± 0.16
18:0	3.52 ± 0.40	3.46 ± 0.70
20:0	0.35 ± 0.28	0.34 ± 0.27
21:0	0.02 ± 0.03	0.10 ± 0.07
22:0	0.40 ± 0.31	0.95 ± 0.35
23:0	0.79 ± 0.10	0.86 ± 0.19
24:0	0.04 ± 0.05	0.00 ± 0.00
Σ SFA	24.15 ± 2.85	19.05 ± 3.07

MUFA		
18:2n-6t	0.04 ± 0.15	0.22 ± 0.39
18:2n-6c	2.06 ± 0.76	1.50 ± 1.23
18:3n-6	0.10 ± 0.09	0.00 ± 0.00
18:3n-3	1.80 ± 0.39	1.21 ± 0.34
20:2	1.47 ± 0.18	0.79 ± 0.18
20:3n-3	0.02 ± 0.03	0.05 ± 0.09
22:2	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
∑ PUFA	5.50 ± 1.61	3.75 ± 2.23
HUFA		
20:4n-6	0.89 ± 0.12	1.13 ± 0.23
20:5n-3	10.11 ± 0.93	10.85 ± 1.14
22:4n-6	5.91 ± 0.95	5.84 ± 0.63
22:6n-3	2.28 ± 0.45	2.51 ± 0.27
∑ HUFA	19.19 ± 2.45	20.33 ± 2.27
∑ n-3	14.22 ± 1.80	14.62 ± 1.85
∑ n-6	8.99 ± 2.07	8.68 ± 2.49
∑ n-3/n-6	1.58 ± 0.87	1.68 ± 0.73
EPA/ARA	11.39 ± 7.87	9.63 ± 4.86
EPA/DHA	4.43 ± 2.03	4.32 ± 4.29

El perfil de los LN más abundantes de la capa de grasa de hembras lactantes y de crías se presentó muy similar de manera global (Figura 5), por lo que se buscaron relaciones entre los ácidos grasos y se analizaron por separado cada clase de ácidos grasos: saturados “SFA”, monoinsaturados “MUFAs”, poliinsaturados “PUFAs” y altamente insaturados “HUFAs” para ver si existían diferencias entre grupos de edad.

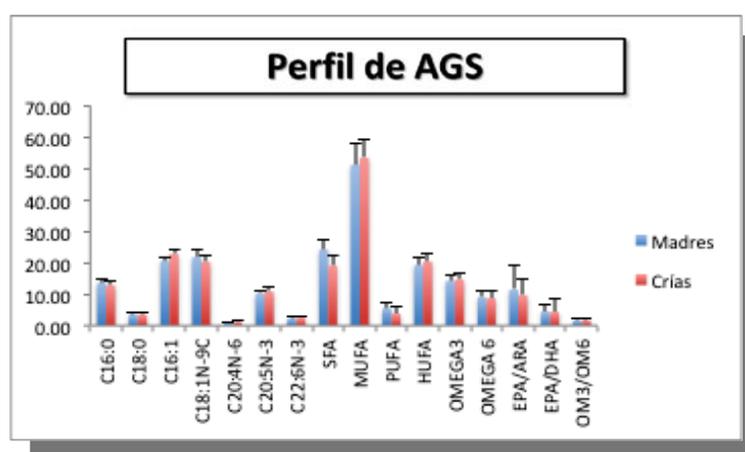
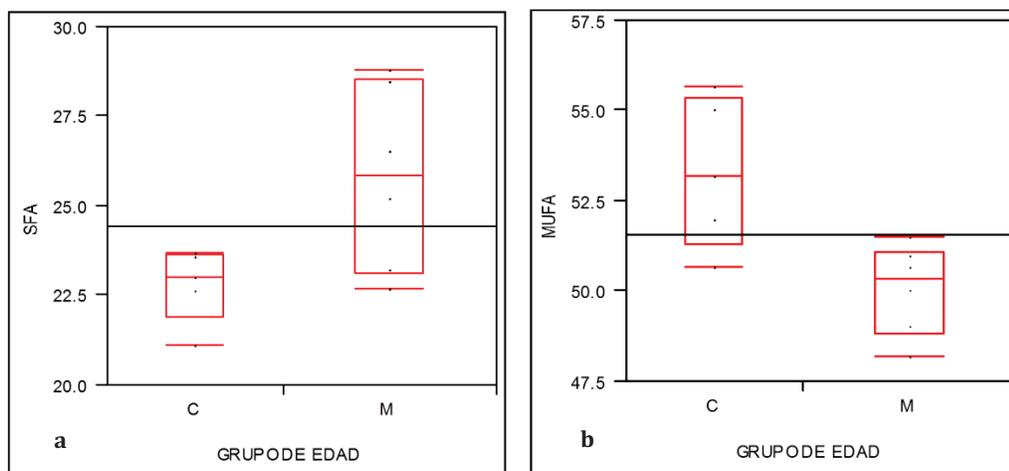


Figura 5. Composición de ácidos grasos de reserva (concentración relativa) más abundantes en la columna completa de la capa de grasa de hembras lactantes y crías.

Análisis por clases de ácidos grasos.

En la Figura 6 se muestran los análisis de cajas con bigotes realizados para cada una de las clases de ácidos grasos. Los SFAs (Welch ANOVA, $F_{(1, 6.8)}=6.82$, $P= 0.038$) y MUFAs (ANOVA $F_{(1,9)}= 10.29$, $P= 0.010$) fueron los únicos que mostraron diferencias significativas entre madres y crías ($P<0.05$). Por otro lado no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre grupos de edad los PUFAs (ANOVA $F_{(1,9)}= 4.95$, $P= 0.053$) y HUFAs (ANOVA $F_{(1,9)}= 4.1$, $P= 0.073$).

Debido a que cuando se colectaron las biopsias no se conocía el periodo de lactancia (e.g. inicio o avanzado) en que se encontraban los individuos muestreados, se consideró realizar nuevamente ANOVAs entre las abundancias relativas de cada uno de los diferentes AGS encontrados en todas las biopsias de cada grupo de edad. Los ácidos grasos dominantes fueron por orden de abundancia: 18:1n-9 (oléico), seguido del 16:1n-7 (palmitoléico), 16:0 (palmítico), 20:5n-3 (EPA), 18:1n-7 (vaccénico), 14:0 (mirístico), 22:4n-6 (adrénico), 18:0 (esterárico), 22:6n-3 (DHA) y 18:2n-6 (linoléico).



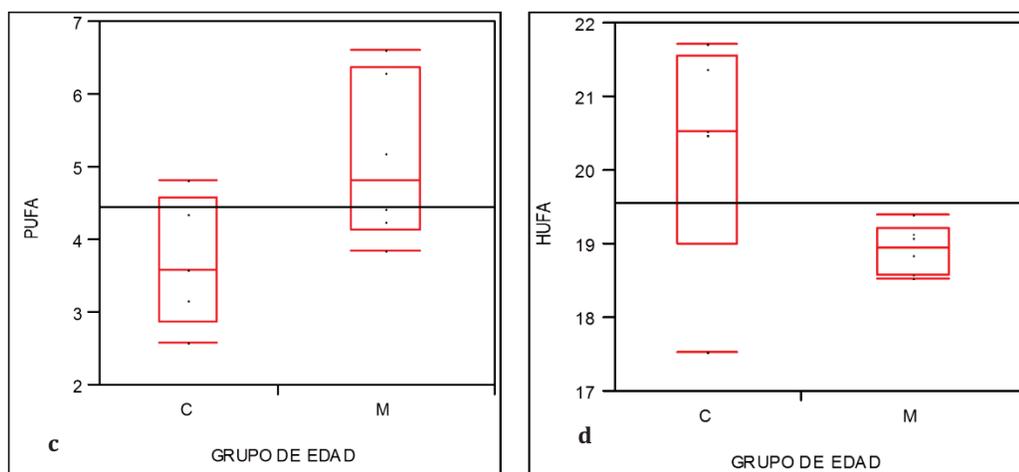


Figura 6. Comparación de SFAs (a), MUFAs (b), PUFAs (c), HUFAs (d) entre hembras lactantes (M) y crías (C).

Al analizar cada uno de los 7 AGS y las relaciones entre ellos en ambos grupos de edad, la relación EPA/ARA (20:5n-3/20:4n-6) fue la única variable que identificó estadísticamente subgrupos de biopsias tanto en hembras lactantes ($X^2= 43.2755$, $GL=5$, $P = 0.0001$) como en crías ($X^2= 12.7485$, $GL=4$, $P^2= 0.02126$). En la Figura 7 se muestran los valores promedio de la relación EPA/ARA de cada una de las biopsias de hembras lactantes y crías. Para las biopsias hembras lactantes (a) se identificaron dos subgrupos: Madres I (M1, M2, M3) y Madres II (M4, M5, M6). Para las biopsias de las crías (b) se identificaron dos subgrupos: Crías i (C2, C3 y C5) y Crías ii (C1, C4).

Esta separación en subgrupos nos permitió avanzar al análisis de una posible estratificación basada en la diferencia en la abundancia relativa del ácido graso saturado 16:0 a lo largo de la capa de grasa.

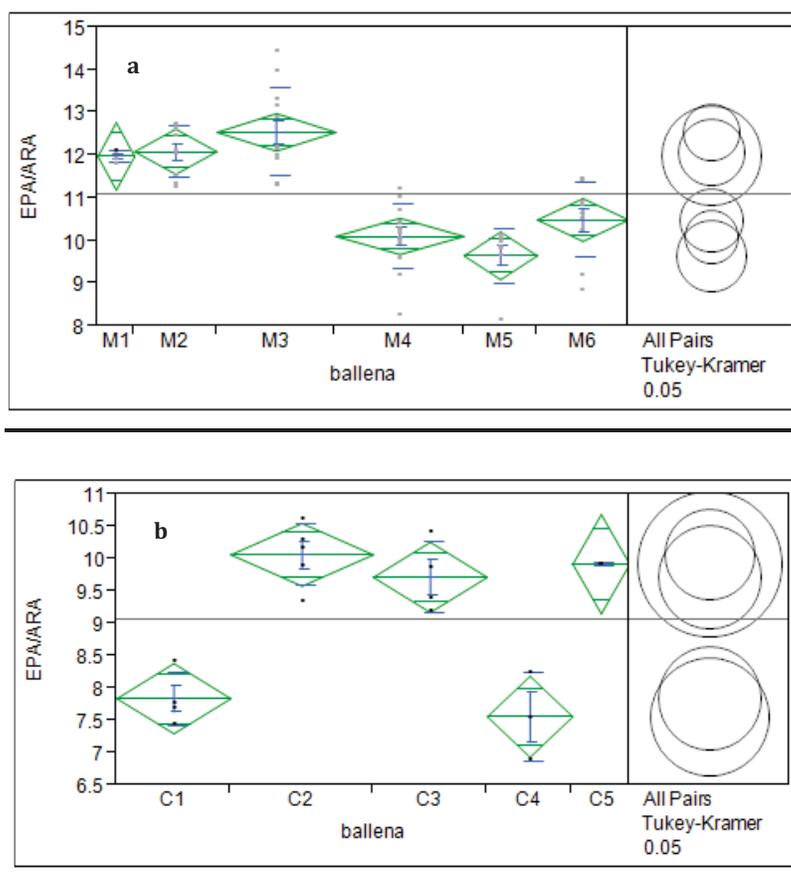


Figura 7. Relación EPA/ARA (20:5n-3/20:4n-6) entre las diferentes biopsias de hembras lactantes (a) y crías (b). Valores promedio (línea media de los diamantes), desviación estándar (líneas horizontales), error estándar (líneas verticales), valores individuales (puntos) y promedio general dentro del grupo de edad (línea horizontal que divide el gráfico a la mitad) y diferencias entre biopsias (círculos).

Estratificación de la capa de grasa en hembras lactantes

La biopsia de la capa de grasa de una hembra lactante catalogada como “M4” se tomó como referencia para identificar tres estratos, los cuales fueron posteriormente descritos en las demás biopsias de las hembras restantes. El estrato externo (A) se delimitó del 1 cm por debajo de la dermis hasta el 6 cm; el estrato intermedio (B) del 7 cm hasta los 11 cm y el estrato interno (C) a partir del 12 cm (Figura 8).

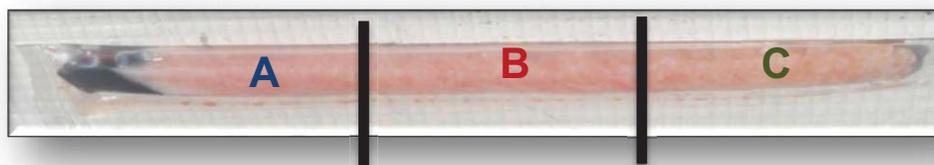


Figura 8. Biopsia de madre lactante “M4” subdividida en tres estratos identificados: A. estrato externo, B. estrato intermedio y C. estrato interno.

En la Tabla III se muestran las series de valores de abundancias relativas del AG 16:0 en los diferentes estratos de las biopsias de hembras lactantes. En el subgrupo I, los valores promedio del estrato externo (A) fueron: 15.0 ± 1.1 (M1), 12.9 ± 0.1 (M2), 1.5 ± 0.8 (M3), para el estrato intermedio (B): 17.2 ± 0.7 (M1), 13.3 ± 0.3 (M2), 12.8 ± 0.7 (M3), finalmente para el estrato interno (C): 14.2 ± 0.8 (M1), 17.7 ± 0.2 (M2). Los análisis de varianzas corroboraron diferencias significativas entre los estratos A y B en cada una de las biopsias (Tabla IV), el estrato interno (C) no se consideró en dichos análisis debido a que algunas biopsias carecían de este a falta de longitud en la muestra, o bien por que en las que sí se identificó el número de datos fue muy reducido.

Tabla III. Series de valores de abundancias relativas del AG 16:0 en los diferentes estratos de las biopsias de hembras lactantes correspondientes a ambos subgrupos.

a) Subgrupo I.

ESTRATO	BIOPSIA M3	VALOR	VALOR	BIOPSIA M2	VALOR	VALOR	BIOPSIA M1	VALOR	VALOR
	SUBMUESTRA	ORIGINAL	TRANSFORMADO	SUBMUESTRA	ORIGINAL	TRANSFORMADO	SUBMUESTRA	ORIGINAL	TRANSFORMADO
EXTERN "A"	M3-2	8.2	10.1	M2-2	13.3	12.6	M1-2	16.6	13.8
	M3-3	10.8	11.4	M2-3	12.1	12.6	M1-3		14.2
	M3-4	11.4	11.8	M2-4	12.4	13.0	M1-4	11.0	14.6
	M3-5	12.0	12.0	M2-5	13.2	13.3	M1-5	17.4	16.4
	M3-6	12.0	12.1	M2-6	13.2	13.3	M1-6	15.3	15.9
	M3-7	12.0	12.4	M2-7	13.4	13.6	M1-7	16.4	16.4
INTERMEDIO "B"	M3-8	12.3	12.6	M2-8		14.0	M1-8	15.9	17.0
	M3-9	12.8	12.7	M2-9	13.8	14.3	M1-9	17.0	17.5
	M3-10	12.5	12.8	M2-10	14.1	15.6	M1-10	18.0	18.0
	M3-11	12.8	13.8	M2-11	14.9	16.8			
INTERNO "C"	M3-12	13.2	14.2	M2-12	17.8	13.7			
	M3-13	15.2	14.6	M2-13	17.6	13.0			
	M3-14	14.3	14.3						
	M3-15	14.2	14.2						

b) Subgrupo II.

ESTRATO	BIOPSIA M4		VALOR		VALOR		BIOPSIA M5		VALOR		VALOR		BIOPSIA M6		VALOR		VALOR	
	SUBMUESTRA	ORIGINAL	TRANSFORMADO															
EXTERNO "A"	M4-2	10.8	11.7	M5-3	11.3	11.3	M6-2	11.8	11.7									
	M4-3	12.6	12.2	M5-4	11.4	11.9	M6-3	11.5	12.0									
	M4-4	11.8	12.1	M5-5	12.6	12.6	M6-4	12.0	12.5									
	M4-5	12.2	12.5	M5-6	12.5	13.1	M6-5	12.4	12.9									
	M4-6	12.5	12.6	M5-7	12.7	13.4	M6-6	13.0	13.2									
	M4-7	12.8	13.6	M5-8	14.0	16.9	M6-7	13.3	13.3									
INTERMEDIO "B"	M4-8	13.8	13.8	M5-9	16.8	16.8	M6-8	13.3	13.2									
	M4-9	14.4	13.7	M5-10	19.8	15.7	M6-9	13.1	13.1									
	M4-10	13.1	13.0	M5-11	13.7	13.6	M6-10	13.1	13.4									
	M4-11	13.5	13.3	M5-12	13.5	14.5	M6-11	12.8	13.8									
	M4-12	12.5	13.7	M5-13	13.5	15.0	M6-12	13.8	13.8									
INTERNO "C"	M4-13	13.9	14.3	M5-14	16.4	16.4												
	M4-14	14.7	15.7															
	M4-15	14.4	15.5															
	M4-16	17.9	15.6															
	M4-17	14.3	14.4															
	M4-18	14.6	14.6															

Tabla IV. Valores de ANOVA de una vía y Welch correspondientes a ambos grupos de hembras lactantes (I y II).

Subgrupo	Biopsia	F	P
I	M1	$F_{(1,7)} = 12.89$	0.0089*
I	M2	Welch $F_{(1,4.4)} = 9.55$	0.031*
I	M3	$F_{(1,8)} = 9.86$	0.01*
II	M4	$F_{(1,8)} = 33.92$	0.0004*
II	M5	Welch $F_{(1,5.6)} = 14.97$	0.009*
II	M6	$F_{(1,8)} = 8.88$	0.017*

*Si presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

Subgrupo I.

Subgrupo II.

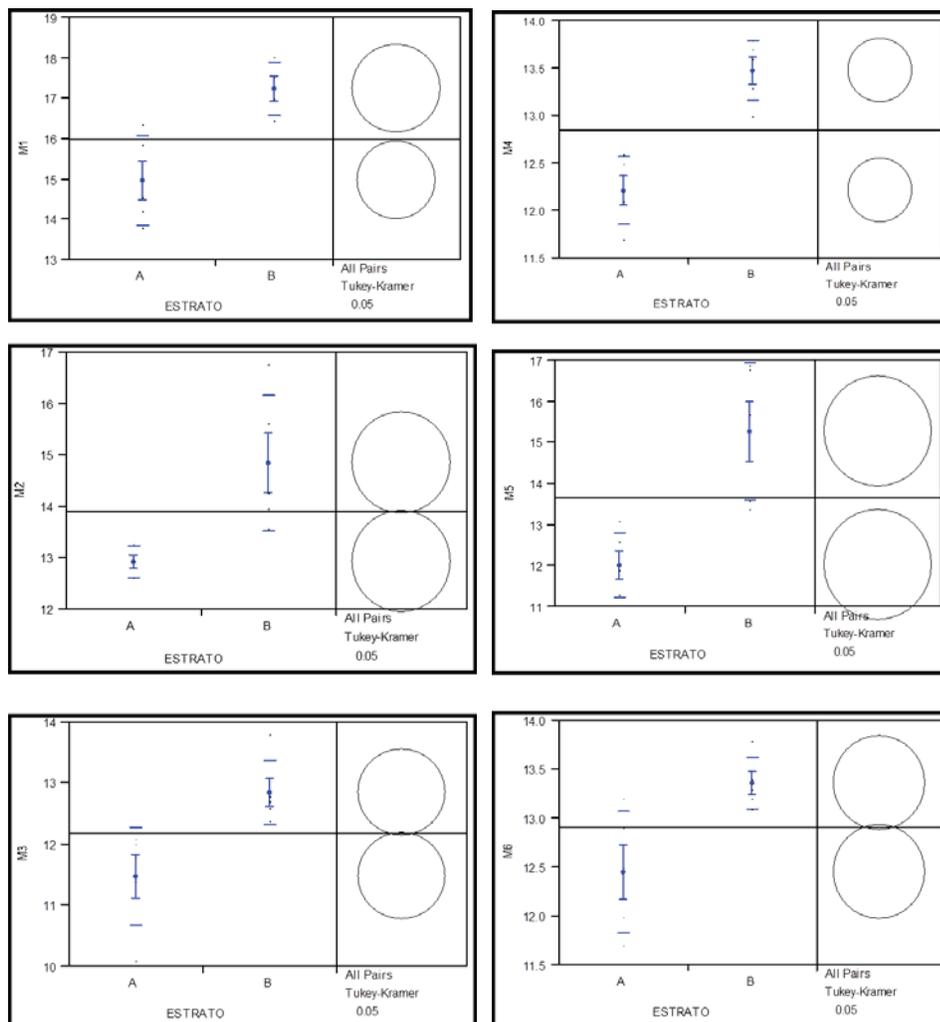


Figura 9. Diferenciación entre estratos A y B en cada una de las biopsias de hembras lactantes. Desviación estándar (líneas horizontales), error estándar (líneas verticales), valores individuales (puntos) y promedio general dentro del grupo de edad (línea horizontal que divide el gráfico a la mitad) y diferencias entre estratos de la capa de grasa (círculos).

Una vez validada la existencia de estratos en las biopsias se evaluó las posibles diferencias de las abundancias relativas de los AGS y las relaciones entre ellos entre los tres estratos. En la Tabla V se indican en color rojo los ácidos grasos que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), y en color negro se señalan los ácidos grasos cuyas concentraciones no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla V. Ácidos grasos correspondientes a las biopsias de los subgrupos de hembras lactantes que presentaron estratificación con respecto a la profundidad de la capa de grasa.

Hembras lactantes I.	Hembras lactantes II.
C16:0	C16:0
C16:1n-7	C16:1n-7
C18:0	C18:0
C18:1n-9c	C18:1n-9c
C20:4n-6	C20:4n-6
C20:5n-3	C20:5n-3
C22:6n-3	C22:6n-3
EPA/ARA	EPA/ARA

*No dif. ($p > 0.05$)
*Si dif. ($p < 0.05$)

Subgrupos de hembras lactantes: I y II.

En las figuras 10 y 11 se presentan gráficos referentes a la abundancia relativa de los siete AGS con respecto a la profundidad de las biopsias correspondientes a ambos subgrupos de hembras lactantes. En ellas se aprecia que los ácidos grasos saturados (SFA's) de cadena corta como el 16:0 y el 18:0 y los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) tanto como los omega 3 el EPA y DHA como el representante de los omega 6, el ARA, disminuyeron progresivamente del estrato interno al externo, mientras que los ácidos grasos MUFAs (16:1n-7 y 18:1n-9) presentaron la tendencia opuesta, incrementando sus concentraciones hacia el estrato externo.

En ambos grupos de las hembras lactantes, todos los AGS presentaron diferencias significativas en cuanto a su concentración en los diferentes estratos (Tabla VI y VII). Cabe

también resaltar que el ARA presentó una abundancia relativa menor del 1% en ambos subgrupos de hembras.

Tabla VI. Valores de la ANOVA de una vía y Welch correspondientes a la abundancia relativa de ciertos AGS en la capa de grasa de los subgrupos de hembras lactantes I y II.

Subgrupo I			Subgrupo II		
AGS	F	P	AGS	F	P
16:0	$F_{(2,23)}= 3.27$	0.056*	16:0	$F_{(2,30)}=0 17.76$	0.0001*
16:1n-7	$F_{(2,23)}= 12.12$	0.0003*	16:1n-7	Welch $F_{(2,16.8)}= 2.44$	0.117*
18:0	$F_{(2,22)}= 13.80$	0.0001*	18:1n-9	Welch $F_{(2,16.8)}= 14.66$	0.0002*
20:4n-6	$F_{(2,23)}= 6.01$	0.0079*	20:4n-6	Welch $F_{(2,16.8)}=3.61$	0.036*
20:5n-3	Welch $F_{(2,10.19)}= 8.41$	0.006*	20:5n-3	Welch $F_{(2,29)}=3.61$	0.030*
22:6n-3	Welch $F_{(2,11.05)}=10.54$	0.002*	EPA/ARA	$F_{(2,29)}= 2.69$	0.8
EPA/ARA	$F_{(2,23)}= 4.09$	0.03*			

*Si presentaron diferencias significativas ($p<0.05$)

Tabla VII. Valores de la prueba no paramétrica de Wilcoxon correspondientes a la abundancia relativa de los siete AGS en la capa de grasa de los subgrupos de hembras lactantes I y II.

Subgrupo I				Subgrupo II			
AGS	X^2	GL	P	AGS	X^2	GL	P
18:1n-9c	12.69	2	0.0018*	18:0	8.42	2	0.014*
				22:6n-3	14.76	2	0.0006*

*Si presentaron diferencias significativas ($p<0.05$)

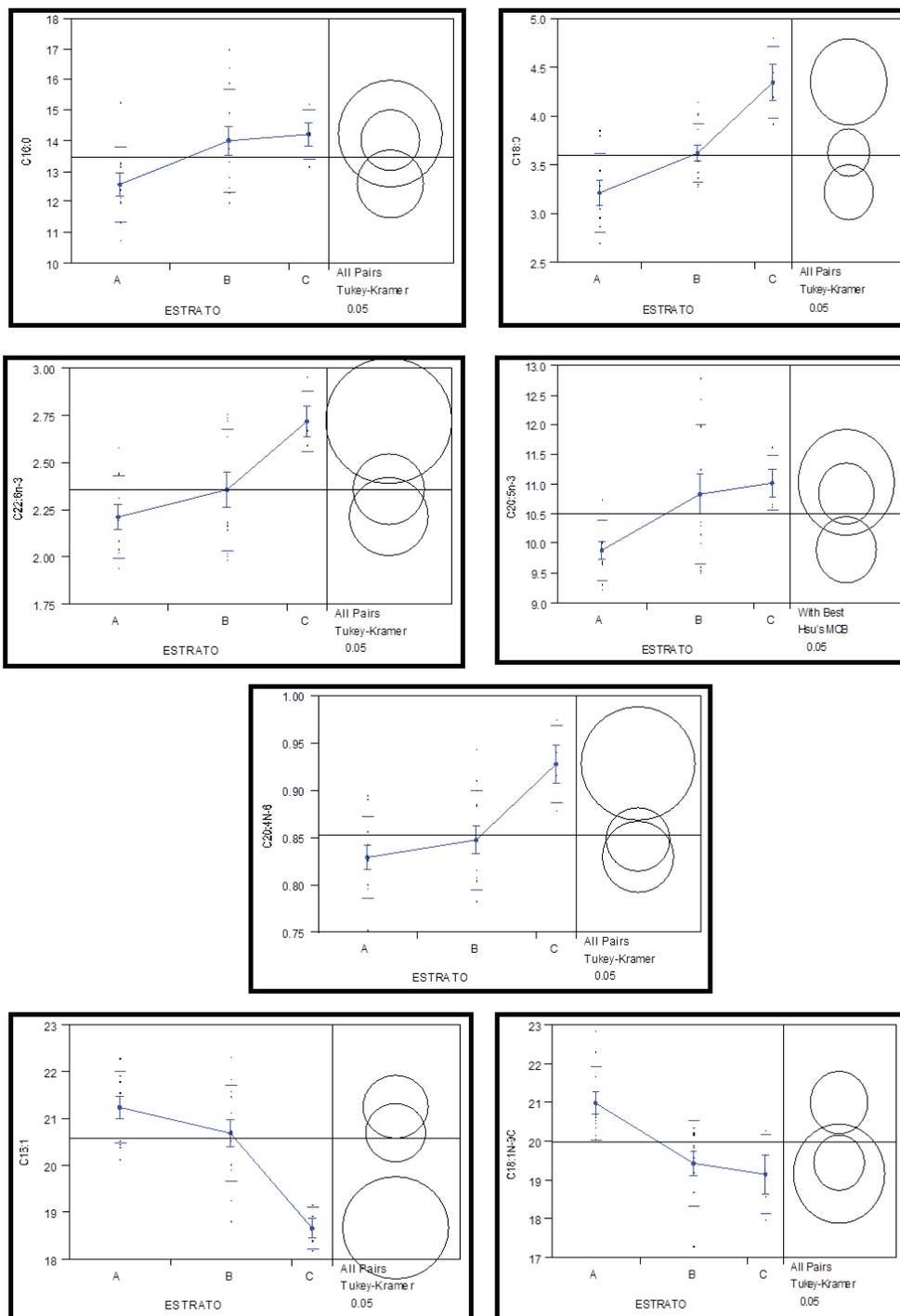


Figura 10. Abundancia relativa de los 7 AGS en los tres diferentes estratos de la capa de grasa correspondiente al subgrupo de hembras lactante "I". En cada gráfico se señalan la desviación estándar (rayas horizontales), error estándar (líneas verticales), unión de las medias de cada estrato, valores individuales (puntos) y diferencias entre estratos de la capa de grasa (círculos).

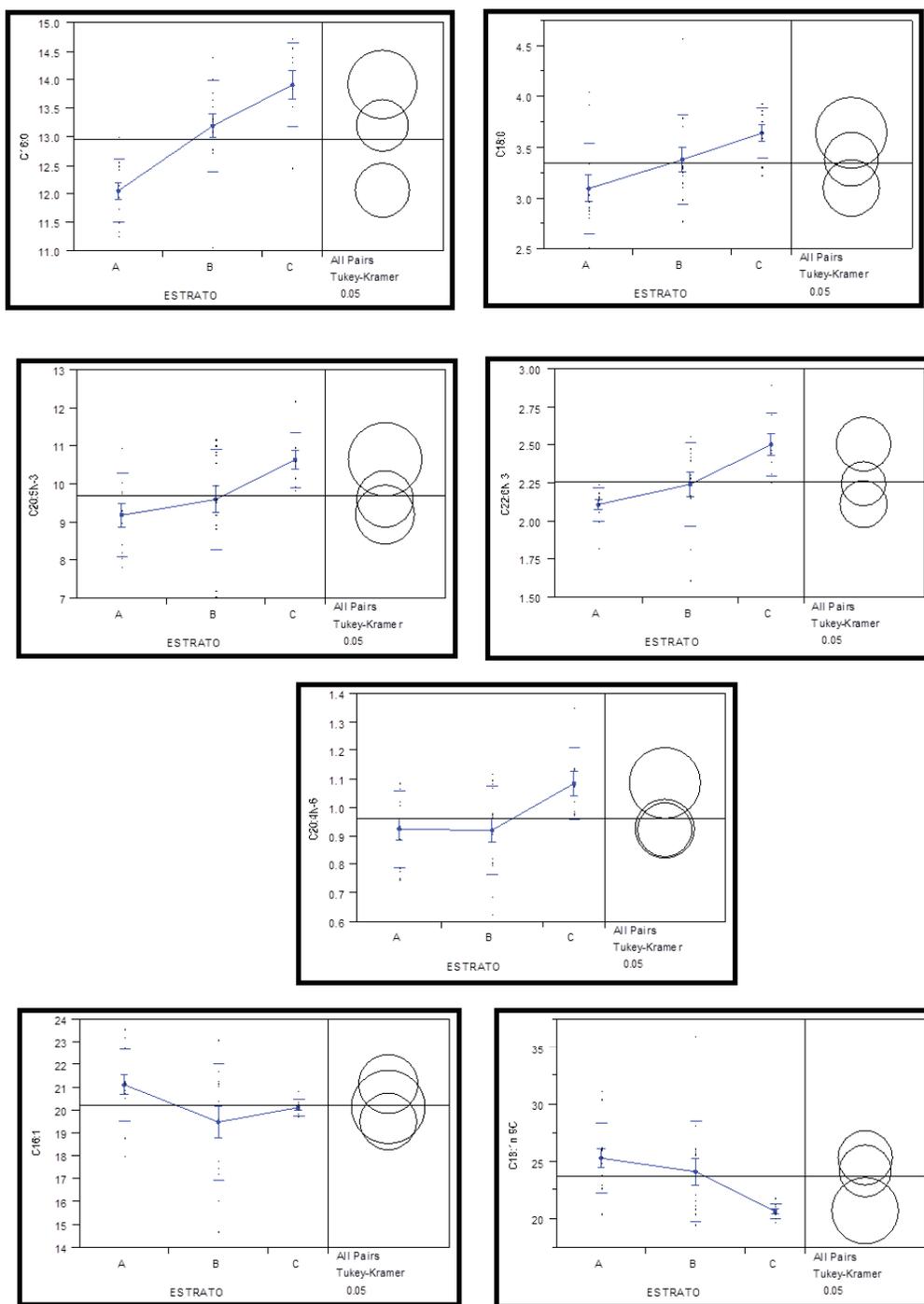


Figura 11. Abundancia relativa de los 7 AGS en los tres diferentes estratos de la capa de grasa correspondiente al subgrupo de hembras lactante "II". En cada gráfico se señalan la desviación estándar (rayas horizontales), error estándar (líneas verticales), unión de las medias de cada estrato, valores individuales (puntos) y diferencias entre estratos de la capa de grasa (círculos).

Estratificación de la capa de grasa de crías

En la Tabla VIII se muestran las series de valores de abundancias relativas del AG 16:0 en los diferentes estratos de las biopsias de crías. En el subgrupo i los valores promedio del estrato externo (A) fueron: 11.4 ± 0.2 (C2), 9.9 ± 2.8 (C3) y 11.2 ± 1.7 (C5); para el estrato intermedio (B): 13 ± 0.7 (C2), 13 ± 0.4 (C3). En el subgrupo ii los valores promedio del estrato externo (A) fueron: 12.2 ± 0.6 (C1) y 9.7 ± 1.3 (C4); para el estrato B: 14.0 ± 0.3 (C1) y 14.9 ± 0.7 (C4). A partir de dicha información se prosiguió a delimitar los mismos estratos para las demás biopsias (C1, C3, C4). El estrato externo (A) se ubicó por debajo de la dermis abarcando del 1 cm hasta el 2 cm y el estrato intermedio (B) del 3 cm (Figura 13). Cabe señalar que en la biopsia “C1” el estrato A se delimitó del 1 cm hasta los 3cm, y el estrato B de los 4 cm en adelante, esto como consecuencia de los valores obtenidos del suavizado. En la biopsia “C5” se colectó únicamente un estrato, el externo (A).

Tabla VIII. Series de valores de abundancias relativas del AG 16:0 en los diferentes estratos de las biopsias de crías correspondientes a los subgrupos i y ii.

a) Subgrupo i.

ESTRATO	BIOPSIA C2		BIOPSIA C3		BIOPSIA C5	
	SUBMUESTRA	VALOR ORIGINAL	VALOR TRANSFORMADO	SUBMUESTRA	VALOR ORIGINAL	VALOR TRANSFORMADO
EXTERNO "A"	C2-1	11.6	11.9	C3-1	7.9	10.8
	C2-2	11.3	12.4	C3-2	11.9	12.5
INTERMEDIO "B"	C2-3	12.7	12.7	C3-3	12.6	13.0
	C2-4	13.0	13.1	C3-4	13.0	13.2
	C2-5	12.3	13.1	C3-5	13.4	13.4
	C2-6	14.0	14.0			

b) Subgrupo ii.

ESTRATO	BIOPSIA C1		BIOPSIA C4			
	SUBMUESTRA	VALOR ORIGINAL	VALOR TRANSFORMADO	SUBMUESTRA	VALOR ORIGINAL	VALOR TRANSFORMADO
EXTERNO "A"	C1-1	8.19	10.9			
	C1-2	11.7	12.7	C4-1	8.8	9.7
	C1-3	12.7	13.2	C4-2	10.6	13.0
INTERMEDIO "B"	C1-4	13.8	14.0	C4-3		14.9
	C1-5		14.2	C4-4	15.4	14.9
	C1-6	14.2	14.2	C4-5	14.4	14.4

En cada uno de los subgrupos de crías una de las biopsias (C2 y C1) corroboró la estratificación, encontrándose diferencias significativas entre los estratos A y B (Figura 13).

Tabla IX. Valores de ANOVA de una vía.

Subgrupo	Biopsia	F	P
i	C2	$F_{(1,4)} = 8.71$	$P = 0.041^*$

*Si presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla X. Valores de la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

Subgrupo	Biopsia	X^2	GL	P
i	C3	3.0000	1	0.0833
ii	C1	3.97	1	0.046*
ii	C4	3.15	1	0.075

*Si presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

Subgrupo i.

b) Subgrupo ii.

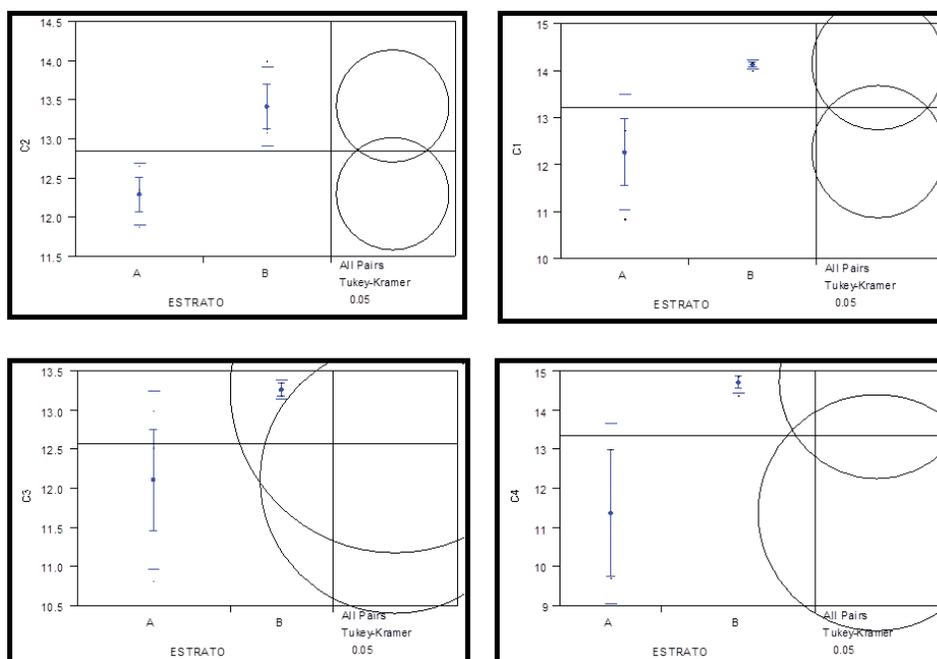


Figura 12. Diferenciación entre estratos A y B en cada una de las biopsias de crías considerando los valores del 16:0. Desviación estándar (líneas horizontales), error estándar (líneas verticales),

valores individuales (puntos) y promedio general dentro del grupo de edad (línea horizontal que divide el gráfico a la mitad) y diferencias entre estratos de la capa de grasa (círculos).

A pesar de que no todas las biopsias presentaron diferencias significativas entre estratos se decidió seguir el mismo procedimiento que en hembras lactantes: utilizar la biopsia de la capa de grasa catalogada como “C2”, la de mayor longitud, para identificar los posibles estratos en base a los valores de la abundancia relativa de los AGS.



Figura 13. Biopsia de cría subdividida en dos estratos identificados: A. estrato externo, B. estrato intermedio.

Tabla XI. Ácidos grasos correspondientes a las biopsias de los dos subgrupos de crías que presentaron estratificación con respecto a la profundidad de la capa de grasa. En color rojo los ácidos grasos que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). En color negro se señalan los ácidos grasos cuyas concentraciones no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Crías i.	Crías ii.
C16:0	C16:0
C16:1n-7	C16:1n-7
C18:0	C18:0
C18:1N-9C	C18:1N-9C
C20:4N-6	C20:4N-6
C20:5N-3	C20:5N-3
C22:6N-3	C22:6N-3
EPA/ARA	EPA/ARA

*No dif. ($p > 0.05$)
*Si dif. ($p < 0.05$)

Subgrupos de crías: i y ii.

En el grupo de las crías los ácidos grasos que no contribuyeron a la estratificación del tejido graso por la falta de diferenciación significativa conforme a la profundidad fueron en el subgrupo “i”: 18:0, 18:1n-9, ARA, EPA y DHA y en el subgrupo ii: 16:1n-7 y 18:1n-9c (Tabla XI). En las Figuras 14 y 15 se puede apreciar que en ambos subgrupos de

crías el ácido graso saturado 16:0 presentó mayores concentraciones en el estrato intermedio (B), estrato que resultó el más basal en este grupo por lo tanto podría sugerir una tendencia similar al grupo de las hembras lactantes. Los HUFA's omega 3 (DHA) y omega 6 (ARA) solo en el subgrupo ii presentaron diferencias significativa (Tabla XII). Cabe resaltar que a diferencia del grupo de las hembras en este caso las mayores concentraciones de estos AGs se ubicaron en el estrato más cercano a la piel (A). Es importante señalar también que en general la abundancia relativa del ARA en la capa de grasa fue relativamente mayor que en la de las madres, aunque no rebaso en ningún caso el 2% de la abundancia relativa global. El EPA, no presentó diferencias significativas (Tabla XIII) en ninguno de los subgrupos, sin embargo en el subgrupo ii la prueba de diferencia de medias de Tukey/Kramer señaló que la media de cada estrato si fue significativamente diferente.

Dentro de los representantes de los monoinsaturados el 18:1n-9 presentó mayores concentraciones en el estrato interno en el subgrupo ii, en contraste nuevamente con lo encontrado en las hembras. El 16:1n-7 solo en el subgrupo i su concentración fue significativamente diferente entre estratos, encontrándose las mayores abundancias relativas en el estrato externo (A), repitiendo el patrón de las hembras lactantes.

Tabla XII. Valores de la ANOVA de una vía y Welch correspondientes a la abundancia relativa de ciertos AGs en la capa de grasa de los subgrupos de crías i y ii.

Subgrupo i			Subgrupo ii		
AGS	F	P	AGS	F	P
16:0	$F_{(1,10)}= 7.86$	0.018*	16:0	$F_{(1,6)}= 19.56$	0.006*
16:1n-7	$F_{(1,10)}= 6.38$	0.03*	16:1n-7	$F_{(1,5)}= 0.373$	0.56
18:1n-9	$F_{(1,10)}= 0.02$	0.87	18:1n-9	$F_{(1,6)}= 1.53$	0.26
20:4n-6	$F_{(1,9)}= 1.14$	0.31	20:4n-6	$F_{(1,5)}= 15.76$	0.01*
20:5n-3	$F_{(1,10)}= 0.29$	0.59	20:5n-3	$F_{(1,5)}= 10.07$	0.02*

22:6n-3	$F_{(1,10)} = 0.08$	0.67	22:6n-3	$F_{(1,5)} = 31.82$	0.002*
			EPA/ARA	$F_{(1,5)} = 0.69$	0.44

*Si presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla XIII. Valores de la prueba no paramétrica de Wilcoxon correspondientes a la abundancia relativa de los siete AGS en la capa de grasa de los subgrupos de crías i y ii.

Subgrupo i				Subgrupo ii			
AGS	X²	GL	P	AGS	X²	GL	P
18:0	2.38	1	0.12	18:0	4.5	1	0.03*
EPA/ARA	0.89	1	0.34	20:5n-3	3.12	1	0.07

*Si presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

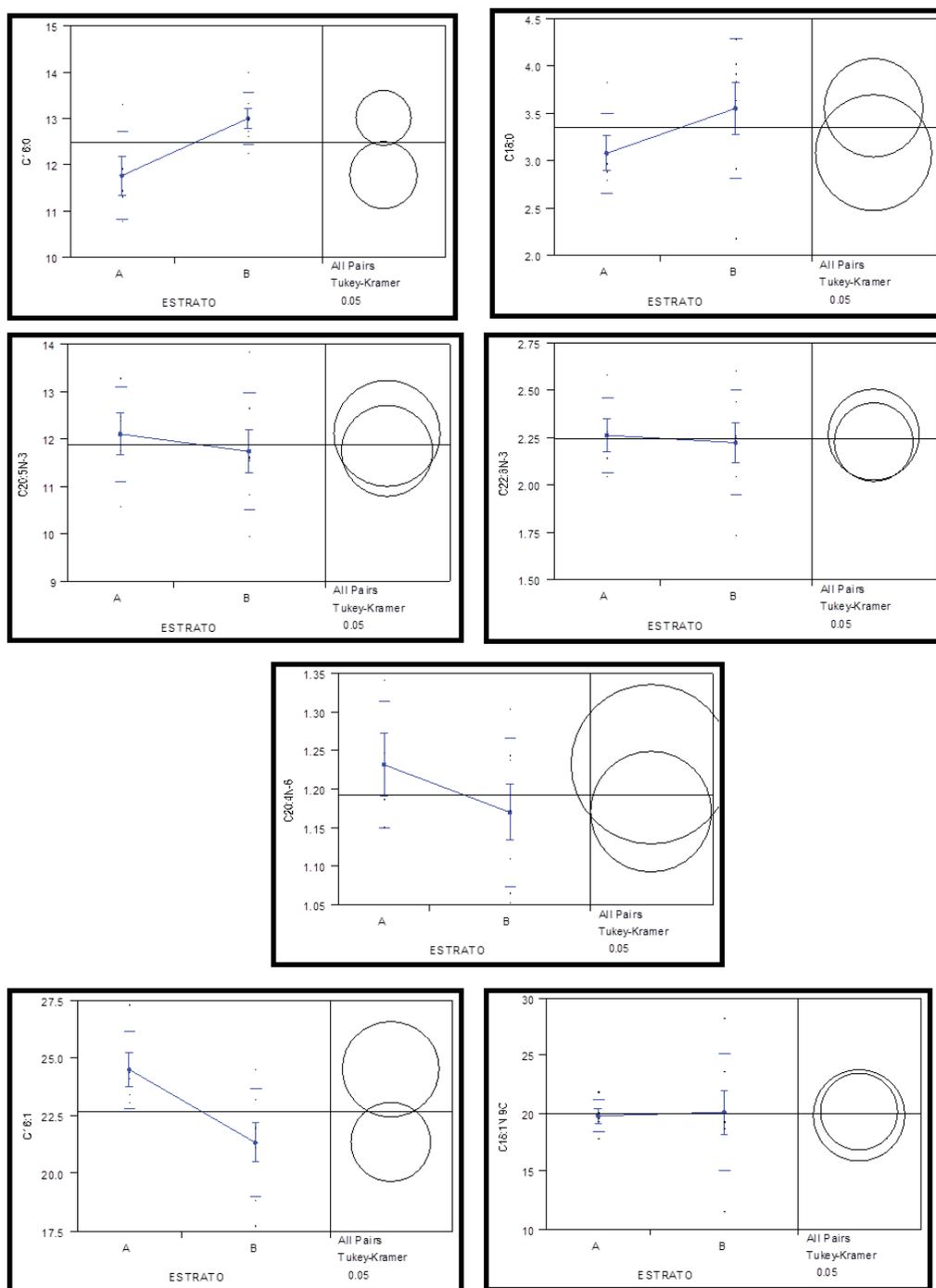


Figura 14. Abundancia relativa de los 7 AGS en los dos diferentes estratos de la capa de grasa correspondiente al subgrupo de crías “i”. En cada gráfico se señalan la desviación estándar (rayas horizontales), error estándar (líneas verticales), unión de las medias de cada estrato, valores individuales (puntos) y diferencias entre estratos (círculos).

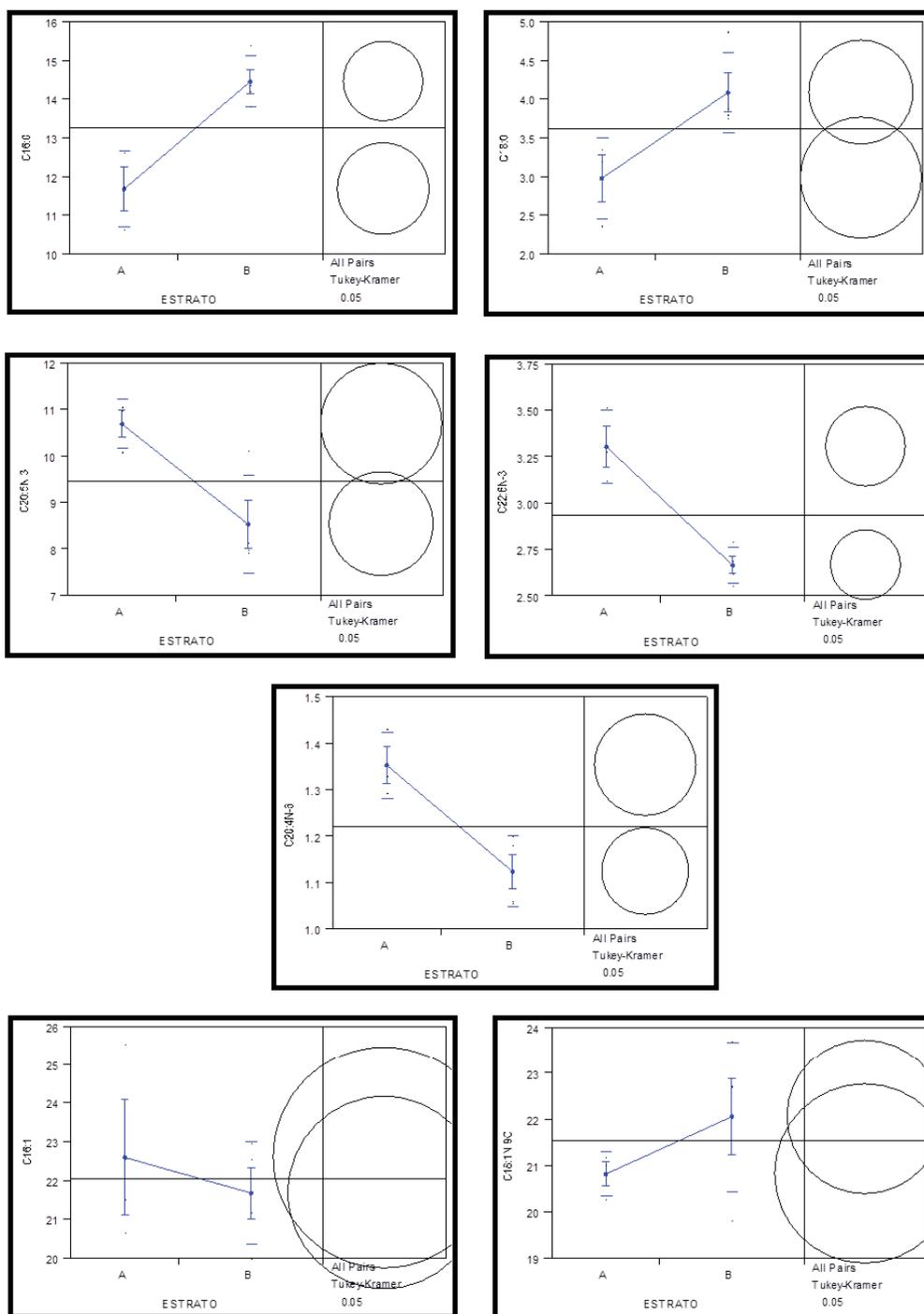


Figura 15. Abundancia relativa de los 7 AGS en los dos diferentes estratos de la capa de grasa correspondiente al subgrupo de crías “ii”. En cada gráfico se señalan la desviación estándar (rayas horizontales), error estándar (líneas verticales), unión de las medias de cada estrato, valores individuales (puntos) y diferencias entre estratos (círculos).

DISICUSIÓN

Metodología de muestreo

Debido a que actualmente se han descrito diversos sistemas de biopsias para coleccionar muestras del tejido graso y piel de mamíferos marinos, en el presente trabajo se optó por buscar alguno que nos permitiera obtener biopsias profundas de la capa de grasa de crías y hembras lactantes vivas de ballena gris. El método con el que pudimos lograr nuestro objetivo fue el sistema remoto de colecta de biopsias profundas para misticetos descrito por Reef y Best en el (2006). Esta técnica entre otros aspectos novedosos utiliza puntas metálicas largas con un mecanismo de corte diseñado para poder llevar a cabo la recolección y extracción de las biopsias completas evitando el desgarre del tejido al momento de extraer la punta del animal. Cabe destacar que a pesar de haber obtenido muestras profundas en ninguno de los intentos se extrajo músculo, lo que nos impide asegurar que las biopsias conseguidas durante el muestreo hayan alcanzado la máxima profundidad de la capa de grasa en ambos grupos de edad. En cada intento se evitó lesionar a los organismos al generar un golpe con el mecanismo de paro (stopper). Una ventaja de esta precaución fue la posibilidad de coleccionar biopsias de más de una ballena en un área relativamente pequeña. Finalmente también nos fue posible identificar los efectos de este sistema en los organismos, la mayoría de los individuos respondieron de forma moderada con sutiles movimientos de la cola y buceos inmediatos sin mayores impactos negativos, como hemorragias severas o desgarramiento de la piel de los organismos. Se identificó que el viento fue uno de los factores meteorológicos que pudo haber contribuido con la falta de oportunidades de acercamiento con más ballenas para incrementar el número de biopsias.

Ácidos grasos de la capa de grasa

En diversos estudios del tejido graso de los mamíferos marinos se ha identificado que resulta útil el separar los perfiles de ácidos grasos de reserva y estructurales para poder precisar diferencias atribuibles al consumo de alimento o a características propias de los grupos estudiados. Con ese propósito en este trabajo se identificó que la capa de grasa de las ballenas grises está constituida en un 80% por lípidos de reserva o lípidos neutros (LN)

y en un 20% por lípidos polares (LP). Dicha dominancia de los lípidos neutros es común tanto en misticetos (ballenas barbadas) como en odontocetos (delfines, marsopas, sirénidos) (Koopman, 2007).

Ambas clases de lípidos provienen de dos fuentes principales: 1) aquellos ácidos grasos que se generan endógenamente por los depredadores (14:0, 16:0, 18:0, 14:1n-5, 16:1n-7, 18:1n-9) (Iverson, 2008), y 2) de las moléculas grasas obtenidas a partir del alimento consumido, como los ácidos grasos esenciales (AGE) que no pueden ser sintetizados por los vertebrados en general y por lo tanto tampoco por mamíferos marinos (Christie, 1989). Entre estas moléculas se encuentran los de las familias omega 3 (alfa linolénico, ALA; eicosapentanoico, EPA; docosahexaenoico, DHA) y omega 6 (linoleico, AL y araquidónico, ARA), los cuales pueden ser utilizados como biomarcadores ya que se conservan de un nivel trófico a otro (Hooker *et al.*, 2001).

La presencia y abundancia de los siguientes AG: 18:1n-9c, 16:1n-7, 16:0, 20:5n-3, 18:1n-7, 14:0, 22:4n-6, 18:0, 22:6n-3 y 18:2n-6 en la capa de grasa de la ballena gris coincide con lo reportado para otros misticetos como la ballena azul y ballena de aleta (Ruchonnet *et al.*, 2006; Rueda Flores, 2007), ello permite mantener la hipótesis que tales ácidos grasos son necesarios en las mismas proporciones por distintas especies, aun cuando las fuentes de alimento sean diferentes (Olsen y Grahl- Nielsen, 2003). Sin embargo, no hay que dejar de considerar que la composición de la capa de grasa también está regulada por otros factores además de la dieta, como lo es el periodo de lactancia en las hembras (West *et al.*, 1979b) y las diferentes etapas del desarrollo ontogénico (Bikerland *et al.*, 2005), lo cual también se corroboró en los resultados de ballena gris.

Los ácidos grasos 16:0,18:0,18:1n-9, ARA y EPA han sido reportados en la literatura como algunos de los principales conformadores de las membranas plasmáticas de las células de tejidos activos en el grupo de los mamíferos terrestres (Scollan *et al.*, 2001) y de mamíferos marinos (Ackman *et al.*, 1972; Ackman y Hooper, 1974; Williams *et al.*, 1977; Caraveo *et al.*, 2009). Esto permite pensar que evolutivamente la afinidad de la síntesis *de novo* por parte de las enzimas que realizan esta función se ha conservado

durante el proceso de migración de los mamíferos marinos del ambiente terrestre al medio marino. Esta idea se puede sustentar en que actualmente está demostrado que en mamíferos terrestres el 16:0, 18:0, ARA y EPA son preferentemente seleccionadas durante la síntesis de los fosfolípidos como: fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Holub, 1978).

Lípidos polares

La concentración de los lípidos estructurales o lípidos polares que se analizaron de las biopsias de la capa de grasa de madres y crías de ballenas grises no presentaron diferencias significativas, probablemente como consecuencia de que la fisiología metabólica de cada grupo de edad analizado no influya fuertemente en la estructura de las membranas plasmáticas de las células grasas.

Lípidos neutros

En diversos estudios sobre la alimentación de otras especies de mysticetos se han encontrado diferencias entre los perfiles de ácidos grasos de los lípidos neutros de hembras, machos, hembras lactantes y crías. Esto sugiere que el metabolismo de los individuos de cada sexo y grupo de madurez tiene un efecto en la transformación y utilización de los ácidos grasos de los lípidos de reserva (Rueda- Flores, 2007; Espino, 2009). Se sabe que durante el ciclo reproductivo, las hembras requieren de un mayor uso de energía que implica movilizar los lípidos de reserva desde su propio tejido graso hacia sus crías por medio de la producción de leche (Ackman *et al.*, 1975b; Iverson, 2002). En este estudio se identificaron diferencias significativas entre las columnas completas de la capa de grasa de madres y crías en cuanto a la concentración de ciertas clases de ácidos grasos, tal fue el caso de los SFA's y los MUFA's, en los que la categoría de las crías presentó una mayor concentración, esto puede atribuirse tanto a la síntesis fetal de dichos ácidos grasos (Jeffcoat 1979) como a la transferencia de dichas moléculas por parte de la madre (Ackman *et al.*, 1968). Además es importante tomar en cuenta que una de las funciones de los SFAs y los MUFAs presentes en la capa de grasa de los mamíferos marinos es la de fungir como moléculas que promuevan el aislamiento térmico (Ackman, 1989), y puesto que las crías al nacer requieren cubrir dicha necesidad lo más pronto posible para poder sobrevivir a las

bajas temperaturas impuestas por el medio marino, cabe esperarse que sean esa clase de ácidos grasos los que se acumulen de manera más apresurada.

Si bien las concentraciones de las demás clases de ácidos grasos (PUFA y HUFA) no presentaron diferencias significativas entre los grupos de edad, puede argumentarse que la poca diferencia entre ellas se vea enmascarada por la variación en la demanda metabólica que presentan las categorías muestreadas. Ello por que la presencia de ciertos ácidos grasos en el blubber no solo dependerá de que se depositen y acumulen de manera directa las moléculas de la dieta, sino también de ciertos procesos intrínsecos relacionados con el estado fisiológico de los organismos (ciclo de lactancia de las hembras o etapa de amamantamiento de las crías) (Olsen y Grahl- Nielsen 2003). Lo cual afecta el acomodo y asimilación de los ácidos grasos en el blubber para que tengan una posición estratégica que hará más eficiente su reutilización al encontrarse más cercanos al estrato interno y al sistema circulatorio, el cual se encargará de transportar los compuestos nutritivos a la sangre y repartirlos a lo largo del cuerpo según las necesidades de los tejidos activos o los procesos en los que resulten necesarios en ese momento (Koopman *et al.*, 1996).

Considerando las concentraciones de los ácidos grasos altamente insaturados como el EPA y ARA, el grupo de la crías en general presentó una mayor abundancia de ellos en su capa de grasa con respecto a la de las hembras lactantes (Tabla II). Esto podría sugerir que las hembras movilizan dichos ácidos grasos esenciales hacia la leche que nutrirá a las crías y por lo tanto los valores de dichos HUFAs en el blubber materno se ven reducidos en comparación con la de las crías, tal como ya ha sido descrito para otras crías de mamíferos marinos (Iverson 1995; Bikerland *et al.*, 2005). Posteriormente la deposición de estos AG en el tejido graso de las crías dependerá de su etapa de desarrollo y crecimiento, existiendo una transferencia hacia otros tejidos activos del cuerpo (cerebro, órganos, etc.) que demandan su utilización constante durante su crecimiento (Cruz-Vizcaíno, 2005).

Siguiendo el mismo principio, el hecho de que la relación de los ácidos grasos EPA/ARA separara en subgrupos a los individuos de un mismo grupo de edad, puede sugerir que las madres transmiten a sus crías el EPA y el ARA de forma diferencial

dependiendo del periodo de lactancia en el que se encuentren. Dicha relación entre HUFA's omega 3 y omega 6 en la capa de grasa ya había sido considerada previamente por Caraveo et al. (2009). En este estudio se señala que los valores de EPA/ARA obtenidos en las capas de grasa externa de las hembras lactantes (~12), son los valores que permiten la mayor asimilación de ARA tanto por hembras lactantes como por las crías, lo cual se logra mediante el consumo de alimento en las lagunas de reproducción, cuyas presas presentan la misma relación EPA/ARA (~12). El hecho de que el subgrupo I de hembras lactantes es el que tiene en promedio general los valores cercanos a 12 partes de EPA por una de ARA y el subgrupo II valores inferiores a 12 (~10), corrobora que esta relación es importante en la transferencia de estos AG hacia las crías.

Estratificación de la capa de grasa

Actualmente se sabe que los misticetos presentan diferencias cualitativas y cuantitativas en cuanto a la presencia de ácidos grasos en los diferentes estratos o niveles de profundidad que conforman la capa de grasa. Es también reconocido el hecho de que existe un incremento en la estratificación del blubber de las especies de mamíferos marinos que habitan en temperaturas frías (Koopman, 2006), y que la cantidad y el tipo de ácidos grasos almacenados dependerá de forma estacional a las variaciones en los niveles de ingesta de alimento que se correlacionan con los ciclos en la historia de vida en los que los organismos se encuentren, eventos tales como: reproducción y lactancia (Bikerland *et al.*, 2005). Al analizar las biopsias de los dos grupos de edad de *E. robustus* pudo identificarse estratificación en ambos casos. El ácido graso que nos permitió determinar la estratificación fue el AG saturado 16:0, el cual ya ha sido identificado como el predilecto por las enzimas transferasas que sintetizan las dos clases de fosfolípidos más importantes (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) de las membranas celulares de los mamíferos terrestres como ratones, (Holub, 1978).

Cada uno de los subgrupos de hembras lactantes (I y II) y crías (i y ii) presentó estratificación en la columna de la capa de grasa, apareciendo los AGS en un gradiente continuo con respecto a la profundidad. Sin embargo los ácidos grasos que contribuyeron

para dicha diferenciación no siempre fueron los mismos. A continuación se señalan las posibles causas para tales diferencias en cada uno de los grupos de edad.

Hembras lactantes

En ambos subgrupos de hembras lactantes se pudo percibir estadísticamente la estratificación con todos los AGS. La abundancia relativa de los SFAs y HUFAs presentaron una mayor abundancia relativa en la capa interna que en la externa. En el caso de los MUFAs (16:1n-7 y 18:1n-9) la tendencia fue inversa. Ambos patrones son consistentes con lo encontrado en otros estudios realizados con la capa de grasa de otras especies de cetáceos (Ackman *et al.*, 1965; Hooker *et al.*, 2001; Olsen y Grahl- Nielsen, 2003) y pinípedos (Best *et al.*, 2003). Esta similitud entre diferentes especies, incluso entre órdenes de mamíferos marinos sugiere que la composición de la capa de grasa o blubber pudiera estar influenciada por los mismos mecanismos, llevándose a cabo las modificaciones pertinentes para que dicho tejido cumpla con las diferentes funciones que se le han atribuido (flotabilidad, aislante térmico, reservorio de energía metabólica, entre otros) (Ackman *et al.*, 1975b; Olsen y Grahl- Nielsen, 2003).

Crías

El hecho de que la relación EPA/ARA nos separara en dos grupos a las crías, nos permitió pensar que existían distintos periodos de lactancia entre los individuos, dado que se ha comprobado que los tejidos activos de las crías tienen una alta demanda de los HUFAs ARA y EPA (Caraveo *et al.*, 2009) y que además conforme las crías crecen, el contenido de EPA en su capa de grasa se incrementa (Bikerland *et al.*, 2005). La mayor estratificación de la capa de grasa del subgrupo ii, sugiere que estaba constituido por individuos que ya se encontraba en un estado mas avanzado de la lactancia.

Ciertos ácidos grasos como el: 18:1n-9y los HUFAs ARA, EPA y DHA, presentaron una tendencia contraria a la de las hembras, puede reflejar las diferencias ontogénicas entre los dos grupos de edad. El hecho de que ambos subgrupos de crías (i y ii) tengan el mismo patrón de estratificación con respecto a los SFAs (16:0 y 18:0) y el MUFA 16:1n-7 que el de las hembras implica que las crías de esta especie de ballenas ya poseen

una dotación particular de estos ácidos grasos para poder afrontar el estrés térmico al momento de nacer como se ha planteado para otras especies de mamíferos marinos (Ackman, 1989; Struntz *et al.*, 2004). En resumen, las diferencias encontradas en los patrones de deposición de los AGS entre hembras lactantes y crías de ballena gris pueden atribuirse al estado de desarrollo en que los ballenatos se encuentran, aquel en el que ciertos requerimientos anatómicos necesitan de determinados ajustes fisiológicos para poder sobrevivir, ajustes que involucran la adquisición modulada de ácidos grasos esenciales en las etapas más tempranas de la vida para poder llevar a cabo el crecimiento estructural y el desarrollo del cerebro (Jensen, 1988).

Cabe resaltar que nuevamente en el grupo de las crías la abundancia relativa del ARA fue muy similar a la de las hembras, con valores de alrededor del 1%. Esto reitera el hecho de que es un nutriente que no tiende a acumularse en la capa de grasa a pesar de que en el grupo de los mamíferos marinos la mayor transferencia de lípidos de madres a crías se lleva a cabo durante el periodo de lactancia, lo que provocaría una considerable movilización y disminución de dicho AG en la capa de grasa de las madres y un aumento en el reservorio graso de las crías como sucede con otros HUFAs como el EPA y el DHA (Bauman y Elliot, 1983). Esto apoya la hipótesis propuesta por Caraveo *et al.*, (2009) de que la razón de la migración de la ballena gris estará vinculada con la necesidad de satisfacer la adquisición de este tipo de nutrientes durante la lactancia.

CONCLUSIONES

- Este estudio demuestra que la capa de grasa de las ballenas grises no es un tejido homogéneo con respecto a su profundidad, y que este presenta cambios en el contenido lipídico relacionados con la historia de vida de los organismos.
- Los ácidos grasos mas abundantes en la capa de grasa de hembras lactantes y crías de ballena gris son en orden de mayor a menor: 18:1n-9, 16:1n-7, 16:0, EPA.
- El sistema remoto de colecta de biopsias profundas para mysticetos descrito por Reef y Best en el 2006 resultó exitoso para estudiar la columna completa de la capa de grasa de mysticetos vivos.
- La capa de grasa de hembras lactantes y crías de ballena gris está constituida en 80% por lípidos neutros y en un 20% por lípidos polares.
- Los SFAs y los MUFAs fueron los ácidos grasos que marcaron las diferencias entre la composición lipídica del grupo de hembras lactantes y crías de *E. robustus*.
- La capa de grasa de hembras lactantes el estrato externo presenta una mayor abundancia de MUFAs, mientras que en el estrato interno existe una mayor presencia de HUFAs (ARA, EPA y DHA) y SFA (16:0 y 18:0).
- El ARA se mantuvo relativamente constante con valores alrededor del 1% a lo largo de la capa de grasa de ambos grupos de edad.
- La capa de grasa de crías presenta en el estrato externo una mayor abundancia de HUFAs (ARA, EPA y DHA) y el MUFA 16:1n-7, mientras que en el estrato interno existe una mayor presencia de SFAs (16:0, 18:0) y el MUFA 18-1n-9.

- La capa de grasa de las hembras lactantes presenta una mayor estratificación que la de las crías. Dicha diferencia está vinculada con el desarrollo ontogenético de los individuos.

LITERATURA CITADA

- Ackman RG, Hooper SN. 1968. Examination of isoprenoid fatty acids as distinguishing characteristics of specific marine oils with particular reference to whale oil. *Com. Biochem. Physiol.* 24, 549.
- Ackman RG, Hooper SN, Hingley JH, Can J. 1972. The harbor seal *Phoca vitulina* concolor De Kay: comparative details of fatty acids in lung and heart phospholipids and triglycerides. *Biochem.*, 50, 833.
- Ackman RG & Hooper SN. 1974. Long chain monoethylenic and other fatty acids in heart, liver and blubber lipids of two harbor (*Phoca vitulina*) and one grey seal (*Halichoerus grypus*). *Fish. Res. Board Can.*, 31, 333.
- Ackman RG, Hingley JH, Eaton CA, Logan JH, Odense PH. 1975. Layering and tissue composition in the blubber of the northwestern Atlantic sei whale (*Balaenoptera borealis*). *Can. J. Zool.* 53, 1340–1344.
- Ackman, R. G. 1989. *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils*. Vol. I. CRC. Press. USA. 495 pp.
- Andersen SM, Lydersen C, Grahl-Nielsen O, Kovacs KM. 2004. Diet of harbour seals (*Phoca vitulina*) at Prins Karls Forland, Svalbard. *Can J Zool* 82:1230–1245.
- Best NJ, Bradshaw CJA, Hindell MA, Nichols PD. 2003. Vertical stratification of fatty acids in the blubber of southern elephant seals (*Mirounga leonina*): implications for diet analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.* 134: 253-263.
- Bauman DE, Elliot JM (1983) Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. In: Mepham TB (ed) *Biochemistry of lactation*. Elsevier, Amsterdam, pp 437-468
- Beck CA., Bowen WD., and Iverson S J. (2000). Seasonal changes in buoyancy and diving behaviour of adult grey seals. *J. Exp. Biol.* 203, 2323–2330.
- Birkeland A, Kovacs KM, Lydersen C, Grahl-Nielsen O. 2005. Transfer of fatty acids from mothers to their calves during lactation in white whales *Delphinapterus leucas*. *Mar Ecol Prog Ser* 298:287–294.

- Bryant PJ, Lafferty CM. and Lafferty SK. 1984. Reoccupation of Laguna Guerrero Negro, Baja California, Mexico, by gray whales. pp. 375-87. In: M.L. Jones, S.L. Swartz and S. Leatherwood (eds.) *The Gray Whale, Eschrichtius robustus*. Academic Press, Inc., Orlando, Florida. xxiv+600pp.
- Budge SM, Springer AM, Iverson SJ, Sheffield G, Rosa C. 2008. blubber fatty acid composition of bowhead whales, *Balaena mysticetus*: Implications for diet assessment and ecosystem monitoring. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 359, 40- 46.
- Caraveo- Patiño J, Wang Y, Soto LA, Ghebremeskel K, Lehane C, Crawford MA. 2009. Eco- physiological repercussions of dietary arachidonic acid in cell membranes of active tissues of Gray whale. *Marine Ecology*. 30, 437- 447.
- Christie WW. 1989. *Gas chromatography and lipids: a practical guide*. The Oily Press, England. 184 pp.
- Christie WW. 2003. *Lipids analysis*. The Oily Press, England. 416 pp.
- 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-IPN. La Paz, B.C.S. 75 pp.
- Fish FE. 2000. Biomechanics and energetics in aquatic and semi- aquatic mammals: platypus to whale. *Physiol Biochem Zool* 73:683–698.
- Fisher HD, Harrison RJ (1970) Reproduction in the common porpoise (*Phocoena phocoena*) of the north Atlantic. *J Zool (London)* 161:471-486.
- Folch, J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Gaskin DE, Smith GJD, Watson AP, Yasui WY, Yurick DB. 1984. Reproduction in the porpoises (*Phocoenidae*): implications for management. *RepIntWhalingComm(SpecialIssue6)*:135 148.
- Gaskin DE. 1992. Status of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, in Canada. *Can Field-Nat* 106:36 54.

- Grahl- Nielsen O, Mjaavatten O. 1991. Dietary influence on fatty acid composition of blubber fat of seaals as determined by biopsy: a multivariate approach. *Marine Biology*. 110, 59- 64.
- Grahl-Nielsen O, Andersen M, Derocher AE, Lydersen C, Wiig Ø, Kovacs KM. 2003. Fatty acid composition of the adipose tissue of polar bears and of their prey: ringed seals, bearded seals and harp seals. *Mar Ecol Prog Ser* 265:275 – 282.
- Grahl- Nielsen O, Halvorsen AK, Bodev N, Averina L, Radnaeva I, Pronin N, Käkälä R, Petrov E. 2005. Fatty acid composition of blubber of the Baikal seal *Phoca sibirica* and its marine relative, the ringed seal *P. hispida*. *Marine Ecology Progress Series*. 303, 262- 274.
- Heyerdahl EF. 1932. Hvalindustrien. En teknisk-kjemisk undersøkelse. I Råmateriale. Publ 7. Kommandør Chr. Christensens Hvalfangstmuseum, Sandefjord.
- Highsmith RC, Coyle KO. 1990. High productivity of Northern Bering Sea benthic amphipods. *Nature*, 344, 862–864.
- Hooker S, S. Iverson, P. Ostrom y S. Smith. 2001. Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty-acid and stable-isotope analyses of biopsy samples. *Canadian Journal of Zoology*. 79: 1442-1454.
- Iverson SJ. 1993. Milk secretion in marine mammals in relation to foraging: can milk fatty acids predict diet? *Symp. Zool. Soc. Lond.* 66: 263-291.
- Iverson SJ, Oftedal OT, Bowen WD, Boness DJ, Sampugna J. 1995. Prenatal and postnatal transfer of fatty acids from mother to pup in the hooded seal. *J Comp Physiol B* 165: 1–12.
- Iverson SJ, Frost KJ, Lowry LF. 1997. Fatty acid signatures reveal fine scale structure of foraging distribution of harbor seals and their prey in Prince William Sound, Alaska. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 151, 255–271.
- Iverson SJ. 2002. Blubber. In: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM (eds) *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press, San Diego, p 107–112.
- Iverson SJ, Field C, Bowen WD, Blanchard W. 2004. Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diet. *Ecol. Monogr.* 74, 11–235.

- Iverson SJ, Springer AM, Kitaysky AS. 2007. Seabirds as indicators of food web structure and ecosystem variability: qualitative and quantitative diet analyses using fatty acids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 352, 235–244.
- Iverson S. 2008. Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative indicators to quantitative determination. 281-307 pp. En: M. T. Arts et al. (eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*.
- Iverson, S.J. 2009. Blubber. pp. 115-120 in Perrin, W.F., Wursig, B. and Thewissen, H.G.M. (eds.) *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd Edition. Academic Press, Elsevier, San Diego.
- Jeffcoat R. 1979. The biosynthesis of unsaturated fatty acids and its control in mammalian liver *Essays Biochem* 15:1-36.
- Jensen RG (1988) *The lipids of human milk*. CRC Press, Boca Raton.
- Käkelä R, Hyvärinen H.1996. Site-specific fatty acid composition in adipose tissues of several northern aquatic and terrestrial mammals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 115, 501–514.
- Koopman HN, Iverson SJ, Gaskin DE.1996. Stratification and age-related differences in blubber fatty acids of the male harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *J. Comp. Physiol. B.* 165, 628–639.
- Koopman HN. 2001. The structure and function of the blubber of odontocetes. PhD thesis, Duke University, Durham, NC.
- Koopman HN. 2007. Phylogenetic, ecological, and ontogenetic factors influencing the biochemical structure of the blubber of odontocetes. *Marine Biology* 151:277–291.
- Le Boeuf BJ, Pérez-Cortés MH, Urbán R J, Mate BR. and Ollervides U F. 2000. High gray whale mortality and low recruitment in 1999: potential causes and implications. *J. Cetacean Res. Manage.* 2(2):85-99.
- Lockyer CH, McConnell LC, Waters TD.1984. The biochemical composition of fin whale blubber. *Can J Zool* 62:2553-2562.

- Moore S, Urbán R J, Perryman W, Gulland F, Pérez-Cortés, H, Rojas-Bracho L. and Rowles T. 2001. Are gray whales hitting 'K' hard? *Mar. Mammal Sci.* 17(4):954-8.
- Olsen E, Grahl- Nielsen O. 2003. Blubber fatty acids of minke whales: stratification, population identification and relation to diet. *Marine Biology*, 142: 13- 24.
- Oftedal OT. 1993. The adaptation of milk secretion to the constraints of fasting in bears, seals, and baleen whales. *Journal of Dairy Science*, 76, 3234–3246.
- Palacios E, IS Racotta, H Heras, H Marty y J Moal. 2001. The relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aqua. Int.* 9: 531-543.
- Reef D, Best PB. 2006. A biopsy system for deep-core sampling of the blubber of southern right whales, *Eubalaena australis*. *Marine Mammal Science*. 22, 206-213 pp.
- Rice DW & Wolman AA. 1971. The life history and ecology of the gray whale (*Eschrichtius robustus*). *American Society of Mammalogists, Special Publication* 3, 1–142.
- 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 AM, Worthy AJ (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.
- Scollan ND, A. Choi, E. Kurt, A.V. Fisher, M. Enser & J. Wood. 2001. Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *British Journal of Nutrition*. 85: 115- 124.
- Struntz DJ, McLellan WA, Dillaman RM, Blum JE, Kucklick JR, Pabst DA. 2004. Blubber Development in Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Morphology* 259: 7-20.

- Urbán RJ, Gómez-Gallardo UA. and Ludwig S. 2003b. Abundance and mortality of gray whales at Laguna San Ignacio, México, during the 1997-98 El Niño and the 1998-99 La Niña. *Geofísica Iternacional* 42(3):439-6.
- West GC, Burns JJ, Moddafferi M. 1979. Fatty acid composition of blubber from the four species of Bering Sea phocid seals. *Can. J. Zool.*, 57-189.
- Williams G, Davidson BC, Stevens P, Crawford MA. 1977. Comparative fatty acids of the dolphin and the herring. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 328.