



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA
ECOLOGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA
REPRODUCTIVA DEL TIBURÓN BLANCO
Carcharodon Carcharias
EN ISLA GUADALUPE, MÉXICO

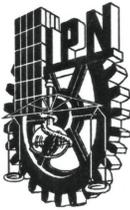
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

EDGAR EDUARDO BECERRIL GARCÍA

LA PAZ, B.C.S., ENERO DE 2023



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de La Paz, B.C.S. 12 de Marzo del 2022

El Colegio de Profesores de Posgrado de CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS en su Sesión
(Unidad Académica)

Ordinaria No. 0-354-22 celebrada el día 11 del mes Marzo de 2022 conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	BECERRIL	Apellido Materno:	GARCÍA	Nombre (s):	EDGAR EDUARDO
-------------------	----------	-------------------	--------	-------------	---------------

Número de registro: B 1 8 0 6 3 1

del Programa Académico de Posgrado: DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

“AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA ECOLOGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL TIBURÓN BLANCO
Carcharodon carcharias EN ISLA GUADALUPE, MÉXICO”

Objetivo general del trabajo de tesis:

Conocer la abundancia estacional, preferencias ambientales e interacciones ecológicas; así como desarrollar un método poco invasivo para estudiar la endocrinología reproductiva del tiburón blanco *Carcharodon carcharias* mediante biopsias de piel y LC-MS/MS en Isla Guadalupe, México.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ 2° Director: DRA, CELINE ALEXIA GODARD

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

EL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS - IPN

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ

2° Director de Tesis (en su caso)

DRA. CELINE ALEXIA GODARD

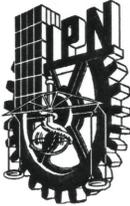
Aspirante

MC. EDGAR EDUARDO BECERRIL GARCÍA

Presidente del Colegio

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 09 del mes de Diciembre del 2022 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS para examinar la tesis titulada: “AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA ECOLOGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL TIBURÓN BLANCO *Carcharodon carcharias* EN ISLA GUADALUPE, MÉXICO” del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	BECERRIL	Apellido Materno:	GARCÍA	Nombre (s):	EDGAR EDUARDO
-------------------	----------	-------------------	--------	-------------	---------------

Número de registro: B 1 8 0 6 3 1

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 3 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI NO SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

El porcentaje de similitud se explica por los artículos científicos derivados de la tesis y publicados en revistas JCR, donde estudiante figura como primer autor.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

“SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES”

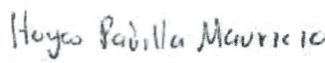
COMISIÓN REVISORA DE TESIS


DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ
Director de Tesis
Nombre completo y firma


DR. FELIPE GALVÁN MAGAÑA
Nombre completo y firma


DR. FERNANDO RICARDO ELORRIAGA
VERPLANCKEN
Nombre completo y firma


DRA. CELINE ALEXIA GODARD
Director de Tesis
Nombre completo y firma


DR. EDGAR MAURICIO HOYOS PADILLA
Nombre completo y firma


DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO
Nombre completo y firma
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



NOMBRE DEL TRABAJO

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA
ECOLOGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA REPROD
UCTIVA DEL TIBURÓN BLANCO Carcharo
d

AUTOR

EDGAR EDUARDO BECERRIL GARCÍA

RECuento DE PALABRAS

46129 Words

RECuento DE CARACTERES

247292 Characters

RECuento DE PÁGINAS

164 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

4.0MB

FECHA DE ENTREGA

Dec 7, 2022 1:56 PM GMT-7

FECHA DEL INFORME

Dec 7, 2022 1:59 PM GMT-7**● 3% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base c

- 3% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 1% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossr

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)



Dr. Marcial Arellano Martínez



Dra. Celine Alexia Godard Codding



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

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 14 del mes de Diciembre del año 2022

El (la) que suscribe M en C. EDGAR EDUARDO BECDERRIL GARCÍA Alumno (a) del Programa

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro B180631 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ Y DRA. CELINE ALEXIA GODARD CODDING

y cede los derechos del trabajo titulado:

“AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA ECOLOGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA
DEL TIBURÓN BLANCO *Carcharodon carcharias* EN ISLA GUDALUPE, MÉXICO”

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes dirección(es) de correo: ebecerrilg1500@alumno.ipn.mx- marellam@ipn.mx -

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

M en C. EDGAR EDUARDO BECERRIL GARCÍA

Nombre completo y firma autógrafa del (de la) estudiante

Dedicatoria



A mis maestros

A mi esposa

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por proporcionar las condiciones necesarias para el desarrollo académico, profesional, y cultural de sus estudiantes. En especial, agradezco sinceramente a todos aquellos compañeros, académicos y administrativos que brindaron su apoyo y voluntad para el cumplimiento de las metas planteadas. Las publicaciones como tesis y artículos son resultado del trabajo en equipo dentro de esta institución. La cual, requiere del compromiso de todos sus integrantes para cumplir con la noble responsabilidad social de poner los conocimientos técnicos y científicos, al servicio del país.

A The Institute of Environmental and Human Health de Texas Tech University, por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de una estancia de investigación y por las capacitaciones sobre seguridad y trabajo en sus laboratorios. En especial, a los administrativos, técnicos, profesores y compañeros del posgrado por su apoyo durante la estancia y los análisis endocrinológicos.

A las autoridades mexicanas incluyendo a la Secretaría de Gobernación, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Secretaría de Marina, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, por los permisos para realizar investigación científica en territorio mexicano. Agradezco sinceramente a Roberto y Adrián de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente por el apoyo para realizar los trámites de exportación de muestras.

Al Instituto Mexicano de la Juventud y a la Secretaría de Desarrollo Social por el otorgamiento de la beca IMJUVE 2018, la cual, fue de gran apoyo para la realización de una estancia de investigación clave en el desarrollo de un capítulo de la presente tesis.

Al Dr. Marcial Arellano-Martínez, por su ejemplo, enseñanzas y consejos sobre la labor del investigador científico. La dirección de este trabajo y su confianza, permitieron extender los horizontes de la tesis hacia un enfoque multidisciplinario que brindará frutos aún después de la conclusión. Le agradezco por confiar en mí y darme la

oportunidad de crecer como investigador. Esto se vio reflejado al permitirme acompañarlo en cátedras de Ecotoxicología, ingresar al sistema de la Beca de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) y por aprovechar los estímulos del IPN para las publicaciones científicas en revistas con alto impacto. La seriedad y ecuanimidad en su quehacer científico forman parte del ejemplo de vida que brinda a sus estudiantes.

A la Dra. Céline Godard-Codding, por su dirección, consejos e ideas que fortalecieron el trabajo de tesis bajo el espectro del alto rigor científico y la autocrítica. La experiencia de nuestra colaboración me ha brindado lecciones valiosas sobre liderazgo y comunicación en la ciencia. Las habilidades técnicas impartidas en su laboratorio, así como la retroalimentación con otros compañeros del instituto, permiten la generación de conocimiento en beneficio de México y Estados Unidos de América. Confío en que el esfuerzo realizado será un motor para la implementación de nuevas herramientas que favorezcan la recuperación de especies amenazadas.

Al Dr. Mauricio Hoyos Padilla, por brindarme la oportunidad de estudiar al tiburón blanco en 2012 y promover el conocimiento científico de esta especie relevante para los ecosistemas marinos mexicanos. Trabajar junto a ti y tu equipo ha sido enriquecedor en múltiples aspectos de mi vida. Los conocimientos generados en esta tesis son un producto más, del valor de tu trabajo, iniciativa y esfuerzo en la conservación del tiburón blanco. Los conocimientos logísticos, técnicos y científicos aprendidos bajo tu liderazgo son tesoros valiosos en la formación de cualquier profesional. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Felipe Galván Magaña, por aceptarme en su laboratorio y permitirme aprender de su equipo desde mi primer año en la ciudad de La Paz. Su presencia ha representado un pilar y un oasis en el desarrollo de sus estudiantes, pues nos ha brindado la oportunidad de entrar y conocer el mundo del estudio de los tiburones y rayas. Esto se ve claramente en las facilidades que usted y su laboratorio otorgan al desarrollo de los estudiantes, ya sea para acciones a nivel local con amigos pescadores, o a nivel internacional con otros expertos. La generación de conocimientos que usted promueve, son un ambiente que ha favorecido mucho mi

desarrollo como profesional, pero también como persona. Le agradezco sinceramente a usted y a Cristina por su apoyo en las múltiples situaciones que hemos vivido tanto en el ámbito académico como personal.

Al Dr. Fernando Elorriaga-Verplancken por sus consejos y apoyo en el diseño metodológico y logístico de los proyectos. Sus enseñanzas y alto rigor científico promovieron la calidad de la información para la obtención de conocimiento útil en la conservación de especies amenazadas. Le agradezco por confiar en las ideas del proyecto, así como por promover y llevar a cabo ciencia de frontera en nuestro país. Gracias por todas las conversaciones y asesorías, pues fueron de gran alivio para dirigir puntualmente acciones importantes en el ámbito personal y profesional.

Al Dr. Rogelio González Armas, por su apoyo incondicional en los diferentes desafíos que enfrentamos desde el inicio de la tesis. Le agradezco por sus consejos y apoyo para el desarrollo de esta tesis y otros proyectos de investigación, que nos resultan sumamente apasionantes. Espero que el futuro brinde más enseñanzas y lecciones de un gran profesor como lo es usted.

A Raúl Martínez y Arturo Ayala Bocos por su apoyo constante en el desarrollo de resultados y discusiones que repercutieron en el manejo de recursos. Su visión y paciencia fue una luz que permitió la conclusión de este y otros proyectos.

A los prestadores de servicios turísticos y a las tripulaciones de Cantamar, Horizon, Islander, Solmar V, Nautilus Explorer, y Storm por su apoyo durante la permanencia en Isla Guadalupe. Un agradecimiento especial a Fernando Aguilar, por sus consejos y asesoría.

A B.M. Saúl González Romero y su familia, por sus enseñanzas y apoyo. Les agradezco sinceramente por guiarme durante mi primera temporada de investigación y abrir mis horizontes hacia otras instituciones educativas y sobre todo, hacia Isla Guadalupe. Las enseñanzas que he tenido en esta reserva de la biósfera fueron motivadas por su esfuerzo e invitación a trabajar con ustedes. Te agradezco tu liderazgo, tu calidad como científico y como persona. Muchas gracias por confiar en mí y darme un lugar en mi primer viaje hacia Isla Guadalupe. Nunca lo voy a olvidar.

A mis padres Socorro y Eduardo, a mi hermano Enrique, y mis amigos por su amor y apoyo durante este periodo de mi vida. Gracias a Dios y a la presencia de ustedes, pude superar los desafíos con el apoyo constante que encontré en sus palabras. Les agradezco su paciencia y retroalimentación, pues sus conocimientos y críticas me ayudaron a fortalecer el trabajo y mi propia persona. Los tengo siempre en mente y en mi corazón.

A mi esposa Daniela, por ser compañera de vida y brindarme paz en cada momento. Por apoyarme con amor y paciencia, por darme ánimos y compartir tus opiniones y consejos, por ser maestra y amiga. Gran parte de este trabajo se debe a ti, pues desde el principio creíste en los alcances del proyecto y en mi propia persona. Gracias por compartir lecciones juntos, cada día me has hecho sonreír.

A todos aquellos que apoyaron con el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

Lista de Tablas	1
Lista de Figuras.....	3
Glosario	6
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	15
Contexto socioeconómico	15
Conservación y normatividad.....	15
Aprovechamiento	18
Contexto ecológico.....	22
Características generales	22
Ecología espacial en el Pacífico Mexicano	25
Uso de hábitat en Isla Guadalupe.....	26
Contexto reproductivo	28
Investigación sobre la reproducción del tiburón blanco en Isla Guadalupe	35
JUSTIFICACIÓN	36
OBJETIVOS	37
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS PARTICULARES	37
MATERIALES Y MÉTODO.....	38
Área de estudio.....	38
Consideraciones metodológicas generales.....	39
CAPÍTULO I. ESTIMACIÓN DE ABUNDANCIA DURANTE LA TEMPORADA TURÍSTICA	41
Resumen.....	41
Introducción	42
Materiales y método.....	43
Resultados	44
Discusión	45
CAPÍTULO II. PREFERENCIAS AMBIENTALES, ESPACIALES, Y TEMPORALES	49
Resumen.....	49

Introducción	50
Materiales y método.....	53
Datos espaciales, temporales y ambientales.....	54
Modelación estadística	54
Resultados	56
Modelación estadística	56
Resumen de resultados.....	57
Discusión	63
Segregación espacial y temporal.....	63
Temperatura superficial del mar	65
Visibilidad y Marea.....	67
Fase Lunar y cobertura de nubes	68
Manejo y conservación	69
CAPÍTULO III. INTERACCIONES CON CEFALÓPODOS.....	71
Resumen.....	71
Introducción	72
Materiales y Método.....	73
Resultados	74
Discusión	82
CAPÍTULO IV. BIOPSIAS DE PIEL (50 mg) COMO MATRIZ BIOLÓGICA PARA EL MONITOREO LC-MS/MS DE HORMONAS ESTEROIDES.....	85
Resumen.....	85
Introducción	86
Generalidades	86
Investigación en vertebrados y estado del arte en condriactos.....	88
Panorama y futuras direcciones de investigación.....	89
Materiales y Método.....	91
Datos biológicos y obtención de muestras.....	92
Extracción líquido-líquido de hormonas esteroideas	93
Detección de hormonas	94
Control de calidad.....	94
Análisis LC-MS/MS	95
Resultados	97

Discusión	102
Conclusión	105
RECOMENDACIONES	106
ANEXO I. DESARROLLO DEL MÉTODO. Extracción en fase sólida y LC-MS/MS en de piel, músculo, hígado, gónadas y suero sanguíneo de <i>H. dipterurus</i> y <i>M. lunulatus</i>	107
Introducción	107
Objetivo general	107
Objetivos particulares.....	107
Materiales y Método.....	108
Obtención de biopsias de especies comerciales	108
Extracción de hormonas	108
Valores de referencia en suero sanguíneo	108
Extracción en fase sólida en tejidos de especies comerciales.....	109
Detección de hormonas y análisis LC-MS/MS.....	110
Resultados	110
Valores de referencia en suero sanguíneo	111
Recuperación y precisión por matriz analizada	111
Perfiles hormonales de <i>M. lunulatus</i>	113
Perfiles hormonales de <i>H. dipterurus</i>	116
CONCLUSIONES	119
ANEXO II. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO. Pruebas de extracción en fase líquida y LC-MS/MS en piel de <i>H. dipterurus</i> y <i>M. lunulatus</i>	122
Introducción	122
Objetivo general	123
Objetivos particulares.....	123
Materiales y Método.....	123
Resultados	123
Hormonas en <i>H. dipterurus</i> : Prueba 50 vs 150 mg y concentraciones observadas	125
Hormonas en piel de <i>M. lunulatus</i>	127
Comparación con suero sanguíneo	127
Conclusiones	130

LITERATURA CITADA..... 131

Lista de Tablas

Tabla 1. Datos de marcaje-recaptura utilizados para la estimación de abundancia de tiburón blanco <i>C. carcharias</i> mediante el método Schnabel en Isla Guadalupe (2012-2014). Abreviaturas: total de individuos marcados en la muestra t (C_t); recapturas en la muestra t (R_t); número de individuos marcados antes de la muestra t (M_t).	44
Tabla 2. Selección progresiva hacia atrás del modelo aditivo generalizado para <i>C. carcharias</i> según sexo y estadio de madurez ($n = 3.033$ registros). Dev. exp. = desviación explicada (%), Aj. $R^2 = R^2$ ajustado, AIC = Criterio de información de Akaike. En negrita los modelos mejor equipados. La última fila representa el modelo nulo (media general).	62
Tabla 3. Registros de tiburones blancos con cicatrices infligidas por calamares en Isla Guadalupe, México. Longitud total (TL). Misma cicatriz observada después de dos temporadas (*).	76
Tabla 4. Límites de detección (ng/mL) y cuantificación (ng/mL) de las hormonas analizadas en piel de <i>C. carcharias</i> vía extracción líquido-líquido y LC-MS/MS.	97
Tabla 5. Porcentaje de recuperación de hormonas esteroides extraídas de 50 mg de piel de <i>C. carcharias</i> y valores de precisión expresados en desviación estándar relativa. SD= Sin datos.	98
Tabla 6. Tabla 6. Perfiles hormonales de los individuos analizados de <i>Carcharodon carcharias</i> ($n=20$) provenientes de Isla Guadalupe, Baja California, vía extracción líquido-líquido en biopsias de piel (50 mg) y LC-MS/M, con información sobre su sexo (M=Macho; H= Hembra), estadio reproductivo, y concentración de hormonas en ng/mL (E2=estradiol; T= testosterona; P4= progesterona; CORT= corticosterona; E1= estrona; A4= androstenediona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol; E= cortisona). Valor entre paréntesis indica una detección por debajo del límite de cuantificación. NE= No encontrada.	101
Tabla 7. Límites de detección (ng/mL) y cuantificación (ng/mL) para las nueve hormonas analizadas en tejidos de elasmobranquios comerciales vía QueChERS y LC-MS/MS.	111
Tabla 8. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en suero sanguíneo de elasmobranquios comerciales. ..	111
Tabla 9. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en piel de elasmobranquios comerciales.	112
Tabla 10. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en músculo de elasmobranquios comerciales.	112
Tabla 11. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en hígado de elasmobranquios comerciales.	113
Tabla 12. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en gónadas de elasmobranquios comerciales.	113
Tabla 13. Panel hormonal de los individuos analizados de <i>Mustelus lunulatus</i> vía QueChERS y LC-MS/MS capturados en Punta Lobos, BCS, con información sobre su	

sexo (M=Macho; H= Hembra), estadio reproductivo, tejido (S=Suerdo; P= Piel; M= Músculo; H=Hígado; G= Gónada), y concentración de hormonas en ng/mL (E1= estrona; E2=estradiol; A4= androstenediona; T= testosterona; P4= progesterona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol; CORT= corticosterona; E= cortisona). Guion indica que el análisis no fue realizado en la matriz e individuo correspondiente. Valores en paréntesis indican detecciones por debajo del límite de cuantificación, *debajo del límite de detección..... 117

Tabla 14. Perfiles hormonales de los individuos analizados de *Hypanus dipterurus* vía QueChERS y LC-MS/MS capturados en Bahía de La Paz, BCS, con información sobre su sexo (M=Macho; H= Hembra), estadio reproductivo, tejido (S=Suerdo; P= Piel; M= Músculo; H=Hígado; ; G= Gónada), y concentración de hormonas en ng/mL (E1= estrona; E2=estradiol; A4= androstenediona; T= testosterona; P4= progesterona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol; CORT= corticosterona; E= cortisona). El guion indica que el análisis no fue realizado en la matriz e individuo correspondiente. Valores en paréntesis indican detecciones por debajo del límite de cuantificación. NE= no encontrado, *debajo del límite de detección..... 120

Tabla 15. Porcentaje de recuperación de hormonas esteroides extraídas de 50 mg de piel de *Hypanus dipterurus* con valores de precisión expresados en términos de desviación estándar relativa..... 124

Tabla 16. Perfiles hormonales obtenidos vía LC-MS/MS a partir de extracción líquido-líquido en piel (50 y 150 mg) de *Hypanus dipterurus* (n=20). Se incluye información sobre sexo (M=Macho; H= Hembra), ancho de disco (AD, cm), estadio reproductivo, y concentración de hormonas en ng/mL (E2=estradiol; T= testosterona; P4= progesterona; CORT= corticosterona; E1= estrona; A4= androstenediona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol). Valores entre paréntesis indican detecciones por debajo del límite de cuantificación. NE= No encontrada; *debajo del límite de detección. 128

Tabla 17. Comparación de perfiles hormonales obtenidos entre muestras de 50 y 150 mg que detectaron picos hormonales en *H. dipterurus*. Sexo (M=Macho; H= Hembra), estadio reproductivo, masa (mg), y concentración de hormonas en ng/mL (T= testosterona, E1= estrona, , F=cortisol). Valores entre paréntesis indican detecciones por debajo del límite de cuantificación. NE= No encontrada; *debajo del límite de detección..... 129

Tabla 18. Perfiles hormonales de los individuos analizados de *Mustelus lunulatus* (n=6) vía extracción líquido-líquido y LC-MS/MS capturados en Punta Lobos, BCS, con información sobre su sexo (M=Macho; H= Hembra), longitud total (LT, cm), estadio reproductivo, matriz biológica analizada, y concentración de hormonas en ng/mL (E2=estradiol; T= testosterona; P4= progesterona; CORT= corticosterona; E1= estrona; A4= androstenediona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol; E= cortisona). Valor entre paréntesis indica detección por debajo del límite de cuantificación. NE= No encontrada; *debajo del límite de detección..... 129

Lista de Figuras

Figura 1. Tiburón blanco <i>C. carcharias</i> capturando una cabeza de atún proporcionada por el ecoturismo en Isla Guadalupe, México.....	18
Figura 2. Buceo en jaula superficial para el avistamiento del tiburón blanco <i>C. carcharias</i> en Isla Guadalupe, México.	19
Figura 3. Embarcación estadounidenses durante la actividad de avistamiento de <i>C. carcharias</i> en Isla Guadalupe, México.	20
Figura 4. Avistamiento de tiburón blanco <i>C. carcharias</i> dentro de una jaula de buceo a 10 m de profundidad en Isla Guadalupe, México.	21
Figura 5. Tiburón blanco <i>C. carcharias</i> en Isla Guadalupe, México.	23
Figura 6. Distribución potencial de <i>C. carcharias</i> en color morado, con sus principales regiones de ocurrencia en color amarillo (IUCN, 2022).....	24
Figura 7. Grupos taxonómicos presentes en las interacciones tróficas del tiburón blanco <i>C. carcharias</i> : A) Phocidae; B) Otariidae; C) Cephalopoda ; D) Carangidae.	25
Figura 8. Modelo general de la endocrinología de condriictios machos en términos de hormonas esteroides y biología reproductiva. Abreviaturas: GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del folículo; E2, 17 β -estr17 β -estradiol; T, testosterona; P4, progesterona; DHT, 5 α -dihidrotestosterona; 11-KT, 11 cetotestosterona; CORT, corticosterona; A4, androstenediona; DOC, 11 desoxicorticosterona; 3 α -diol, 5 α -androstano-3 α , 17 β -diol.	31
Figura 9. Modelo general de la endocrinología de condriictios hembra en términos de hormonas esteroides y biología reproductiva. Abreviaturas: GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del folículo; E2, 17 β -estr estradiol; T, testosterona; progesterona (P4); DHT, 5 α -dihidrotestosterona; 11-KT, 11 cetotestosterona; CORT, corticosterona; A4, androstenediona; 17-OHP, 17-hidroxiprogesterona; E1, estrona; E3, estriol; E, cortisona; F, cortisol; S, 11-desoxicortisol; DHP, dihidroprogesterona; DOC, 11 desoxicorticosterona; 11KA4, 11-cetoandrostenediona; 3 α -diol, 5 α androstano-3 α , 17 β -diol; 17P5, 17 hidroxipregnenolona; 11-DHC, 11-deshidrocorticosterona.....	32
Figura 10. Ubicación y batimetría de Isla Guadalupe, Baja California, México. El recuadro rojo señala la bahía Rada Norte, área de estudio de la presente tesis. Tomada de Becerril-García et al. (2020d).	39
Figura 11. Zonas corporales utilizadas para análisis de patrones de pigmentación durante la foto-identificación de <i>C. carcharias</i>	41
Figura 12. Regresión lineal del número acumulado de tiburones blancos marcados (M_t) frente a la proporción de individuos recapturados y marcados (R_t/C_t) utilizada para determinar el cumplimiento de los supuestos del método Schnabel. Abreviaturas: individuos marcados en la muestra t (C_t); recapturas en la muestra t (R_t); número de individuos marcados antes de la muestra t (M_t).	45

Figura 13. Gráficos de efectos del modelo aditivo generalizado para machos maduros de *C. carcharias*. Todos los valores están en la escala del predictor lineal. Las gráficas de contorno indican la distribución preferida de los tiburones, mientras que el color más altos. Las líneas discontinuas representan dos errores estándar por encima y por debajo de la estimación de la curva suave. Los números que siguen al nombre de la variable predictora indican los grados de libertad efectivos de la curva suave. El gráfico de alfombra muestra observaciones de variables predictoras. 58

Figura 14. Gráficas de efectos del modelo aditivo generalizado para machos inmaduros de *C. carcharias*. Todos los valores están en la escala del predictor lineal. Las gráficas de contorno indican la distribución preferida de los tiburones, mientras que el color más claro indica valores más altos. Las líneas discontinuas representan dos errores estándar por encima y por debajo de la estimación de la curva suave. Los números que siguen al nombre de la variable predictora indican los grados de libertad efectivos de la curva suave. El gráfico de alfombra muestra observaciones de variables predictoras..... 59

Figura 15. Gráficos de efectos del modelo aditivo generalizado para hembras maduras de *C. carcharias*. Todos los valores están en la escala del predictor lineal. Las gráficas de contorno indican la distribución preferida de los tiburones, mientras que el color más claro indica valores más altos. Las líneas discontinuas representan dos errores estándar por encima y por debajo de la estimación de la curva suave. Los números que siguen al nombre de la variable predictora indican los grados de libertad efectivos de la curva suave. El gráfico de alfombra muestra observaciones de variables predictoras..... 60

Figura 16. Gráficas de efectos del modelo aditivo generalizado para hembras inmaduras de *C. carcharias*. Todos los valores están en la escala del predictor lineal. Las gráficas de contorno indican la distribución preferida de los tiburones, mientras que el color más claro indica valores más altos. Las líneas discontinuas representan dos errores estándar por encima y por debajo de la estimación de la curva suave. Los números que siguen al nombre de la variable predictora indican los grados de libertad efectivos de la curva suave. El gráfico de alfombra muestra observaciones de variables predictoras..... 61

Figura 17. Zonas con mayor probabilidad de ocurrencia de tiburones blancos según su estadio de madurez sexual en Rada Norte, Isla Guadalupe, México. 63

Figura 18. Registros más conspicuos de cicatrices de calamar (▲) sobre individuos de *C. carcharias* en Isla Guadalupe, México (2008-2019). WS11 (a, b); WS12 (c); WS01 (d); WS13 (e). Cicatrices en las que se estimó digitalmente su longitud (1,2).75

Figura 19. Individuos de *C. carcharias* registrados con cicatrices de calamar (▲) en Isla Guadalupe, México (2008-2019); a) WS01; b) WS02; c) WS03; d) WS04. 77

Figura 20. Registros fotográficos del individuo *C. carcharias* WS11 los días: 13 de octubre de 2017 (a); 9 de septiembre de 2019 (b, c); 21 de septiembre de 2019 (d); 16 de octubre de 2019 (e); y 10 de noviembre de 2019 (f) en las aguas que rodean Isla Guadalupe, México. 81

Figura 21. Diagrama general de las rutas en la esteroidogénesis humana como ejemplo de las rutas metabólicas para la síntesis de esteroides en vertebrados (Tomado de: Häggström y Richfield 2014).....	87
Figura 22. Literatura científica relacionada con el análisis de hormonas esteroides en condriictos durante 1963-2020 (n = 59 artículos). (A) Metodología, (B) matriz biológica, (C) hormonas por artículo y (D) número de artículos según periodo de estudio. Abreviaturas: RIA, radioinmunoensayo; EIA / ELISA, inmunoensayo enzimático o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima; TRFIA, inmunoensayo fluorescente de resolución temporal; PC / TLC-GC, cromatografía en papel o cromatografía en capa fina seguida de cromatografía de gases; LC-MS / MS, cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo e ionización por electro pulverización con monitorización de reacciones múltiples; P, plasma; H, histotrofo; M, músculo; G, gónada; S, suero; Se, Semen; Y, yema de huevo (Tomado de: Becerril-García et al. 2020a).....	90
Figura 23. Valores de precisión en términos de desviación estándar relativa (DER) en la medición de siete hormonas esteroides de piel de <i>C. carcharias</i> . Línea marca el valor de precisión mínimo según los criterios del Método 539 EPA.....	98
Figura 24. Porcentaje de recuperación de siete hormonas esteroides extraídas de 50 mg de piel de <i>C. carcharias</i> . Línea marca el % mínimo según los criterios del Método 539 EPA.	99
Figura 25. Tiburones blancos con detecciones de picos hormonales en 50 mg de piel analizada vía LC-MS/MS: a. TB4 (hembra, 450 cm LT, estrona); b. TB15 (hembra, 350 cm LT, estrona); c. TB16 (hembra, 600 cm LT, estrona); d. TB14 (hembra, 350 cm, 17-hidroxiprogesterona); e. TB2 (macho, 400 cm LT, testosterona); f. TB7 (macho, 250 cm LT, testosterona).	100
Figura 26. Pico de E2 observado en piel de la hembra preñada de <i>M. lunulatus</i> (A); curva de calibración de la hormona E2 (B).	115
Figura 27. Valores de precisión en términos de desviación estándar relativa (DER) en la medición de siete hormonas esteroides de piel <i>Hypanus dipterus</i> y <i>Carcharodon carcharias</i> para fines de comparación.....	124
Figura 28. Porcentaje de recuperación de siete hormonas esteroides extraídas de 50 mg de piel de <i>Hypanus dipterus</i> y <i>Carcharodon carcharias</i> para fines de comparación.....	125
Figura 29. Proporción de muestras en las que se detectaron picos de hormonas esteroides extraídas de 50 (n=10) y 150 mg de piel (n=9) de <i>H. dipterus</i>	126

Glosario

Abundancia. Número de individuos de una especie presentes en una muestra o población biológica.

Ausencia. Categoría dentro de una escala nominal dicotómica con valor “0” utilizada para registrar el tiempo durante el que individuos de un taxón no está presente.

Avistamiento. Registro de uno o varios individuos de una especie dentro un espacio y tiempo específico.

Analito. Sustancia química de interés analítico, detectable y cuantificable.

Batoideo. Miembro de la división Batomorphi (Nelson et al. 2016), que incluye a más de 500 especies de peces cartilaginosos caracterizados por la presencia de 5-7 hendiduras branquiales ventrales y sin aleta anal. Incluye a rayas, guitarras, peces sierra y manta rayas.

Blanco. Solución, sin presencia de analito.

Categoría de madurez sexual. Agrupación de individuos de una misma especie con base en el sexo, talla y estadio de madurez.

Cefalópodo. Molusco marino perteneciente a la clase Cefalópoda, incluyendo calamares, pulpos, sepias y nautilus.

Condrictio. Pez cartilaginoso perteneciente a la clase Chondrichthyes, caracterizado por la presencia de un esqueleto cartilaginoso, válvula espiral y ausencia de vejiga gaseosa.

Cromatografía. Método fisicoquímico utilizado para la separación y/o cuantificación de un fluido mediante un proceso de adsorción, el cual, se lleva a cabo mediante el uso de una fase móvil y una fase estacionaria.

Diana. Estructuras celulares o glandulares del cuerpo que cuentan con receptores para reconocer y acoplar sustancias específicas basadas en su composición molecular, de naturaleza tanto endógena como exógena.

Epidídimo. Órgano sexual masculino especializado con una estrecha relación con los testículos, ya que permite el transporte, almacenamiento y la maduración de los espermatozoides.

Especie. Individuos de una o diferentes poblaciones, con la capacidad de generar descendencia fértil por reproducción sexual y/o asexual, y contar con potencial genético para la creación de nuevas especies bajo determinadas condiciones ambientales.

Foto identificación. Análisis de material audiovisual que permite la individualización de organismos de una muestra, con base en sus características anatómicas (sexo, tamaño, patrones de pigmentación, cicatrices, deformaciones, etc).

Matriz biológica. Sustancia o tejido de origen biológico que puede contener concentraciones de analitos.

Hígado. Órgano del sistema digestivo relevante en las secreciones intestinales y el metabolismo (almacenamiento y transformación) de la dieta. En este órgano suceden procesos como la síntesis de proteínas, modificación de la composición de grasas, transformación de proteínas y grasas en carbohidratos, transformación de desechos nitrogenados (ej. amoníaco) en sustancias menos dañinas (ácido úrico, urea), entre otros.

Hormona. Sustancia química secretada naturalmente en las glándulas de los organismos. Tienen la capacidad de incidir en la función de la misma glándula secretora, así como de otros órganos y tejidos del organismo.

Hormona esteroide. Tipo de sustancias químicas derivadas de la molécula de colesterol ($C_{27}H_{46}O$) que se relacionan con funciones biológicas relevantes como el crecimiento, la reproducción y la irritabilidad.

Glándula oviductal. Órgano relevante en el sistema reproductor de algunos vertebrados, que en elasmobranquios cumple funciones relacionadas con el almacenamiento de esperma, fecundación y transporte hacia el útero, así como de la tercer membrana o alantoides.

Gónada. Órgano del sistema reproductor donde se lleva a cabo la gametogénesis; se presenta como testículos en machos y ovarios en hembras.

LC-MS/MS. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Límite de detección. Concentración mínima necesaria para detectar la presencia de un analito.

Límite de cuantificación. Concentración mínima necesaria para cuantificar la cantidad de un analito.

Modelos aditivo generalizado. Ecuación matemática con representación lineal con la capacidad de predecir el comportamiento de datos no-lineales y su relación con determinadas variables mediante el uso de funciones de suavizado.

Músculo. Tejido estructural formado por miocitos, caracterizados por su forma de fibra y la capacidad de contracción y movimiento que otorgan al organismo. Se reconocen tres tipos, incluyendo al músculo liso cardiaco, y esquelético.

Ovario. Órgano con capacidad glandular que permite y regula la secreción de hormonas sexuales; así como el almacenamiento, maduración y liberación de ovocitos.

Ovocito. Célula germinal de las hembras derivada de las ovogonias.

Piel. Capa más externa del sistema tegumentario caracterizada por la presencia de células epiteliales, glándulas sebáceas y sudoríparas, así como de estructuras sensoriales que permiten la irritabilidad hacia el ambiente y regula la interacción con agentes exógenos.

Población. Conjunto de individuos de una misma especie biológica, distribuidos en un mismo tiempo y espacio que se reproducen entre sí y generan descendencia fértil.

Presencia. Estado en el que se encuentra un individuo ajeno a otro, dentro de un mismo tiempo y espacio.

Sitio de agregación. Espacio determinado por factores bióticos y abióticos donde los individuos de una misma especie se reúnen durante periodos específicos, con visitas reiteradas durante los años de vida o durante una o varias fases de su historia de vida.

Tiburón. Miembro de la División Selachii (Nelson et al. 2016) que incluye a más de 500 especies de peces cartilaginosos caracterizados por la presencia hendiduras branquiales laterales. Incluye a las especies de tiburones y cazones, tiburones sierra, angelitos, entre otros.

Testículo. Órgano glandular donde se lleva a cabo la generación de gametos masculinos o espermatogénesis.

Útero (*elasmobranquios*). Órgano que permite el desarrollo del embrión al regular el medio donde este se desarrolla.

RESUMEN

El tiburón blanco es una especie vulnerable a la extinción, aprovechada por el turismo en Isla Guadalupe, México, desde 2001. A pesar de su protección y aprovechamiento en este sitio de agregación (agosto-noviembre), la información básica para su manejo resulta insuficiente. El objetivo de esta tesis fue proporcionar conocimiento sobre su abundancia estacional, preferencias ambientales e interacciones ecológicas, y desarrollar una metodología poco invasiva para estudiar su endocrinología reproductiva mediante biopsias de piel y LC-MS/MS. En el aspecto ecológico, se estimó una abundancia de 78 tiburones (IC 95%; 62.1, 105.6 individuos) a partir de la aplicación del método Schnabel y 6,316 registros (2012-2014). Adicionalmente, se evidenció una segregación sexual, espacial y temporal de acuerdo con la categoría de tiburones, incluyendo: machos inmaduros, machos maduros, hembras inmaduras, y hembras maduras. Esta segregación se detectó al comparar la probabilidad de ocurrencia de cada categoría, mediante modelos aditivos generalizados (6,266 registros de presencia/ausencia), con relación a factores espaciales (latitud, longitud), temporales (hora del día) y ambientales (temperatura superficial del mar, visibilidad, marea, fase lunar, nubosidad). A partir de un proceso de foto-identificación, se obtuvo evidencia de interacciones tróficas con calamares, gracias a la detección de cicatrices de ventosas sobre el cuerpo de los tiburones (\bar{x} = 3.7 m, DE \pm 0,6 longitud total; n=14). La medición digital de cicatrices permitió sugerir a *Dosidicus gigas*, *Architeuthis dux*, y *Ommastrephes bartramii* como presas potenciales del tiburón blanco en la zona. Finalmente, el método desarrollado para estudiar la endocrinología reproductiva permitió extraer, detectar y cuantificar los niveles de siete hormonas esteroides de manera simultánea a partir de biopsias (50 mg) de piel. Este método permitirá analizar perfiles hormonales de especies protegidas con la finalidad de detectar periodos de maduración sexual, apareamiento, gestación y postparto con eficiencias similares a otros métodos, pero optimizando el uso de biopsias al utilizar un 95-98% menos de tejido.

Palabras clave: Chondrichthyes, métodos poco invasivos, especie vulnerable, conservación marina, hormonas.

ABSTRACT

The white shark is a species vulnerable to extinction, used by tourism in Guadalupe Island, Mexico, since 2001. Despite its protection and use in this aggregation site (August-November), the basic information for its management is insufficient. The objective of this thesis was to provide knowledge about its seasonal abundance, environmental preferences, ecological interactions, and to develop a minimally invasive methodology to study its reproductive endocrinology using skin biopsies and LC-MS/MS. In the ecological aspect, an abundance of 78 sharks was estimated (95% CI; 62.1, 105.6 individuals) from the application of the Schnabel method and 6,316 records (2012-2014). Additionally, a sexual, spatial, and temporal segregation was evidenced according to each of the following categories, including immature males, mature males, immature females, and mature females. This segregation was detected by comparing the probability of occurrence of each category through generalized additive models (6,266 presence/absence records), in relation to spatial (latitude, longitude), temporal (time of day) and environmental (surface temperature of the sea, visibility, tide, moon phase, cloud cover) factors. Evidence of trophic interactions with squid was obtained by a photo-identification process that allowed the detection of suction cup scars on the body of the sharks ($\bar{x} = 3.7$ m, $SD \pm 0.6$ total length: $n = 14$). Digital scar measurement suggests *Dosidicus gigas*, *Architeuthis dux*, and *Ommastrephes bartramii* as potential prey for white sharks in the area. Finally, the method developed to study reproductive endocrinology made it possible to extract, detect and quantify nine hormones simultaneously from skin biopsies (50 mg). This method will allow the analysis of hormonal profiles of protected species in order to detect periods of sexual maturation, mating, gestation and postpartum with similar efficiencies to other methods, but optimizing the use of biopsies by using 95-98% less tissue and measuring more hormones than 93% of the studies published until 2020.

Keywords: Chondrichthyes, minimally invasive methods, vulnerable species, marine conservation, hormones.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de tiburón blanco *Carcharodon carcharias* (Linnaeus 1758) son un recurso valioso en términos ecológicos y socioeconómicos (Cisneros-Montemayor et al. 2020). Esta especie es un depredador tope en ecosistemas costeros y pelágicos de las regiones templadas y subtropicales de todo el mundo. La presencia del tiburón blanco ha sido registrada en amplios rangos de temperatura (2.7-26.6°C) y profundidad (1-1200 m; Francis et al. 2012, Froese y Pauly 2022). Esta especie es fácilmente identificada por sus características anatómicas, tales como dientes triangulares y aserrados; morro, ojos, y hendiduras branquiales grandes; así como por la capacidad de superar los 6 m de longitud total (LT; Compagno et al. 2005; Castro 2012;). Su alimentación está basada en el consumo de peces, cefalópodos y mamíferos marinos, aunque los componentes de su dieta varían de acuerdo con la localidad, sexo y estadio de madurez (Compagno et al. 2005; Kim et al. 2012). El consumo de pinnípedos y otras presas gregarias motiva las agregaciones estacionales de *C. carcharias*, ya que la disponibilidad de alimento constituye un factor relevante en la fidelidad al sitio exhibida por las poblaciones de tiburón blanco (Pyle et al. 1996, Compagno et al. 2005; Hoyos-Padilla et al. 2016; Santana-Morales et al. 2021).

El tiburón blanco es uno de los vertebrados marinos con la mayor capacidad de dispersión. Puede realizar movimientos migratorios que superan los 11,000 km en un periodo aproximado de tres meses (Bonfil et al. 2005, 2015). Este tipo de movimientos se han relacionado con eventos alimenticios y/o reproductivos, aunque la información sobre su demografía aún resulta insuficiente para el manejo óptimo de sus poblaciones a nivel mundial (Boustany et al. 2002, Carlisle et al. 2012, Cisneros-Montemayor et al. 2020). Una evidencia de esto es la falta de evaluaciones regionales sobre los estados poblacionales de la especie (IUCN, 2022), lo cual, se relaciona con la escasez de estudios ecológicos, demográficos y reproductivos de las diferentes poblaciones (Huveneers et al. 2018).

Debido a que es capaz de superar los 76 años de vida (Natanson & Skomal, 2015), el tiburón blanco puede considerarse como una especie longeva en

comparación con la esperanza de vida humana reciente¹ (70-73 años; UNFPA, 2022), o de cualquiera de sus presas². Los tiburones machos alcanzan su madurez sexual a los 26 años (3.5 m), mientras que las hembras maduran a los 33 (> 4.5 m; Natanson & Skomal, 2015). Al igual que otros lamniformes, el tiburón blanco presenta un modo de nutrición embrionaria conocido como *oofagia* u *ovofagia* (Wourms, 1977), así como una fecundidad de 2-15 crías y un periodo de gestación, que – hipotéticamente –, tiene una duración de 12-18 meses (Francis 1996, Compagno et al. 2005, Saidi et al. 2005, Domeier et al. 2012).

En regiones del Pacífico Nororiental (Norteamérica) y Suroriental (Oceanía), se ha estimado una abundancia de 2,000 y 2,500-6,750 tiburones, respectivamente (Burgess et al. 2014, Hillary et al. 2018). En localidades menos extensas, tales como Gansbaai, Sudáfrica, e Isla Guadalupe, México, las estimaciones rondan los 333 y los 120 individuos incluyendo adultos y subadultos (Sosa-Nishizaki et al. 2012; Andreotti et al. 2016). Este tipo de estimaciones utilizan métodos de marcaje/recaptura que, dependiendo la naturaleza de su muestra, pueden generar resultados variables entre estudios (Sosa-Nishizaki et al. 2012; Burgess et al. 2014). Naturalmente, la generación de conocimiento actualizado y la optimización de métodos resulta fundamental para el monitoreo de *C. carcharias* y otras especies más susceptibles a la extinción, en donde el conocimiento de su estado poblacional es clave (DOF 2006, 2010; Gallagher et al. 2012).

Desde el año 2001, las autoridades mexicanas consideraron al tiburón blanco como una especie amenazada y protegida bajo los criterios de la NOM-029-PESC-2006 y el Apéndice II de la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (DOF 2006, CITES 2022). Su protección en el país limita el aprovechamiento a las actividades sostenibles, por lo que el turismo y la investigación científica constituyen oportunidades clave para un aprovechamiento óptimo en áreas naturales relevantes para México, como la Reserva de la Biósfera Isla

¹ Promedio mundial humano en el S. XIX (28-32 años)

² Ejemplos de edad máxima reportada para elefante marino del Norte *Mirounga angustirostris* (13-19 años; Lobo fino de Guadalupe *Arctophoca philippii townsendii* (13-23 años); Foca gris *Halichoerus grypus* (25-35 años; NOAA, 2022)

Guadalupe, Baja California (DOF, 2005, 2006). En esta reserva, el avistamiento del tiburón blanco comenzó en el año 2001 con una sola embarcación (Becerril-García 2017). Actualmente hay 10 embarcaciones activas que generan más de 10 millones de pesos por temporada³, aunque la evaluación de la derrama económica no ha sido abordada profundamente (Becerril-García 2017, Cisneros-Montemayor et al. 2020).

Las características ecológicas, demográficas, y sociales justifican la relevancia de la especie y explican la susceptibilidad de las poblaciones por la pesca ilegal, malas prácticas turísticas, gestiones de manejo deficientes, contaminación marina, cambio climático, entre otros (Huveneers et al. 2018; Jorgensen et al. 2022). Bajo este contexto, la implementación de metodologías prácticas y replicables resulta esencial para generar conocimiento en temas relevantes como la ecología, demografía y reproducción. Esto permite la actualización de parámetros biológicos en especies protegidas de interés nacional como lo es *C. carcharias*; la cual, es aprovechada por embarcaciones canadienses, norteamericanas, y mexicanas (Meza-Arce et al. 2020).

La presente tesis se elabora a partir de hipótesis relacionadas con la ecología y la endocrinología reproductiva de *C. carcharias*. En primera instancia, se otorga información sobre el número de tiburones en interacción con el turismo en Isla Guadalupe; lo cual, incluye datos relevantes para el manejo eficiente de este depredador poco abundante. El segundo capítulo describe el efecto de factores temporales, espaciales, y ambientales sobre la ocurrencia del tiburón blanco en la reserva. Esto constituye información sobre su irritabilidad en ambientes oceánicos y una línea base de su ocurrencia bajo las condiciones climáticas y antropogénicas del periodo analizado. El tercer capítulo presenta evidencia de interacciones de tiburones blancos con presas mesopelágicas relevantes en términos tanto ecológicos como pesqueros. El último capítulo, describe el proceso para desarrollar un método poco invasivo para analizar la reproducción de esta especie mediante el análisis de hormonas esteroides. Las pruebas iniciales realizadas en elasmobranquios de interés

³ La temporada de tiburón blanco en Isla Guadalupe usualmente comprende el periodo de finales de Julio-Diciembre de cada año.

comercial permitieron extraer, detectar y cuantificar hormonas esteroideas en biopsias de *C. carcharias* y complementar su monitoreo en Isla Guadalupe.

ANTECEDENTES

Contexto socioeconómico

Conservación y normatividad

A nivel global y de acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza - *IUCN por sus siglas en Inglés* - el tiburón blanco se encuentra catalogado como una especie vulnerable a la extinción (Rigby et al. 2022). En lugares donde existe una evaluación regional, como Europa y el Mediterráneo, a esta especie se le considera en peligro crítico (Soldo et al. 2016). En 2021, la UICN implementó un nuevo indicador para evaluar avances y perspectivas de la recuperación de especies amenazadas. Esta categoría de recuperación se conoce como la “evaluación del estado verde” - *Green Status of Species en Inglés* – y constituye un primer esfuerzo para estandarizar y medir las acciones de conservación en la recuperación de estas especies (Akçakaya et al. 2018).

El tiburón blanco *C. carcharias* fue una de las ocho especies de tiburones evaluadas bajo el nuevo criterio de recuperación, en complemento de las categorías de la lista roja (Spaet 2021). La especie *C. carcharias* se consideró como un taxón “moderadamente agotado”, con un puntaje de 56% de recuperación. Este valor considera avances realizados, así como las acciones de manejo necesarias para mejorar la recuperación del tiburón blanco en las próximas décadas (Spaet 2021). Este puntaje demuestra que las decisiones tomadas por los sectores involucrados han rendido frutos en la conservación de *C. carcharias* en un contexto global. Fortalecer el avance de recuperación incrementa las posibilidades de que las poblaciones de especies clave, como el tiburón blanco, lleven a cabo sus funciones ecológicas de una manera viable y dentro de su rango esperado de distribución (Akçakaya et al. 2018, Spaet 2021).

En 1990, los Estados Unidos de América prohibieron la retención de tiburones blancos e implementaron protección a los mamíferos marinos presas de *C. carcharias*. Adicionalmente, en las costas de California, Oregon, y Washington, se prohibió la pesca comercial de tiburones blancos de acuerdo con el *Highly Migratory Species Fishery Management Plan*, a menos que se especifiquen usos relacionados con investigación científica (Pacific Fishery Management Council, 2007). Favorecer la salud de las poblaciones presa del tiburón blanco y motivar su investigación científica a partir de capturas incidentales, han favorecido la recuperación del tiburón blanco en el Pacífico Oriental (Burgess et al. 2014, Santana-Morales et al. 2021). Esto destaca la relevancia de implementar acciones de manejo con una perspectiva ecosistémica; ya que, como depredadores, la salud de las poblaciones de los tiburones depende de la salud de sus presas, lo que implica desafíos de conservación a nivel de red trófica (Tinker et al. 2016).

En México, el tiburón blanco se encuentra listado en dos normas oficiales mexicanas: la NOM-029-PESC-2006 y la NOM-059-SEMARNAT-2010. Brevemente, la primera de ellas constituye una prohibición de captura y retención; mientras que la segunda lo reconoce como una especie amenazada en ambos litorales del país (DOF 2006, 2010). A partir del año 2014, se le considera como una de las especies prioritaria y se decreta una veda permanente que fortalece la liberación de especímenes ante capturas incidentales, prohibiendo estrictamente su captura (DOF 2014). En el ámbito internacional y como miembro de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestres (CITES), México participa en las acciones internacionales que protegen al tiburón blanco y a otras especies listadas bajo el Apéndice II de dicha convención (INAPESCA, 2021).

En años recientes, el programa de acción para la conservación (PACE) tiene como meta la implementación de un sistema integral de monitoreo en las zonas de distribución de *C. carcharias*. Las líneas de investigación de dicho monitoreo contemplan el entendimiento de la biogeografía, demografía, ecología, efecto del cambio climático, y vulnerabilidad del tiburón blanco ante impactos antropogénicos. Adicionalmente, se plantea el fortalecimiento de dicho monitoreo con métodos que

permitan la generación de conocimiento en estas disciplinas de investigación (SEMARNAT 2020). En este contexto, los avances en el conocimiento de esta especie y sus interacciones ecológicas, resulta una prioridad de manejo para asegurar la salud y funcionamiento de los ecosistemas marinos mexicanos (DOF 2010, 2014).

Las estrategias de conservación planteadas en el PACE (SEMARNAT 2020) incluyen componentes relacionados con la protección del hábitat a partir de una evaluación de los factores ambientales en las localidades donde se distribuye *C. carcharias*. En su componente sobre prevención de impactos, se recomienda actualizar el monitoreo de esta especie para la detección de impactos negativos, por lo que el desarrollo de nuevas tecnologías resulta clave en términos de evaluación de salud y estrés animal (Fig. 1). Con respecto al manejo de poblaciones y la investigación, se menciona la importancia de los estudios sobre abundancia, estructura poblacional, y ecología trófica para respaldar medidas de manejo. Los capítulos de esta tesis se desarrollaron bajo estos componentes con el fin de aportar conocimiento para fortalecer estos objetivos de las autoridades mexicanas.



Figura 1. Tiburón blanco *C. carcharias* capturando una cabeza de atún proporcionada por el ecoturismo en Isla Guadalupe, México.

Aprovechamiento

Los sitios con alta abundancia de elasmobranquios - como *Isla Guadalupe* - constituyen un recurso valioso nacional por su relevancia en el mercado turístico global de tiburones (Gallagher y Hammerschlag 2011, Clua et al. 2011, Vianna et al. 2010, 2012). Estas actividades turísticas involucran más de 10,000 empleos directos y la generación de más de seis mil millones de pesos anuales (\$310 millones USD; 2022). Debido a su creciente popularidad y demanda, se espera que dichos números incrementen significativamente para el año 2030 (Cisneros-Montemayor et al. 2013, Brunnschweiler y Ward-Paige, 2014).

En el caso del buceo en jaula, los cinco países que han logrado establecer actividades económicas relacionadas con el avistamiento de tiburón blanco son Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos de América y México. De dichos países, México es el único que cuenta con una industria turística regulada para realizar

avistamiento y monitoreo del tiburón blanco en un sitio de carácter oceánico como lo Isla Guadalupe, en el estado fronterizo de Baja California (SEMARNAT 2015; Fig. 2).



Figura 2. Buceo en jaula superficial para el avistamiento del tiburón blanco *C. carcharias* en Isla Guadalupe, México.

En la actualidad, no hay estudios socioeconómicos publicados sobre la derrama económica de la actividad de buceo en jaula en Isla Guadalupe (Meza-Arce et al. 2020). Sin embargo, se estima que cada temporada genera más de 100 millones de pesos por el pago del servicio turístico (Becerril-García, 2015; Santana-Morales *com.pers.*).

En México, el avistamiento del tiburón blanco se realiza mediante el buceo en jaula desde principios del siglo XXI (Becerril-García 2015, SEMARNAT 2015). La temporada de avistamiento inicia a mediados de julio y termina a principios de diciembre. Los barcos que realizan estos viajes son del tipo "vida a bordo" - *liveaboard* en Inglés - que usualmente superan los 30 pies de largo (Fig. 3). Los viajes/tours tienen una duración promedio de cinco días: tres para buceo, y dos para el desplazamiento entre el continente e Isla Guadalupe.



Figura 3. Embarcación estadounidenses durante la actividad de avistamiento de *C. carcharias* en Isla Guadalupe, México.

El avistamiento de tiburón blanco mediante buceo en jaula utiliza un sistema de tipo *hooka* para proporcionar aire a los buzos desde la superficie. Las jaulas son de acero inoxidable y varían en su diseño y tamaño de acuerdo con cada operador de servicios turísticos. Con el fin de evitar laceraciones a los tiburones, se recomienda que las jaulas carezcan de bordes cortantes y que las barras horizontales tengan una separación máxima de 35 cm (SEMARNAT 2015).

Las jaulas de avistamiento son transportadas por cada embarcación hacia el sitio de anclaje, colocadas en posición cada mañana de los días de avistamiento, y retiradas del agua al atardecer (SEMARNAT 2015). Según la compañía, los barcos cuentan con un mínimo de dos, y un máximo de cuatro jaulas disponibles. La capacidad promedio de cada jaula es de cuatro buzos. Con excepción de las compañías estadounidenses, todas las demás embarcaciones cuentan con la opción adicional de realizar buceos en jaula a una profundidad de 10 metros (Fig. 4). Los turistas que decidan utilizar las jaulas de superficie no requieren certificación de buceo

para realizar la actividad. No obstante, y con fines de seguridad, se requiere ser buzo certificado para acceder a las opciones de buceo en profundidad.



Figura 4. Avistamiento de tiburón blanco *C. carcharias* dentro de una jaula de buceo a 10 m de profundidad en Isla Guadalupe, México.

Hasta el año 2021, un total de diez embarcaciones contaban con los permisos para realizar turismo con tiburón blanco en Isla Guadalupe. Las compañías evitan coincidir durante los mismos días en la isla, para evitar que siete embarcaciones realicen el avistamiento de manera simultánea. No obstante, la capacidad de carga óptima para esta actividad es de seis embarcaciones (Santana-Morales et al. 2021).

En este tipo de avistamiento, se requiere del uso de atrayentes orgánicos para atraer y observar a los tiburones blancos. Estos atrayentes varían según la compañía, pero en general, incluyen restos de peces de la región como túnidos (*Thunnus spp*), jureles de Castilla (*S. lalandi*), sardinas (*Sardinops spp*), y macarelas (*Scomber spp*). Estos atrayentes han sido señalados como un posible estresor de los tiburones blancos (Guerrero-Ávila 2011, Becerril-García et al. 2019c). No obstante, los estudios etológicos del tiburón blanco durante su interacción con la actividad turística han

proporcionado evidencia de que no existen alteraciones en el comportamiento de *C. carcharias* a largo plazo (Becerril-García et al. 2020d).

La hipótesis de un condicionamiento del tiburón blanco por el turismo ha sido rechazada hasta ahora. Sin embargo, estos estudios proporcionaron evidencia de cambios conductuales a corto plazo; los cuales, fueron motivados por tipos específicos de atractivos como el atún fresco y que provocó conductas agresivas hacia las jaulas de observación (Becerril-García et al. 2020d). La resolución de las problemáticas del ecoturismo compete a los distintos actores involucrados con el aprovechamiento de los recursos naturales en Isla Guadalupe, tales como el gobierno, pescadores artesanales, operadores turísticos, academia y organizaciones no gubernamentales (Meza-Arce et al. 2020).

Contexto ecológico

Características generales

El tiburón blanco es un condictio marino perteneciente a la familia Lamnidae. Los fósiles del género *Carcharodon* datan de principios del Plioceno, aproximadamente de cinco millones de años atrás (, Ehret et al. 2009, Nelson et al. 2016). El tiburón blanco caracteriza por un morro, ojos, boca, y hendiduras branquiales de gran tamaño; dientes triangulares y aserrados capaces de superar los 10 cm de alto; un cuerpo robusto y fusiforme; dos aletas dorsales, siendo la primera significativamente más grande que la segunda; quillas precaudales; pigmentación oscura en la punta ventral de las aletas dorsales, y una aleta caudal heterocerca casi simétrica (Compagno et al. 2005). La piel del tiburón blanco presenta un patrón de “*contracoloración*”, la parte dorsal es de tonos grisáceos a café oscuro, mientras que la parte ventral tiene una tonalidad blanca (Compagno et al. 2005; Fig. 5). La talla máxima registrada es de 6 m LT, aunque la longitud infinita calculada estima que pueden superar los 700 cm (Caillet et al. 1985, Castro et al. 2012).



Figura 5. Tiburón blanco *C. carcharias* en Isla Guadalupe, México.

La distribución de *C. carcharias* abarca todos los océanos templados y subtropicales del mundo. Su principal distribución se ubica en las latitudes 20-60° norte y sur, aunque puede incursionar hacia regiones tropicales (Compagno et al. 2005; Fig. 6). Las características bióticas y abióticas del océano, y sobre todo de sus sitios de agregación, permiten la supervivencia de las poblaciones de *C. carcharias* en estas latitudes. Los sitios de agregación del tiburón blanco poseen las condiciones necesarias para la subsistencia de especies presa como pinnípedos (lobos marinos, lobos finos, y elefantes marinos), cetáceos, cefalópodos y peces óseos (Gallo-Reynoso et al., 2005; Walther-Mendoza et al 2013; Huveneers et al. 2018).

La presencia de colonias reproductivas, cardúmenes, y demás agrupaciones de sus presas, son factores relevantes que motivan las agregaciones de tiburón blanco alrededor del mundo. Algunos ejemplos de sitios de agregación son las *Farallon Islands* en Estados Unidos; *Seal Island* en Sudáfrica; *Neptune Islands* en Australia; y *Stewart Island* en Nueva Zelanda. Estos sitios de agregación se encuentran ubicados sobre la plataforma continental; mientras que Isla Guadalupe en México, y la

denominada *Shared Offshore Foraging Area* (SOFA), son los únicos sitios de agregación con características oceánicas al encontrarse fuera de la plataforma continental.

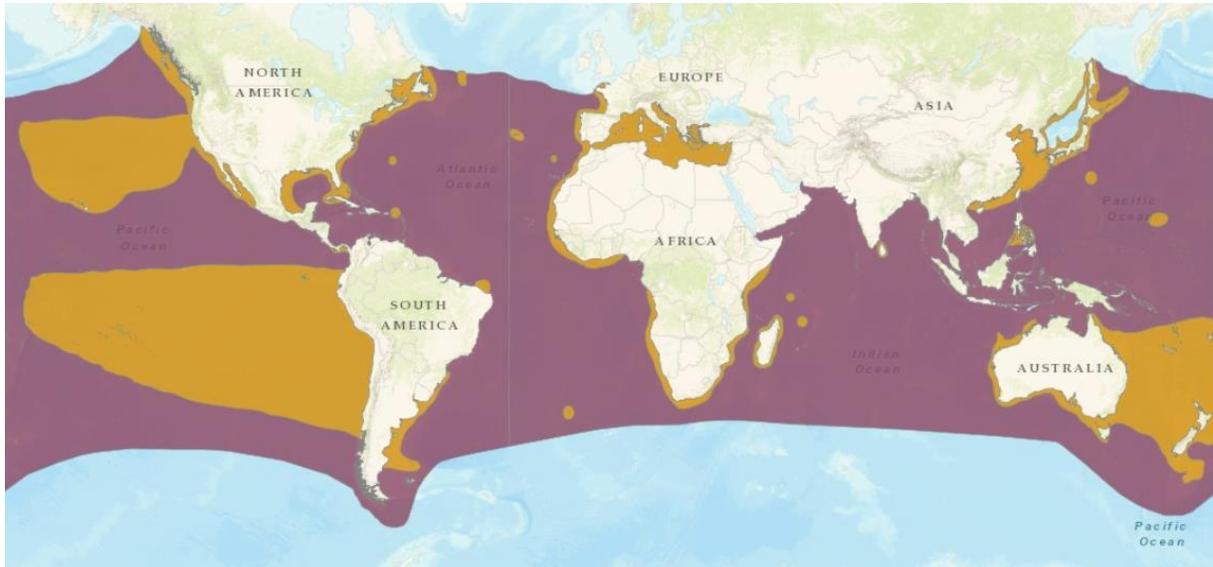


Figura 6. Distribución potencial de *C. carcharias* en color morado, con sus principales regiones de ocurrencia en color amarillo (IUCN, 2022).

Los tiburones blancos son depredadores generalistas que participan en el intercambio de materia y energía de los ecosistemas marinos donde se distribuyen (Compagno et al. 2005, Kim et al. 2012). A su vez, representan una fuerza de selección que actúa directamente sobre las poblaciones de las especies que depreda (Hull 2017).

Así como otras especies de tiburones, los tiburones blancos pueden comportarse como carroñero bajo ciertas condiciones que involucran el consumo de cadáveres de cefalópodos y mamíferos marinos (Long y Jones 1996, Ehret et al. 2009, Kim et al. 2012, Fallows et al. 2013). En fases neonatales y juveniles, los tiburones blancos se caracterizan por el consumo de peces óseos y otros elasmobranquios demersales. En etapas de maduración sexual y fases adultas, su dieta se expande y abarca grupos como cefalópodos, pinnípedos, odontocetos y misticetos (Compagno et al. 2005, Kim et al. 2012, Dines y Gennari, 2020; Fig. 7). Estas presas con alto contenido energético aportan nutrientes vinculados con su crecimiento, supervivencia y reproducción (Pethybridge et al. 2014).

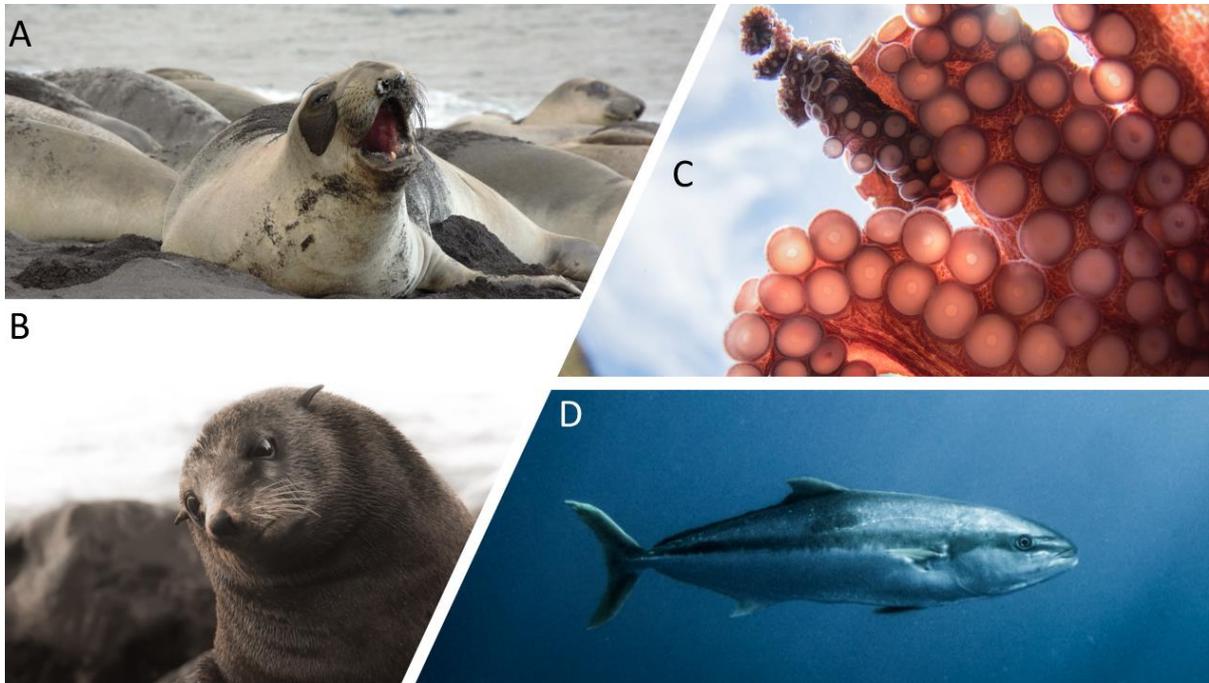


Figura 7. Grupos taxonómicos presentes en las interacciones tróficas del tiburón blanco *C. carcharias*: A) Phocidae; B) Otariidae; C) Cephalopoda ; D) Carangidae.

Ecología espacial en el Pacífico Mexicano

A pesar de que existe registro de *C. carcharias* en diferentes regiones del Golfo de California (Galván-Magaña et al. 2010, Márquez-Farías et al. 2017, Becerril-García et al. 2019), la Reserva de la Biósfera Isla Guadalupe concentra el mayor número de avistamientos de la especie (Domeier y Nasby-Lucas 2007, Hoyos-Padilla et al. 2016). Esto se explica por los patrones migratorios descritos para *C. carcharias* en esta zona del Pacífico; y a que Isla Guadalupe funciona como un sitio de agregación donde las abundancias relativas son altas (Domeier y Nasby-Lucas 2008).

Los estudios de telemetría satelital y acústica han permitido describir el desplazamiento de individuos marcados en California y Baja California (Domeier y Nasby-Lucas 2008, 2013). Los tiburones juveniles se desplazan desde zonas continentales hacia sitios como *Farallon Islands*, el *SOFA*, o Isla Guadalupe. En este último, los tiburones blancos juveniles pueden permanecer durante un periodo de 12-14 meses con fines alimenticios y de maduración sexual (Hoyos-Padilla et al. 2016).

La agregación de tiburones blancos en Isla Guadalupe comienza a inicios del verano y finaliza hasta inicios de primavera (Domeier y Nasby-Lucas 2007, 2008). Su presencia en la isla se ha relacionado con una evidente fidelidad al sitio, por lo que, para fases maduras, se le considera como una agregación estacional. Los machos maduros arriban a Isla Guadalupe durante julio y agosto; mientras que las hembras maduras se registran a finales de septiembre (Domeier y Nasby-Lucas 2007, 2008). Ambos sexos permanecen hasta febrero en las inmediaciones de la reserva.

Al finalizar su estancia en Isla Guadalupe, los tiburones blancos comienzan su migración hacia el SOFA donde pueden permanecer durante febrero-junio (Domeier y Nasby-Lucas 2008, 2013). En este periodo se ha reportado una segregación sexual entre los tiburones, por lo que las hipótesis que apuntan al SOFA como área de reproducción han sido rechazadas por algunos investigadores (Domeier et al. 2012, Jorgensen et al. 2012). En este ambiente pelágico con más de 300,000 km² de extensión, los tiburones blancos y otros depredadores marinos realizan migraciones verticales (400-500 m), en lo que se ha sugerido como eventos de alimentación (Nasby-Lucas et al. 2009). Después de su estancia en el SOFA, algunos individuos se dirigen hacia las aguas circundantes de Hawái, la costa de Baja California, o el Golfo de California (Domeier et al. 2012). Las diferencias en las rutas individuales de los tiburones marcados se han relacionado con necesidades específicas de su maduración sexual y la fase reproductiva de cada individuo (Kim et al. 2012, Jorgensen et al. 2012, Domeier et al. 2013).

Uso de hábitat en Isla Guadalupe

La agregación de tiburón blanco en Isla Guadalupe ha sido estudiada mediante diversas disciplinas; principalmente aquellas relacionadas con biogeografía y ecología marina. Como lo menciona el Instituto Nacional de Ecología (2005), la presencia del tiburón blanco ha sido registrada de manera directa e indirecta desde mediados del S. XX por investigadores relacionados principalmente con el estudio de pinnípedos (Collier et al. 1996, Gallo-Reynoso et al. 2004). Dichas observaciones proporcionaron evidencia de interacciones tróficas relevantes entre los pinnípedos de la isla y los tiburones blancos (Gallo-Reynoso y Figueroa-Carranza 1999, Gallo-Reynoso et al.

2004), lo que inicialmente permitió sugerir a Isla Guadalupe como sitio de alimentación relevante para *C. carcharias*.

Los primeros estudios dirigidos al entendimiento de esta agregación fueron realizados por el *Pfleger Institute of Environmental Research* en el año 2000, con el fin de describir los movimientos de los tiburones blancos a partir de estudios de telemetría satelital (Domeier y Nasby-Lucas 2008). Sus resultados permitieron conocer que los tiburones permanecían en Isla Guadalupe hasta nueve meses, y que posteriormente se desplazaban hacia zonas oceánicas (Gallo-Reynoso y Blanco-Parra 2005, Domeier y Nasby-Lucas 2008). En el año 2001, el inicio de la actividad turística fortaleció el acceso de los investigadores y del público general, al avistamiento subacuático del tiburón blanco (Becerril-García, 2017). A partir de entonces, los estudios de telemetría satelital y foto identificación fueron clave para entender la estacionalidad, fidelidad al sitio, y migraciones de los tiburones blancos en Isla Guadalupe (Domeier y Nasby-Lucas, 2007, 2008). El conocimiento sobre el uso del hábitat y la relevancia de este sitio de agregación fueron abordados posteriormente por investigadores mexicanos.

En el periodo del 2004-2007, el Instituto Politécnico Nacional, a través del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), comenzó estudios de telemetría acústica para entender los movimientos locales de los tiburones blancos en Isla Guadalupe. A diferencia de la telemetría satelital, la implementación de una red de telemetría acústica permitió describir el uso del hábitat que los tiburones blancos presentan durante su estancia en la isla. Dentro de las principales conclusiones, se destacó la permanencia de tiburones blancos juveniles hasta por 14 meses; las diferencias en el uso de hábitat entre adultos y juveniles; la confirmación de depredación hacia pinnípedos y otras presas potenciales; así como un primer listado de comportamientos sociales entre los tiburones blancos y su interacción con otras especies (Hoyos-Padilla, 2009, 2013, 2016, Walther-Mendoza et al. 2014). En el caso del uso de hábitat, los tiburones adultos evidenciaron una preferencia hacia aguas profundas cercanas a las colonias de pinnípedos, mientras que los juveniles se ubicaron en zonas someras cercanas a la costa (Hoyos-Padilla et al. 2016). El

entendimiento de esta segregación por talla planteó las bases para fortalecer el monitoreo gubernamental de esta especie.

En Isla Guadalupe, las interacciones tróficas de *C. carcharias* han sido abordadas mediante técnicas bioquímicas y fotográficas, las cuales, han incluido análisis de isótopos estables (Jaime-Rivera et al. 2014, Le Crozier et al. 2020), ácidos grasos (Alderete-Macal et al. 2020), y foto identificación (Hoyos-Padilla et al. 2013). A pesar de los diversos enfoques, estas investigaciones coinciden en la relevancia ecológica de la zona mesopelágica para la subsistencia del tiburón blanco en el Pacífico Mexicano. No obstante, los estudios realizados no proporcionan información ecológica básica referente al efecto de factores espaciales, ambientales y temporales sobre la agregación de tiburones blancos en esta isla.

Las interacciones tróficas mencionadas en estos estudios respaldan que la zona mesopelágica - *ubicada entre los 200 y 1000 m de profundidad*- proporciona condiciones necesarias para cubrir los requerimientos energéticos de juveniles y adultos de *C. carcharias*, así como de sus presas principales (Hoyos-Padilla et al. 2013, Jaime-Rivera et al. 2014, Alderete-Macal et al. 2020, Le Crozier et al. 2020). Según estos estudios y trabajos como el de Gallo-Reynoso et al. (2005), en Isla Guadalupe las presas del tiburón blanco incluyen a pinnípedos (*Arctophoca philippii townsendi*), cetáceos (*Tursiops truncatus*, *Ziphius cavirostris*), elasmobranquios (*Prionace glauca*, *Myliobatis californica*), peces óseos (*Seriola lalandi*, *Thunnus albacares*, *Thunnus orientalis*), y al calamar de Humboldt *Dosidicus gigas*.

Contexto reproductivo

Los tiburones blancos son peces vivíparos aplacentarios que alcanzan la madurez en periodos distintos dependiendo de su sexo, genética, salud, etc. (Compagno et al. 2005). En general, se considera que los tiburones blancos maduran sexualmente al superar 3.5-3.8 m de LT (\approx 26 años) en machos, y 4.5-5.0 m LT en hembras (\approx 33 años; Bruce 1992, Pratt 1996, Natanson y Skomal 2015).

Estudios basados en observaciones realizadas en Australia, han clasificado las etapas del ciclo de vida de *C. carcharias* según su sexo y talla (Bruce y Bradford, 2012).

Esta clasificación detallada permite categorizar a los tiburones como: neonatos (< 1.75 m LT); juveniles (> 1.76-3.0 m LT); subadultos (machos 3.1-3.6 m LT; 3-4.8 m LT hembras); y adultos (> 3.6 m LT; > 4.8 m LT hembras). Este sistema reconoce el supuesto de que la maduración sexual se refleja en tallas similares para las diferentes poblaciones de tiburón blanco. En el monitoreo científico de tiburones, el uso de una u otra clasificación - así como la consideración de los supuestos- dependerá de los objetivos del estudio, las preguntas científicas a responder, y de la propia calidad de los datos para cada categoría.

Como sucede en otras especies de tiburones, existe una segregación sexual durante el desarrollo ontogénico de *C. carcharias* (Klimley 1987, Robbins 2007, Domeier y Nasby-Lucas 2012, Kock et al. 2013). En estas etapas, la maduración sexual de machos y hembras comienza en el hipotálamo con la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) para continuar su camino dentro del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Idler, 2012; Awruch, 2013). De esta forma, la GnRH tiene efecto en la hipófisis y provoca la secreción tanto de la hormona luteinizante (LH), como de la hormona folículo estimulante (FSH). Ambas son transportadas por el sistema circulatorio hacia las gónadas, donde comienza la maduración de los gametos y el proceso de esteroidogénesis (Callard *et al.* 1989). Debido a que este patrón se ha observado en la mayoría de los vertebrados, se piensa que este mismo mecanismo es el responsable de la maduración sexual en tiburones y rayas.

Algunos estudios recientes sugieren que la hormona Kiss 1 y su receptor GPR54 están relacionados con la secreción de GnRH por efecto de señales ambientales y metabólicas en especies tanto marinas como terrestres (Tena-Sempere 2006, Nakajo et al. 2017). De esta manera, los diferentes periodos de exposición a ciertas temperaturas y luz solar resultan relevantes para la regulación e inicio de fenómenos fisiológicos en vertebrados. No obstante, los resultados cambian según el grupo taxonómico. Debido a la escasez de estudios, aún resulta difícil definir un patrón específico para las rutas hormonas en las diferentes especies de elasmobranquios (Becerril-García et al. 2020a).

De manera general se ha observado que algunas hormonas como la progesterona (P4), testosterona (T), 11-ketotestosterona (11-KT), y corticosterona (CORT) tienen un efecto anabólico en machos de tiburones y rayas. Esto motiva el desarrollo de testículos, ductos reproductivos, glándulas seminales y gonopterigios (Rassmusen y Gruber 1993; Manire et al. 1999, Sulikowski et al. 2005, Manire et al. 2007, Lyons y Wynne-Edwards 2019; Fig. 8). En las hembras, la regulación de la energía y el estrés generado por el crecimiento, se relaciona con la secreción de la 11-deoxicorticosterona (DOC), 11-dihidrocorticosterona (11-DHC), y CORT; mientras que el estradiol (E2) es la principal hormona vinculada con la síntesis de vitelogenina y otros cambios relevantes durante la gestión (Di Prisco et al. 1967, Prisco et al. 2008, Pelletier 2010, Lyons y Wynne-Edwards 2019, Gelsleichter y Evans, 2012). En algunas especies, el desarrollo de las glándulas oviductales está vinculado con la hormona 11-KT. Dichas esteroides en conjunto con múltiples reacciones, regulan la fisiología de machos y hembras durante sus etapas de crecimiento y segregación sexual (Koob et al. 1986, Heupel et al. 1999; Manire et al. 1999, Tricas et al. 2000, Henningsen et al. 2008; Fig. 9).

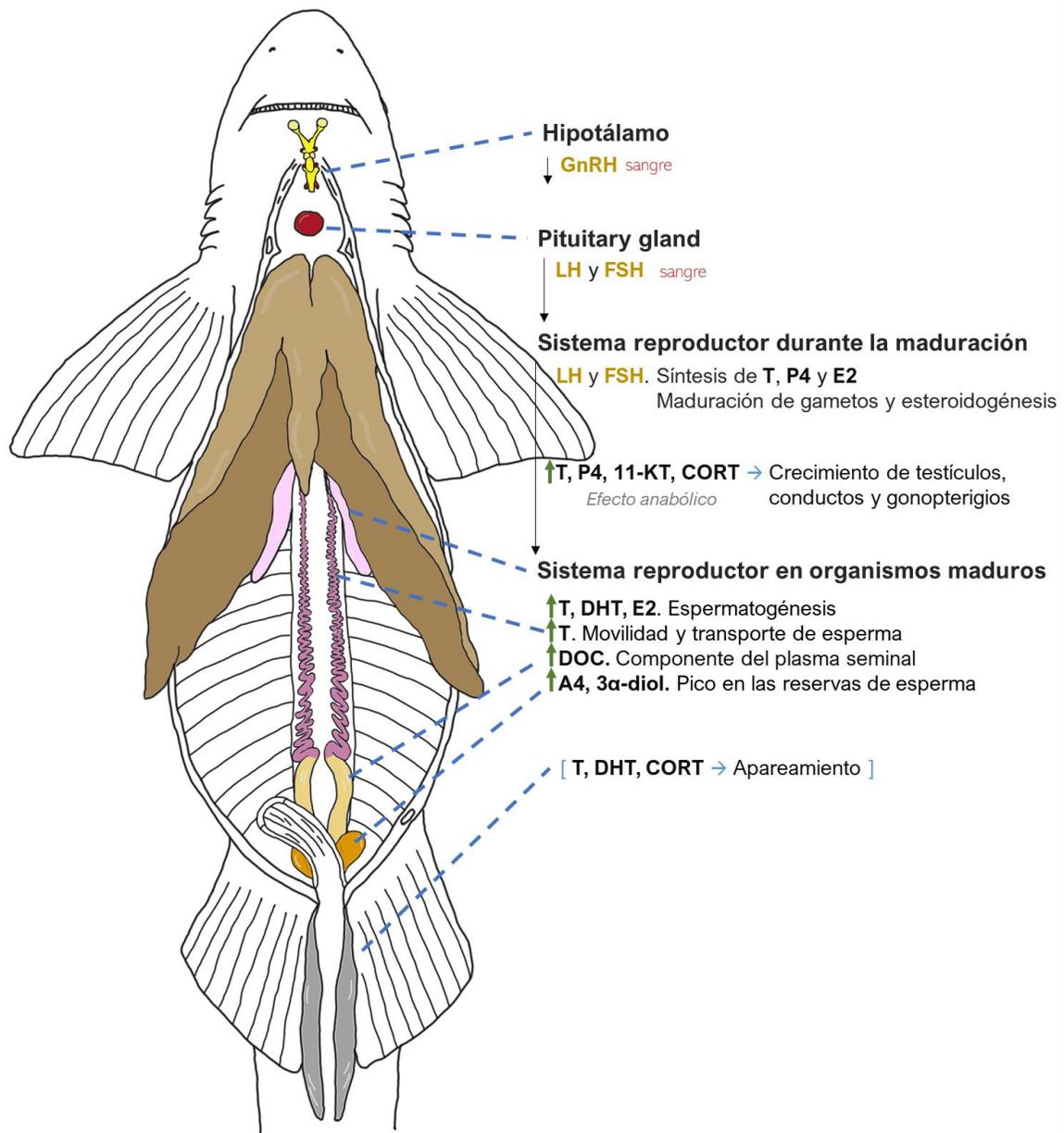


Figura 8. Modelo general de la endocrinología de condriictios machos en términos de hormonas esteroides y biología reproductiva. Abreviaturas: GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del folículo; E2, 17β-estradiol; T, testosterona; P4, progesterona; DHT, 5α-dihidrotestosterona; 11-KT, 11 cetotestosterona; CORT, corticosterona; A4, androstenediona; DOC, 11 desoxicorticosterona; 3α-diol, 5α-androstano-3α, 17β-diol.

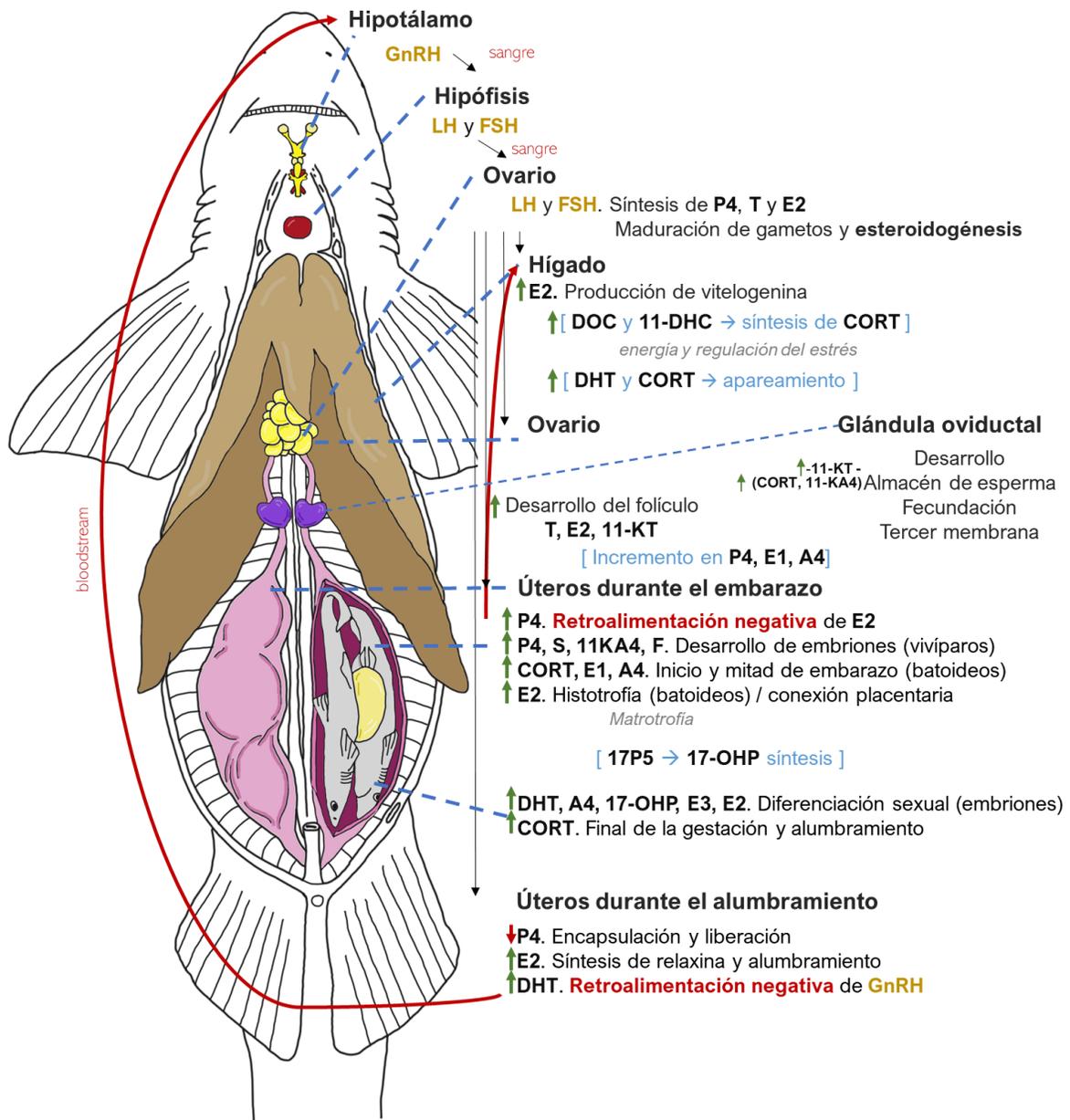


Figura 9. Modelo general de la endocrinología de condriictios hembra en términos de hormonas esteroides y biología reproductiva. Abreviaturas: GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del folículo; E2, 17β-estr estradiol; T, testosterona; progesterona (P4); DHT, 5α-dihidrotestosterona; 11-KT, 11 cetotestosterona; CORT, corticosterona; A4, androstenediona; 17-OHP, 17-hidroxiprogesterona; E1, estrona; E3, estriol; E, cortisona; F, cortisol; S, 11-desoxicortisol; DHP, dihidroprogesterona; DOC, 11 desoxicorticosterona; 11KA4, 11-cetoandrostenediona; 3α-diol, 5α androstano-3α, 17β-diol; 17P5, 17 hidroxipregnenolona; 11-DHC, 11-desihidrocorticosterona.

Una vez que se generan estas señales hormonales en los tiburones adultos y subadultos, se piensa que las agregaciones estacionales, predecibles, y sincrónicas pueden estar motivadas por sus necesidades reproductivas, lo que permite sus temporadas de apareamiento (Hamlett 2005). Durante las fases previas al apareamiento, la esteroidogénesis de T, dihidrotestosterona (DHT), DOC, A4 (androstenediona) y 3 α -diol (5 α -androstane-3 α ,17 β -diol) juegan un papel clave en la espermatogénesis, movilidad y transportación de gametos, secreción de líquido seminal, y almacenamiento de reservas espermáticas (Rassmusen y Gruber 1993, Manire et al. 1995, Garnier et al 1999, Sulikowski et al. 2004, 2005, Manire et al. 2007, Mull et al. 2010). En las hembras, un incremento de P4, estrona (E1), y A4, junto con CORT y 11-keto-androstenediona (11KA4) permite la regulación de energía necesaria para el proceso de apareamiento y recepción de gametos masculinos previo a la fecundación del ovocito en la glándula oviductal (Di Prisco, Vellano y Chieffi 1967; Koob et al. 1986; Sulikowski et al. 2004, Sheldon et al. 2018). De acuerdo con este patrón general y a partir de la evidencia, el incremento en la P4 actúa como inhibidor del E2, lo que resulta en la reducción en la síntesis de vitelogenina y posiblemente la finalización de procesos embrionarios en algunas especies de tiburones y rayas (Tsang y Callard 1987, Tricas et al. 2000, Prisco et al. 2008, Mull et al. 2010).

En tiburones lamniformes (orden taxonómico al que pertenece *C. carcharias*), se ha observado que los comportamientos previos a la cópula y durante el apareamiento que involucran interacciones de múltiples machos interesados en una hembra receptiva (Carrier et al. 2004, Hamlett 2005). Bajo el espectro de las segregaciones sexuales y las agregaciones reproductivas, el apareamiento de los tiburones es antecedido por un cortejo violento que define una selección tanto sexual como natural (Gordon 1993, Parsons et al. 2008, Pratt y Carrier 2001, Kajijura et al. 2000). El cortejo incluye conductas agresivas entre machos y hacia las hembras, así como de las hembras en respuesta ante mordidas de los machos (Carrier et al. 1994, Pratt et al. 2001). Estas conductas se basan en la estimulación de hembras receptivas a partir de múltiples mordidas provocadas por los machos; las cuales, son indicadores de actividad copulatoria en estudios con individuos capturados o foto-identificados (Kajijura et al. 2000, Ritter y Amin 2019). Se ha sugerido que hormonas como la DHT

y CORT motivan la receptividad sexual en hembras; mientras que el conjunto de ambas hormonas con la T4 motiva conductas de apareamiento en los machos (Rasmussen y Gruber 1993, Manire *et al.* 1995, Garnier *et al.* ,1999 Manire *et al.* 2007, Mull *et al.* 2010). Debido a su rareza, estas conductas no han sido observadas en la mayoría de las especies de tiburones, sin embargo, se piensa que existe un patrón similar debido a las similitudes corporales y reproductivas (Compagno *et al.* 2005).

Al finalizar el apareamiento, la ovulación puede suceder en un periodo tan largo como 90 días, debido a que los espermatozoides del macho pueden sobrevivir este periodo dentro de las hembras (Hamlett 2005). Algunos estudios en condiciones controladas han observado que los gametos masculinos pueden activarse después de dicho periodo, al exponerse a temperaturas ligeramente más cálidas de aproximadamente 5 °C (Hamlett 2005). Esto coincide con algunas inferencias propuestas por investigadores australianos que analizaron la segregación sexual de hembras maduras potencialmente embarazadas hacia aguas más cálidas (Robbins 2007). Estos movimientos podrían estar vinculados con estímulos ambientales y condiciones favorables para el metabolismo de hembras embarazadas durante el desarrollo de sus embriones, sobre todo si se consideran hallazgos recientes como el papel de la Kiss1 (Tena-Sempere 2006, Nakajo *et al.* 2017). La fecundidad del tiburón blanco se ha estimado en un rango de 2-15 embriones por camada (Compagno *et al.* 2005), aunque la información disponible es altamente limitada y comprende pocos estudios realizados en hembras preñadas capturadas de manera incidental (Francis, 1996; Uchida *et al.* 1996, Sato *et al.* 2016).

La gestación del tiburón blanco continúa con la implantación de los embriones en los dos úteros de la hembra embarazada (Francis 1996, Uchida *et al.* 1996, Sato *et al.* 2016). Inicialmente, los embriones se encuentran encapsulados y se alimentan mediante el consumo de vitelo o lecitotrofia, mientras que el útero secreta nutrientes lipídicos parecidos a la trofonemata -también conocida como leche uterina- de sus parientes batoideos (Hamlett *et al.* 2005, Sato *et al.* 2016, Tomita *et al.* 2022). En lamniformes como *C. taurus*, el periodo de lecitotrofia tiene una duración de 50 días, mientras que la alimentación de los nutrientes lipídicos sucede en el periodo de los 51-

100 días (Hamlett 2005). Después de este periodo, la nutrición de los embriones de tiburón blanco se complementa al proporcionar ovocitos no fecundados como alimento dentro de los úteros (Hamlett 2011). Esta estrategia llamada “oofagia”, permite completar el desarrollo de los embriones en un periodo de gestación de al menos 18 meses (Hamlett 2011, Domeier et al. 2012). En el Pacífico Nororiental, se ha reportado que las crías nacen durante el periodo de mayo-agosto en zonas costeras de California y Baja California (Domeier et al. 2012). Los juveniles permanecen hasta alcanzar fases juveniles (>2.5 m LT). La talla mínima de nacimiento reportada a la fecha es de 1.06 m LT, perteneciente a un ejemplar capturado incidentalmente cerca de las costas de Tijuana, Baja California, México (Santana-Morales et al. 2020).

Investigación sobre la reproducción del tiburón blanco en Isla Guadalupe

Los estudios sobre la reproducción del tiburón blanco durante su estancia en Isla Guadalupe han sido explorados únicamente por Sulikowsky et al. (2012). En dicho trabajo preliminar, los autores utilizaron radioinmunoensayos para cuantificar tres hormonas esteroides -*testosterona*, *progesterona* y *estradiol*- en muestras sanguíneas de nueve tiburones adultos. En las hembras (462-495 cm LT), los niveles de estradiol y progesterona presentaron un rango de concentración de 248-1,826 pg/mL y 210-593 pg/mL, respectivamente. En machos, las concentraciones de testosterona presentaron un rango de 2,519-7,484 pg/mL.

El bajo número de muestras obtenidas durante los dos años de muestreo no permitió realizar mayores conclusiones sobre la reproducción de la especie (Sulikowsky et al. 2012). Adicionalmente, este trabajo no presente indicadores de calidad tales como los porcentajes de recuperación de hormonas, ni puntos de comparación entre sexos al no realizar la medición de las mismas hormonas esteroides en machos y hembras (Becerril-García et al. 2020a). No obstante, existieron observaciones valiosas como el registro de espermátóforos en algunos de estos machos, así como la detección de estradiol y progesterona en las hembras durante octubre y noviembre. Estos hallazgos constituyeron un paso importante para sugerir métodos no letales, pero invasivos, para el análisis de la reproducción de tiburones blancos (Sulikowsky et al. 2012).

JUSTIFICACIÓN

En Latinoamérica, la investigación sobre la historia de vida, ecología, e impacto del turismo son prioridades para la conservación de los condricios; especialmente, aquellas especies amenazadas por la extinción (Becerril-García et al. 2022). El tiburón blanco *C. carcharias* es una especie clave en los ecosistemas costeros y pelágicos donde se distribuye, al ser un taxón relevante en la regulación de las poblaciones que depreda dentro de las redes tróficas donde interactúa (Compagno et al. 2005). El tiburón blanco es un depredador tope vulnerable (IUCN, 2022), ya que sus características biológicas favorecen su susceptibilidad a los impactos antropogénicos y climáticos actuales (SEMARNAT, 2020). En México, se le considera una especie amenazada y protegida, por lo que su aprovechamiento está limitado a actividades no extractivas (DOF 2006, 2010). A pesar de ser una especie carismática, su aprovechamiento turístico sólo se realiza en cinco países del mundo (Huveneers et al. 2018). Dentro de estos países, México es el único que cuenta con un sitio de agregación oceánico de tiburones blancos dentro de su zona económica exclusiva, el cual, está ubicado en la Reserva de la Biósfera Isla Guadalupe (DOF 2006b, Cisneros-Montemayor et al. 2020). El buceo en jaula se realiza desde el año 2001 en dicha reserva; sin embargo, existe poca información sobre parámetros clave para la evaluación del estado de su población, así como para su manejo a partir de bases ecológicas y reproductivas (Huveneers et al. 2018). Prueba de ello, es el desconocimiento de sus tendencias poblacionales, ciclo reproductivo, interacciones ecológicas y repuesta al cambio climático, importancia del sitio de agregación, entre otros (Meza-Arce et al. 2020). Adicionalmente, no se han desarrollado métodos poco invasivos para avanzar en el conocimiento reproductivo ni para eficientizar el uso de biopsias. Los estudios reproductivos realizados en la reserva han requerido de técnicas altamente invasivas (Sulikowski et al. 2012), que han sido relacionadas con daños a la salud de los tiburones (Musyl y Gilman 2019, Mohan et al. 2020, Weber et al. 2021). El desarrollo de nuevas metodologías para actualizar parámetros ecológicos, demográficos y reproductivos es necesario, ya que permitirá complementar acciones de manejo y favorecer las direcciones de investigación de esta especie clave en los ecosistemas marinos mexicanos (Huveneers et al. 2018, Rigby et al. 2021).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer la abundancia estacional, preferencias ambientales e interacciones ecológicas; así como desarrollar un método poco invasivo para estudiar la endocrinología reproductiva del tiburón blanco *Carcharodon carcharias* mediante biopsias de piel y LC-MS/MS en Isla Guadalupe, México.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estimar la abundancia de tiburones blancos durante la temporada turística en la Reserva de la Biósfera Isla Guadalupe, México.

Conocer las preferencias espaciales, temporales y ambientales de los tiburones blancos según su madurez sexual durante la temporada turística en Isla Guadalupe, México.

Inferir interacciones ecológicas entre tiburones blancos y presas potenciales a partir del proceso de foto-identificación.

Desarrollar un método poco invasivo para el estudio de la fisiología reproductiva del tiburón blanco a partir del análisis en especies comerciales.

Obtener paneles con perfiles hormonales de > 3 hormonas esteroides en piel de tiburón blanco.

MATERIALES Y MÉTODO

Área de estudio

Isla Guadalupe está ubicada dentro de la Reserva de la Biósfera Isla Guadalupe, a 241 km al oeste de Baja California, en el Pacífico Mexicano (29 ° 00 'N, 118 ° 26' W; Fig. 10). Esta isla volcánica es el núcleo de esta ANP, y presenta una alta diversidad tanto terrestre como marina, incluyendo cetáceos, pinnípedos, elasmobranquios, peces óseos, invertebrados y algas marinas (Gallo-Reynoso *et al.*, 2005). Dentro de estos grupos, destacan especies de importancia comercial como la langosta roja (*Panulirus interruptus*), abulón (*Haliotis spp*), túnidos (*Thunnus spp*) y jureles de Castilla (*S. lalandi*); así como especies amenazadas como los albatros de Laysan *Phoebastria immutabilis* y patas negras *Phoebastria nigripes*, el zifio de cuvier *Ziphius cavirostris*, el elefante marino del norte *Mirounga angustirostris*, el lobo fino de Guadalupe *Arctophoca philippii townsendi*, el caballito de mar *Hyppocampus ingens*, entre otros (Gallo-Reynoso *et al.*, 2005; Walther-Mendoza *et al* 2013; Cárdenas-Hinojosa *et al.* 2015; Becerril-García *et al.* 2018). El tiburón blanco es una de las principales especies de tiburones presentes en la isla, y cumple un rol relevante en el equilibrio ecológico y económico de los sectores que conforman la reserva de la biósfera (Meza-Arce *et al.* 2020).

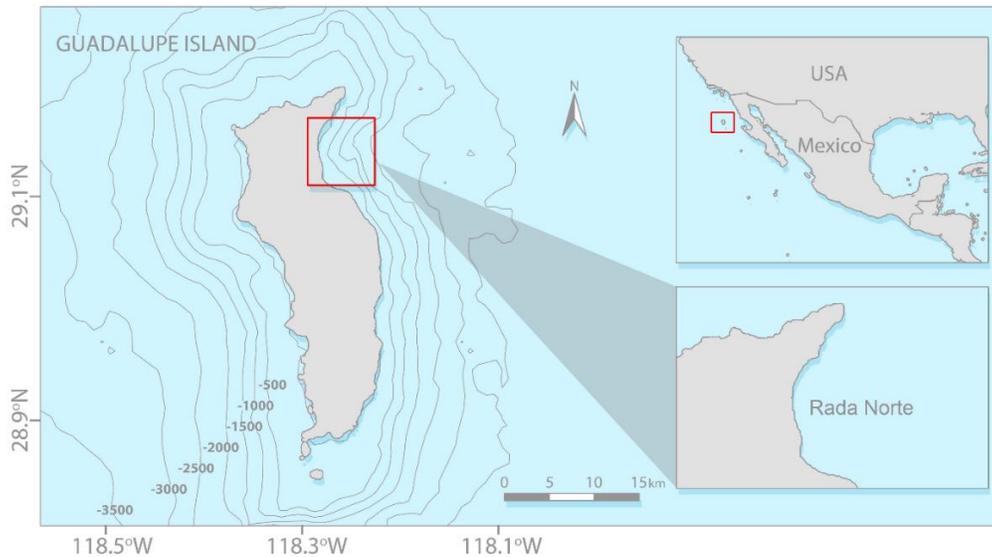


Figura 10. Ubicación y batimetría de Isla Guadalupe, Baja California, México. El recuadro rojo señala la bahía Rada Norte, área de estudio de la presente tesis. Tomada de Becerril-García et al. (2020d).

En esta zona, las condiciones oceanográficas están altamente influenciadas por el sistema de la corriente de California; el cual, genera surgencias locales que aportan agua con temperaturas frías y ricas en nutrientes (Pierson, 1987). La isla tiene una longitud de 35 km de largo y 9.5 km de ancho; presenta una orientación norte-sur y profundidades que superan los 4,000 m (Gallo-Reynoso & Figueroa-Carranza 2005a). El paisaje marino de la isla está dominado por fondos arenosos, arrecifes rocosos, y bosques de algas (Yabur-Pacheco, 2015). El viento del norte es predominante durante todo el año (Strub *et al.*1987). La TSM promedio es de 18 °C, con oscilaciones estacionales entre 16-20 °C y máximos de 25°C (Lynn & Simpson 1987, Gallo-Reynoso & Figueroa-Carranza 2005a). Las mareas son semidiurnas, con amplitud de 3 m. En gran parte de la isla y en las primeras capas superficiales, la visibilidad del agua es de 20-30 m durante casi todo el año (Gallo-Reynoso & Figueroa-Carranza 2005a, Becerril-García *et al.* 2019c).

Consideraciones metodológicas generales

La mayor actividad turística de la temporada de avistamiento de tiburón blanco en Isla Guadalupe sucede durante agosto-noviembre. El presente estudio se realizó a bordo de las seis embarcaciones de buceo que visitaron la Bahía Rada Norte durante las temporadas 2012, 2013 y 2014, en un total de 92 días. Todos los barcos que

participaron en este estudio estaban equipados con dos jaulas de superficie y anclados a 200-250 m de la costa, en una profundidad de 70-80 m.

La presencia o ausencia de tiburones blancos se registró utilizando el número de avistamientos durante un monitoreo constante que, en promedio, duró ocho horas diarias entre las 0700 y las 1700 h. No obstante, el inicio del monitoreo de cada día dependió del cronograma de las embarcaciones y su hora de llegada a la isla. Un avistamiento se definió como la observación de uno o más tiburones blancos detectados en superficie (0-3 m) a una distancia aproximada de 10 m del atrayente.

La LT se estimó mediante la comparación de la longitud de las jaulas con la longitud de cada tiburón al momento de acercarse horizontalmente, en paralelo y cerca de la jaula. El sexo se determinó por la presencia o ausencia de gonopterigios, lo cual, fue confirmado mediante la observación de fotografías submarinas. Los machos con una LT > 3.5 m y las hembras con una LT > 4.5 m se consideraron ejemplares maduros (Compagno *et al.*, 2005). Para mantener el sesgo de las estimaciones, todos los datos fueron obtenidos por el mismo observador.

La foto identificación de los tiburones fue realizada por un solo investigador (EEBG) mediante la detección de patrones de pigmentación, mutilaciones, cicatrices, marcas recientes y antiguas en el cuerpo, así como cualquier otra característica visible en cada tiburón blanco (Domeier & Nasby-Lucas, 2007, 2008; Fig. 11). La decisión de utilizar a un solo observador para el monitoreo e identificación de los tiburones permitió delimitar el sesgo hacia una persona. El marcaje y recaptura de cada tiburón blanco observado se realizó mediante el uso de fotografías submarinas obtenidas por los investigadores y por el material proporcionado por los turistas.

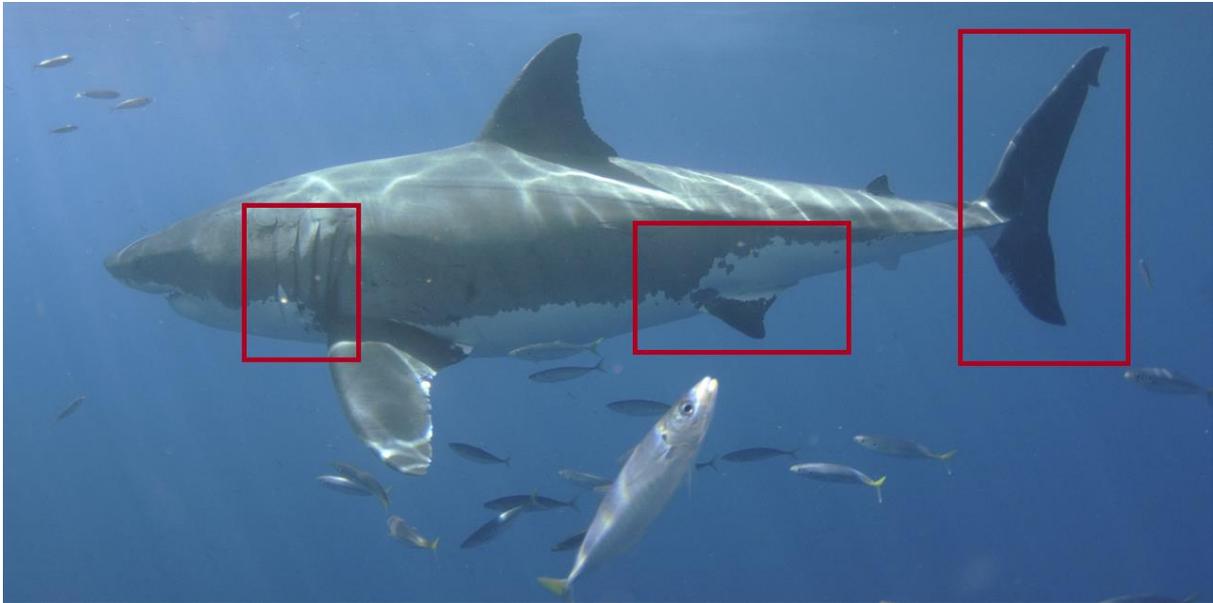


Figura 11. Zonas corporales utilizadas para análisis de patrones de pigmentación durante la foto-identificación de *C. carcharias*.

CAPÍTULO I. ESTIMACIÓN DE ABUNDANCIA DURANTE LA TEMPORADA TURÍSTICA

Resumen

El objetivo del presente capítulo es proporcionar una estimación del número de tiburones blancos *C. carcharias* que interactúan estacionalmente con embarcaciones turísticas en Isla Guadalupe. Para tal fin, se utilizó el método Schnabel de marcaje-recaptura a partir de un total de 6,316 registros de tiburones blancos obtenidos durante 2012-2014. Los resultados de la estimación reflejan una abundancia estacional de 78 tiburones blancos 95% I.C. (62.1, 105.6) durante la temporada turística (agosto-noviembre). En aspectos de manejo, se sugiere que las regulaciones sobre el número de turistas, embarcaciones y el monitoreo de tiburones blancos sean reevaluadas con el fin de mejorar las regulaciones pertinentes a la conservación y uso sostenible de esta especie amenazada.

Introducción

En el Pacífico Tropical Oriental, la presencia de tiburones blancos *C. carcharias* se ha registrado en el noroeste de la Península de Baja California, el Golfo de California y principalmente, en la Reserva de la Biosfera Isla Guadalupe (Becerril-García *et al.*, 2019a; Galván-Magaña *et al.*, 2010; Hoyos-Padilla *et al.*, 2016; Santana-Morales *et al.*, 2020). En esta isla oceánica, la presencia estacional de tiburones blancos y las condiciones oceanográficas durante agosto-noviembre han permitido el desarrollo de una industria de buceo en jaula desde el año 2001 (Becerril-García *et al.*, 2019b). Esta actividad genera una derrama económica en la región, además de proporcionar empleos en las empresas privadas de buceo provenientes de Canadá, Estados Unidos y México (Cisneros-Montemayor *et al.*, 2020).

El reconocimiento de Isla Guadalupe como un sitio de agregación relevante para el tiburón blanco, así como la vulnerabilidad intrínseca de esta especie (baja fecundidad, madurez tardía, crecimiento lento), motivó una veda en México desde el año 2005. En esta región del Pacífico Oriental, la protección del tiburón blanco comenzó en Estados Unidos en 1994 (DOF, 2007; Lowe *et al.*, 2012). En las aguas circundantes de California Central y Baja California, algunas estimaciones poblacionales han sugerido un número bajo de tiburones blancos maduros (139-275 individuos; Chapple *et al.*, 2011). No obstante, otros estudios han proporcionado evidencia de un tamaño de población significativamente mayor (> 2,000 individuos) al incluir ejemplares tanto maduros como inmaduros (Burgess *et al.*, 2014). A pesar de estos esfuerzos, existe poca información acerca de la abundancia de esta especie en el Pacífico Mexicano. Este rezago se debe a que la obtención de datos biológicos está limitada a registros ocasionales y depende ampliamente de los fondos disponibles para estudiar áreas oceánicas alejadas de la costa (>200 km) como Isla Guadalupe (Huveneers *et al.*, 2018).

En México, el capítulo de libro publicado por Sosa-Nishizaki *et al.* (2012) es la única referencia que ha estimado el número de tiburones blancos a partir de datos obtenidos durante 2001-2009. Dichos autores estimaron un número de superpoblación de 120 tiburones blancos (51 ± 2.7 E.S. machos; 69 ± 1.6 E.S. hembras) y una

estimación poblacional anual que osciló entre 28-49 para los machos, y entre 21-36 para las hembras. Sin embargo, no hay información publicada sobre la cantidad de tiburones blancos después de dicho periodo, ni tampoco existen estimaciones sobre su abundancia durante las actividades de buceo en jaula (Huveneers *et al.*, 2018). El objetivo del presente capítulo fue estimar el número de tiburones blancos que interactúan con el turismo de buceo en jaula en Isla Guadalupe a través de un enfoque precautorio, con el fin de brindar información útil para el manejo de esta especie amenazada en la zona más importante del continente americano para su aprovechamiento sostenible (Cisneros- Montemayor *et al.*, 2020; Huveneers *et al.*, 2018).

Materiales y método

El número de tiburones blancos que interactuaron con el turismo se estimó con el método Schnabel de marcaje-recaptura mediante el proceso previo de foto-identificación (ver consideraciones generales) así como del seguimiento de los individuos registrados fotográficamente o “marcados” (Krebs, 2014; Seber, 1982). Este método sigue los supuestos de que el tamaño de la población es constante al no presentar reclutamiento ni pérdidas, que el muestreo es aleatorio y que todos los individuos tienen la misma oportunidad de ser capturados en cualquier muestra (Krebs, 2014). Aunque generalmente se aplica para poblaciones cerradas, el método de Schnabel permite otorgar un enfoque conservador y precautorio, con el fin de no sobreestimar la cantidad de tiburones blancos que interactúan con el turismo y sugerir medidas adecuadas a partir de una estimación conservadora. Asumir que una población es cerrada tiende a subestimar la abundancia total, dado que no considera a los individuos migratorios que entran y salen del área de estudio. De esta manera, los resultados de este capítulo no deben considerarse como una estimación poblacional, sino más bien, como una estimación de abundancia estacional con fines de ordenación y manejo (Meza-Arce *et al.* 2020, Santana-Morales *et al.* 2021. Becerril-García *et al.* 2022). Esta decisión estuvo basada en la evidencia existente de una población abierta de *C. carcharias* en el Pacífico nororiental (Burgess *et al.*, 2014; Domeier & Nasby-Lucas, 2007; Sosa-Nishizaki *et al.*, 2012). A pesar de esto, el

cumplimiento de los supuestos del método Schnabel (muestreo aleatorio; igual probabilidad de captura) se analizó mediante un análisis de regresión lineal de la proporción de individuos recapturados (R_t) y marcados (C_t) en la muestra t sobre el número acumulado de individuos marcados (M_t), según lo indicado por Krebs (2014). En esta prueba, la gráfica de regresión resultante será lineal si se cumplen estos supuestos; no obstante, dicha gráfica se volverá curva debido a una disminución en la proporción R_t/C_t y que reflejaría la violación de dichos supuestos (Krebs, 2014). Adicionalmente, se utilizó una aproximación a la normal de Seber (1982) para calcular los intervalos de confianza, ya que el número de individuos recapturados fue mayor a 50. Las fórmulas utilizadas para estimar la abundancia de tiburones blancos y los intervalos de confianza fueron las siguientes:

$$N = \frac{\sum_t (C_t M_t)}{\sum_t R_t} \quad \frac{1}{N} \pm t_{\alpha} S.E.$$

donde N es la estimación del número de tiburones blancos; C_t es el número de individuos marcados en la muestra t ; R_t es el número de recapturas en la muestra t ; M_t es el número de individuos marcados antes de la muestra t ; t_{α} es el valor de la tabla t de Student para los porcentajes de límite de confianza (100-alfa); E.S. es el error estándar de $1/N$.

Resultados

Un total de 71 tiburones blancos fueron identificados durante los tres años del estudio a partir del análisis de 6,316 registros. De estos individuos, 52 tiburones fueron identificados como machos (19 maduros; 33 inmaduros) y 19 como hembras (15 maduras; 4 inmaduras). La proporción sexual resultante de esta muestra fue de 2.7M:1F. El método de Schnabel permitió estimar una abundancia estacional de 78.17 tiburones blancos, con intervalos de confianza (IC) 95% de 105.6 tiburones como límite superior y 62.1 tiburones como límite inferior (Tabla 1).

Tabla 1. Datos de marcaje-recaptura utilizados para la estimación de abundancia de tiburón blanco *C. carcharias* mediante el método Schnabel en Isla Guadalupe (2012-2014). Abreviaturas: total de

individuos marcados en la muestra t (C_t); recapturas en la muestra t (R_t); número de individuos marcados antes de la muestra t (M_t).

Mes	C_t	R_t	Individuos nuevos	M_t	$C_t M_t$
Sep-12	17	0	17	0	-
Oct-12	31	7	24	17	527
Ago-13	11	9	2	41	451
Sep-13	20	13	7	43	860
Oct-13	21	12	9	50	1050
Nov-13	3	2	1	59	177
Ago-14	13	8	5	60	780
Sep-14	7	5	2	65	455
Oct-14	13	10	3	67	871
Nov-14	11	10	1	70	770
Total	147	76	71	472	5941

Para la confirmación de los resultados, el análisis de regresión lineal mostró que se cumplieron los supuestos del método Schnabel ($R^2=0.8054$, $P = 0.0004$; Fig. 12).

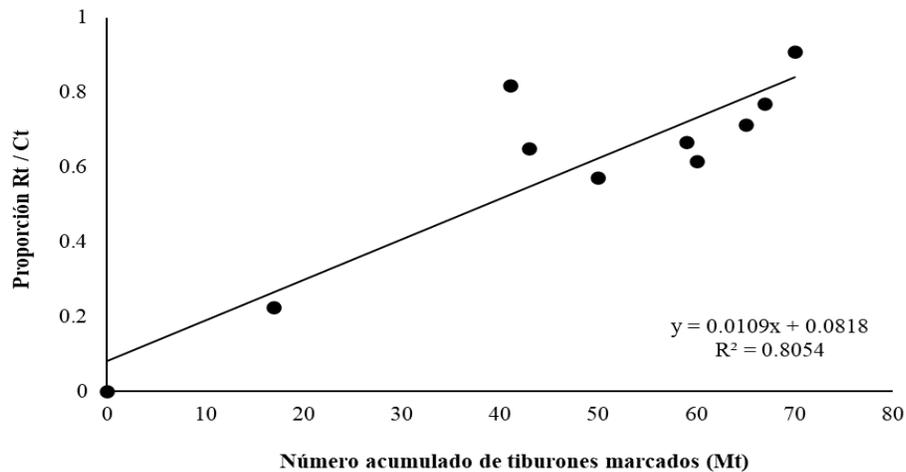


Figura 12. Regresión lineal del número acumulado de tiburones blancos marcados (M_t) frente a la proporción de individuos recapturados y marcados (R_t/C_t) utilizada para determinar el cumplimiento de los supuestos del método Schnabel. Abreviaturas: individuos marcados en la muestra t (C_t); recapturas en la muestra t (R_t); número de individuos marcados antes de la muestra t (M_t).

Discusión

Los depredadores tope suelen presentar bajos números poblacionales debido a la disponibilidad de presas y los requisitos energéticos necesarios para mantener

depredadores clave en ecosistemas saludables (Heithaus *et al.*, 2008; Smee, 2012). En el presente capítulo, estimamos una abundancia estacional de menos de 100 tiburones blancos en interacción con el turismo en Isla Guadalupe. Si bien esta no es una estimación poblacional, sino una estimación de abundancia enfocada al manejo del recurso durante su interacción con actividades humanas, el hecho de conocer la cantidad de tiburones que interactúan con el turismo puede apoyar en mejorar las decisiones de conservación. Al fijar un punto de comparación, estos resultados permiten evaluar la efectividad de las regulaciones aplicadas en décadas anteriores (Huveneers *et al.*, 2018; Meza-Arce *et al.*, 2020).

Históricamente, las estimaciones poblacionales de tiburón blanco en Isla Guadalupe han mostrado valores similares antes y después de la creación de la Reserva de la Biósfera y de la veda de tiburón blanco implementada desde el 2005 (DOF, 2007). Antes de este año, el número de tiburones blancos reportado para Isla Guadalupe era de 73 tiburones (Domeier y Nasby-Lucas, 2007), con un número que oscilaba entre 68 y 85 individuos según las observaciones realizadas posteriormente durante 2006-2009 (Sosa-Nishizaki *et al.*, 2012). En la presente estimación (2012-2014), el número estimado fue de 78 tiburones; nueve años después de la protección otorgada por el gobierno mexicano. Si bien esto puede ser interpretado como un signo de estabilidad, el análisis de los datos de años siguientes permitirá evaluar la efectividad de la protección de los tiburones blancos. Estas consideraciones son especialmente relevantes a la luz de la creciente presión antropogénica al aumentar el número de embarcaciones, buzos y viajes de buceo desde el año 2005 (Cisneros-Montemayor *et al.*, 2020). En estas instancias, los estudios de capacidad de carga resultarán esenciales para el control de los operadores de embarcaciones en la zona, ya que se carece de acciones normativas para soportar la presencia simultánea de hasta 10 embarcaciones de buceo (Torres-Aguilar *et al.*, 2015). Además de los estudios relacionados con los posibles efectos negativos del turismo, es necesario regular y programar el número máximo de embarcaciones en la zona, ya que esto permitiría mejorar el turismo y reducir la presión antropogénica sobre el tiburón blanco (Meza-Arce *et al.*, 2020; Becerril-García *et al.*, 2020). A la luz de estos resultados y durante la realización de esta tesis, fue posible participar en el desarrollo del primer

estudio de capacidad de carga para esta especie, en donde se estimó un número máximo de 10 embarcaciones y se fijó un ideal de seis barcos tipo *liveaboard* (Santana-Morales *et al.*, 2021). De seguirse las recomendaciones planteadas en este artículo, tales como la implementación de un calendario de buceo, incremento en las capacidades de los guardaparques y la delimitación de embarcaciones, se favorecerá el aprovechamiento y conservación de esta especie en la zona (Santana-Morales *et al.*, 2021).

La protección internacional y nacional de esta especie por parte de México y Estados Unidos podría explicar el número similar de tiburones registrado en este capítulo, en comparación con análisis previos (Sosa-Nishizaki *et al.*, 2012; Torres-Aguilar *et al.*, 2015). Los modelos con supuestos de población cerrada, como el método de marcaje-recaptura de Schnabel, han dividido opiniones en el pasado, ya que ciertas decisiones de manejo pueden afectar actividades económicas si se imponen nuevas restricciones a raíz de una estimación con un bajo número de individuos (Burgess *et al.*, 2014). No obstante, una estimación conservadora es importante para garantizar que las decisiones de gestión se tomen con un enfoque precautorio; sobre todo, en ambientes oceánicos con limitaciones logísticas, pero con amplio interés para la soberanía nacional, como Isla Guadalupe. Además, la estimación proporcionada en el presente capítulo es consistente con estimaciones previas de tiburones blancos en Isla Guadalupe y podría usarse, en conjunto, como una línea de base para futuros estudios (Domeier & Nasby-Lucas, 2007, 2008; Sosa-Nishizaki *et al.*, 2012; Santana-Morales *et al.*, 2021).

Las futuras direcciones de la investigación en temas demográficos deberán incluir datos de un período más amplio, junto con la combinación de métodos de seguimiento como el marcado satelital, genética y técnicas de marcaje-recaptura para individuos maduros e inmaduros de áreas costeras (Hoyos-Padilla *et al.*, 2016; Santana-Morales *et al.*, 2020). Estos estudios pueden proporcionar información sobre las tendencias poblacionales en Isla Guadalupe y otras zonas prioritarias, así como los efectos de las actividades humanas y el cambio climático sobre esta especie amenazada (Cavole *et al.*, 2016; Huveneers *et al.*, 2018; Santana-Morales *et al.*, 2021).

Además, la inclusión de datos gubernamentales del monitoreo estacional podría brindar una perspectiva más amplia sobre la demografía de esta especie en el Pacífico Oriental, la cual, recientemente ha mostrado un incremento de individuos juveniles que podría traducirse en un mayor reclutamiento (Santana-Morales *et al.*, 2021). La inclusión de tiburones inmaduros dentro de los análisis demográficos deberá, además, considerar la información de las áreas de crianza tales como la costa de California y Baja California para generar una estimación confiable sobre el estado de la población a nivel regional (Lowe *et al.*, 2012; Santana-Morales *et al.*, 2020).

CAPÍTULO II. PREFERENCIAS AMBIENTALES, ESPACIALES, Y TEMPORALES

Resumen

Isla Guadalupe, Baja California, México, es uno de los sitios de agregación de tiburón blanco *Carcharodon carcharias* más importantes en el Pacífico Oriental. Desde 2001, el buceo en jaula se realiza en las aguas circundantes de esta isla, principalmente durante los meses de agosto a noviembre. No obstante, el conocimiento sobre los factores que motivan esta agregación estacional y su permanencia durante el turismo es escaso. El propósito de este capítulo fue describir la probabilidad de ocurrencia de tiburones blancos en relación con factores espaciales, temporales y ambientales en Isla Guadalupe. Para este fin, se utilizaron modelos aditivos generalizados (GAMs) que permitieron describir el efecto de la temperatura superficial del mar, visibilidad, marea, fase lunar, nubosidad, hora del día y ubicación en la presencia del tiburón blanco. Los GAMs se generaron a partir de un conjunto de 6,266 avistamientos de tiburones blancos, los cuales, se clasificaron en una de las siguientes categorías: machos inmaduros, machos maduros, hembras inmaduras y hembras maduras. Se identificó una segregación sexual relacionada con el mes, donde las hembras fueron registradas después de los machos, a finales de septiembre. Adicionalmente, se evidenció una segregación de tiburones blancos según las variables analizadas, lo cual, es consistente con algunas observaciones previas en esta localidad. Las preferencias ambientales específicas de cada categoría de tiburón blanco podrían estar influenciadas por los hábitos alimenticios de cada grupo, la maduración sexual y su ciclo reproductivo. El presente capítulo constituye una línea de base del efecto del ambiente sobre la ocurrencia de tiburones blancos en Isla Guadalupe. Esta línea base puede ser utilizada en estudios posteriores sobre manejo y conservación en escenarios climáticos y antropogénicos del futuro. Su relevancia está relacionada con el conocimiento de su ecología en ambientes oceánicos y la presencia de esta especie amenazada durante la temporada turística.

Introducción

El tiburón blanco *C. carcharias* (Linnaeus, 1758) es un depredador tope que habita en ambientes templados tanto costeros como oceánicos de todo el mundo (Compagno *et al.*, 2005, Huveneers *et al.*, 2018). A pesar de su amplia distribución, esta especie se observa comúnmente en bajas densidades, con la excepción de áreas de crianza (White *et al.*, 2019, Santana-Morales *et al.*, 2020) y sitios de agregación cercanos a colonias de pinnípedos donde los tiburones blancos han evidenciado fidelidad al sitio (Klimley *et al.*, 1996, Domeier y Nasby-Lucas 2008). Estos sitios de agregación se encuentran principalmente en zonas costeras e insulares ubicadas sobre la plataforma continental (Huveneers *et al.*, 2018, White *et al.*, 2019). Las excepciones a este patrón son evidentes en agregaciones oceánicas como Isla Guadalupe, México, o la *Shared Offshore Foraging Area* (SOFA, por sus siglas en inglés) en el Océano Pacífico Noreste, donde también se han registrado tiburones blancos de manera estacional (Domeier & Nasby-Lucas 2008, Hoyos-Padilla *et al.*, 2016).

Al ser una especie vulnerable a la extinción, los sitios de agregación de tiburón blanco son considerados como zonas prioritarias para su supervivencia y, por lo tanto, altamente relevantes en términos de investigación científica, manejo sostenible y conservación (Huveneers *et al.*, 2018, Rigby *et al.*, 2019, White *et al.*, 2019). En otros sitios de agregación de tiburones blancos, se ha observado que los factores ambientales pueden influir en la distribución, reproducción, uso de hábitat y también, en la probabilidad de interacción con los humanos (Pyle *et al.*, 1996, Hammerschalg *et al.*, 2006, Robbins, 2007, Weltz *et al.*, 2013, Hoyos-Padilla *et al.*, 2016). La mayoría de estos estudios se han realizado en sitios de agregación costeros, por lo que el conocimiento para entender la ecología de los tiburones blancos en áreas oceánicas, como Isla Guadalupe, resulta altamente relevante para su manejo y conservación (Huveneers *et al.*, 2018). Este tipo de información proporciona herramientas para futuras comparaciones, sobre todo, en estudios relacionados con variaciones climáticas ocasionadas por eventos de meso escala o por efectos del cambio climático (Huveneers *et al.*, 2018).

En sitios de agregación continentales como las Islas Farallón, Estados Unidos de América, algunas condiciones ambientales como el oleaje alto, baja visibilidad, cielos nublados, luna nueva y mareas altas se han relacionado con un aumento en la ocurrencia de tiburones blancos (Pyle *et al.*, 1996). Las conclusiones de estos estudios indican que dichas condiciones son favorables para la captura de presas con alto contenido energético, como los elefantes marinos del norte *Mirounga angustirostris*; los cuales, se verían afectados por dichas condiciones y favorecerían su depredación (Anderson *et al.*, 1996, Pyle *et al.*, 1996). Este efecto por parte de los factores ambientales ha sido sugerido también en Seal Island, Sudáfrica, al registrar un aumento significativo de ataques de tiburón blanco hacia los lobos finos del Cabo *Arctocephalus pusillus pusillus*. Los cuales, se sugiere que fueron favorecidos por la dirección e intensidad del viento, mareas bajas y poca luminosidad (Hammerschlag *et al.*, 2006).

La temperatura de la superficie del mar (TSM) es un factor clave que influye en la ocurrencia y distribución del tiburón blanco. En Florida, Estados Unidos de América, la presencia de tiburones blancos se relacionó con una disminución de la TSM durante el invierno y principios de la primavera dentro de un rango de 14-23 °C (Adams *et al.*, 2014, Curtis *et al.*, 2014). En el Mar Mediterráneo, Fergusson (1994, 1996) reportó la ausencia de tiburones blancos cuando la TSM excedía los 25 °C, lo que coincidió a su vez, con el desplazamiento de los tiburones monitoreados hacia aguas más profundas (de menor temperatura), con movimientos esporádicos hacia la superficie probablemente con fines de termorregulación o alimentación. En las Islas Neptuno, Australia, se observó una mayor abundancia de hembras de tiburón blanco durante condiciones cálidas de TSM (16-18 °C) y marea alta, lo que se relacionó con una posible segregación sexual vinculada con aspectos reproductivos (Robbins, 2007). Con respecto a la presencia de tiburones blancos en False Bay, Sudáfrica, se ha estimado que las probabilidades para observar esta especie aumentan durante la tarde, con una TSM de 14-18 °C y durante las noches con luna nueva (Towner *et al.*, 2013, Weltz *et al.*, 2013).

En el Pacífico Mexicano, la presencia de tiburones blancos se ha reportado en el Golfo de California (Galván-Magaña *et al.* 2010, Becerril-García *et al.* 2019a), la costa oeste de la Península de Baja California (Santana-Morales *et al.* 2020), el Archipiélago de Revillagigedo (Becerril-García *et al.* 2020a) y principalmente en Isla Guadalupe (Domeier y Nasby-Lucas, 2007, Hoyos-Padilla *et al.*, 2016). Desde 2001, las actividades turísticas para el aprovechamiento de esta especie se han realizado durante agosto-noviembre en la parte noreste de Isla Guadalupe, conocida como Rada Norte. Esta es el área oficial designada para el buceo en jaula debido a las regulaciones locales de vida silvestre (Torres-Aguilar *et al.*, 2015). Esta actividad económica es realizada por embarcaciones nacionales y extranjeras que generan beneficios económicos, brindan una vigilancia adicional contra la pesca ilegal, y favorecen la investigación al ser utilizadas frecuentemente como plataforma para actividades científicas o de monitoreo biológico (Cisneros-Montemayor *et al.* 2020).

La investigación científica relacionada con la ecología de los tiburones blancos en Isla Guadalupe se ha centrado en entender sus patrones de migración (Domeier & Nasby-Lucas, 2008, Domeier & Nasby-Lucas, 2013), ecología trófica (Jaime-Rivera *et al.* 2013, Alderete-Macal *et al.*, 2020) y movimientos locales (Domeier *et al.*, 2012, Skomal *et al.*, 2015, Hoyos-Padilla *et al.*, 2016; Aquino *et al.*, 2021). Los análisis de isótopos estables ($\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$) en la dermis de tiburones blancos han proporcionado evidencia del consumo de pinnípedos, atunes y calamares, aunque no evaluaron las diferencias entre las etapas de madurez (maduros/inmaduros; Jaime-Rivera *et al.* 2013). Estudios de telemetría acústica han evidenciado que los tiburones blancos presentan una segregación espacial en la isla, la cual, se relaciona con el sexo y la madurez de los tiburones, al observar tiburones inmaduros en aguas someras (<100 m) y ejemplares maduros en aguas profundas (>250 m; Hoyos-Padilla *et al.*, 2016). A pesar de esto, el estudio del efecto del ambiente sobre la ocurrencia de tiburones blancos en localidades oceánicas es aún escaso, por lo que se desconocen los factores motivantes de dicha segregación y las preferencias ambientales de los tiburones blancos.

El segundo capítulo de esta tesis tuvo como objetivo proporcionar información sobre el efecto de factores espaciales y temporales, así como de las condiciones ambientales sobre la probabilidad de ocurrencia de tiburones blancos durante las actividades turísticas en Isla Guadalupe. Estas observaciones constituyen una de las primeras descripciones de la ecología de los tiburones blancos en ambientes oceánicos, las cuales, pueden ser utilizadas para sustentar decisiones de manejo. A su vez y de manera similar a los resultados de esta tesis, la información generada es una línea base para futuros escenarios climáticos y turísticos en esta área marina protegida.

Materiales y método

Las generalidades del registro de los datos biológicos y ambientales se describen en la sección de Consideraciones Metodológicas Generales de la presente tesis. Todos los avistamientos obtenidos se clasificaron según el sexo y la etapa de madurez de cada tiburón (machos inmaduros, machos maduros, hembras inmaduras y hembras maduras). Al momento del avistamiento, la presencia de un tiburón blanco fue registrada con el valor “1”; mientras que las ausencias se reportaron como “0” para todas las categorías analizadas.

Los resultados generales de la ocurrencia de tiburones blancos, según año y mes, se describieron utilizando los “avistamientos por día” y “avistamientos por hora” como unidades para los análisis estadísticos preliminares. Este conjunto de datos no cumplió con los supuestos de normalidad, de acuerdo con la prueba de Lilliefors ($P < 0,05$). Por tanto, las diferencias significativas se calcularon mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba post-hoc de Bonferroni. La significancia de las proporciones mensuales de sexos se calculó con una prueba binomial exacta mediante el software R (R Core Team, 2019) versión 3.6. Después de estos primeros análisis, los datos de presencia y ausencia se utilizaron para el modelado estadístico que involucra datos ambientales.

Datos espaciales, temporales y ambientales

La posición de la embarcación (latitud, longitud) se registró al comienzo de cada día. Las condiciones ambientales se registraron cada 30 minutos durante las actividades de buceo, a la par de los datos biológicos. Los factores ambientales analizados incluyeron TSM (termómetro de etanol; 0.1 ° C); marea alta o baja utilizando el software MAR v1.0 (CICESE, 2020) y datos públicos del Centro de Productos y Servicios Oceanográficos Operativos de la Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica de los Estados Unidos de América (NOAA, 2020); fase lunar según los datos del Departamento de Aplicaciones Astronómicas del Observatorio Naval de E.U.A. (2020; considerándose “0” como luna nueva y “1” como luna llena); porcentaje de cobertura de nubes *in situ* (agrupadas en cuatro categorías 0-25, 25-50, 50-75 y 75-100%); y visibilidad del agua mediante el uso de un disco de Secchi (m; 1 m). El límite entre marea alta y baja se definió de acuerdo con el nivel medio del mar (60 cm) para Isla Guadalupe, así como los valores de referencia de la bajamar media (0 cm) y la pleamar media (120 cm; CICESE, 2020).

La probabilidad de ocurrencia de tiburones blancos se analizó con relación a las diversas condiciones ambientales. Esto permitió describir los factores que limitan la presencia de tiburones blancos durante las actividades de buceo en jaulas. Se asumió que los cambios en la ocurrencia de tiburones blancos están relacionados con otras variables distintas a las actividades humanas, a pesar de que el atrayente se utiliza para acercar a los tiburones durante las actividades de turismo en esta área. Esta suposición fue apoyada por la observación de una presencia similar de tiburones blancos independientemente del atrayente utilizado, según lo informado por Becerril-García et al. (2020d) durante el mismo periodo de estudio.

Modelación estadística

Se utilizaron modelos aditivos generalizados (GAMs) para evaluar los efectos que tienen los factores espaciales, temporales y ambientales sobre la probabilidad de ocurrencia de tiburones blancos en Isla Guadalupe. Los GAMs fueron creados con el paquete *mgcv* del software R (R Core Team, 2019) versión 3.6. Estos modelos generalmente se describen como un modelo lineal generalizado con un predictor lineal

que involucra funciones suaves de variables predictoras (Wood 2006). La variable de respuesta fue “presencia/ausencia” para las cuatro categorías de tiburones blancos, que incluyeron: 1) machos inmaduros; 2) machos maduros; 3) hembras inmaduras; y 4) hembras maduras. Por tanto, en los GAMs se utilizó una distribución binomial con función de enlace *logit*. Para la modelación de las cuatro categorías de tiburones blancos, la variable de respuesta obtuvo un valor de “1” si el tiburón pertenecía a una categoría específica y “0” en caso contrario. Las variables predictoras fueron temperatura, año, hora, nubosidad, fase lunar, visibilidad, marea, longitud y latitud. Los datos de avistamiento se modificaron para la modelación, es decir, las columnas con datos de “presencia/ausencia” para las cuatro categorías de tiburones blancos se apilaron en filas según la hora y el día a lo largo de los tres años de muestreo.

Para evitar el sobreajuste del modelo, se utilizó la eliminación hacia atrás -o *Backward Stepwise Selection* en Inglés-, que consistió en construir el modelo completo (todas las variables predictoras) y luego eliminar cada variable predictora en cada paso. En el paso final, se obtuvo el modelo nulo (media general) para cada categoría. Para evaluar si la eliminación disminuyó el ajuste del modelo, se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC) con el AIC más bajo como el modelo mejor ajustado. Por tanto, en los modelos finales se utilizaron hasta siete variables predictoras con un coeficiente de correlación de Pearson bajo (<0.6). El nivel de suavizado (es decir, el número de bases en las funciones de suavizado) para cada variable de predicción se restringió a 4 para evitar el sobreajuste, excepto para el término espacial (longitud y latitud como términos de interacción). La autocorrelación temporal se evaluó mediante la función *corAR1* () en el GAM para las cuatro categorías de tiburones blancos; sin embargo, esto no mejoró el ajuste del modelo y, por lo tanto, no fue incluido. La suposición de normalidad del modelo y la homocedasticidad de los residuos se evaluaron mediante gráficos de diagnóstico utilizando la función *gam.check*. Cada GAM se expresó de la siguiente manera:

$$\text{logit}(\mu_i) = \alpha + f_1(\text{Lon}_i, \text{Lat}_i) + f_2(\text{Hour}_i) + f_3(\text{Lunar}_i) + f_4(\text{Visibility}_i) + \text{Year}_i + \text{Cloud}_i + \text{Tide}_i \quad (1)$$

Donde μ_i es la presencia/ausencia en las cuatro categorías de tiburones (1) Machos inmaduros; 2) machos maduros; 3) hembras inmaduras; o 4) hembras maduras); α es la intersección; fn es la función suave (*spline* de regresión de placa delgada); el año, la nubosidad y la marea se utilizaron como variables categóricas. Además, los resultados con respecto a las variables espaciales (latitud; longitud) de cada GAM se utilizaron para crear una figura que resumiera las observaciones de la probabilidad de ocurrencia de tiburones blancos en la Bahía Rada Norte.

Resultados

Se registró un total de 6,266 avistamientos de tiburones blancos, de los cuales, el 44% fueron machos inmaduros ($n = 2740$); 30% de machos maduros ($n = 1856$); 5% de hembras inmaduras ($n = 342$); y 21% de hembras maduras ($n = 1328$). La mediana de registros fue de 59 avistamientos por día ($ES \pm 5.96$) y 9.82 avistamientos por hora ($ES \pm 1.22$), sin encontrarse diferencias significativas en los avistamientos por hora relacionados con el año ($H_{2,90} = 6.35$; $p = 0.04$) y confirmado por la prueba *post-hoc* de Bonferroni ($p > 0,05$). En cuanto al mes, el número de avistamientos por hora fue mayor durante agosto ($H_{3,90} = 21.20$; $p < 0.01$), con una presencia menor, pero similar, entre los meses siguientes. En general, se observó una proporción de sexos de 2.8:1 (H:M; $p < 0.01$); sin embargo, esta razón varió según el mes, dado que solo se registraron machos durante agosto y las hembras se observaron por primera vez a fines de septiembre 9.4:1 (H:M; $p < 0,01$). En los meses siguientes, la proporción de sexos fue de 1.6:1 (H:M; $p < 0.01$) en octubre y de 1.2:1 (H:M; $p < 0.05$) en noviembre.

Modelación estadística

Se crearon cuatro modelos para describir la probabilidad de ocurrencia de cada categoría de tiburón blanco, los cuales, explicaron el 36-67% de la devianza según el conjunto de datos de cada categoría. En este sentido, sólo se consideraron los factores significativos (Tabla 2) para cada modelo, ya que esto evitó la sobre parametrización de los GAMs. Así, las variables espaciales, temporales y ambientales que afectan la ocurrencia de tiburones blancos fueron descritas según la categoría analizada. En la modelación se utilizaron 3,033 registros para cada categoría debido a la remodelación

de los datos de avistamientos. En este sentido, la disposición de los avistamientos con respecto a la hora y día podría haber incluido más de una categoría de tiburones; por lo tanto, se redujo el número total de registros para los GAM. Las gráficas de diagnóstico de residuos sugieren que los supuestos del modelo de distribución normal y homocedasticidad de los residuos no se violaron y fueron independientes de los valores de las co-variables.

Resumen de resultados

Machos maduros. Según el modelo, se observó una mayor probabilidad de ocurrencia de machos maduros a lo largo de toda la bahía Rada Norte y hacia la zona este con profundidades superiores a los 500 m (Fig. 13, 17); durante la mañana antes de las 1000 h, con TSM más fría ($< 20^{\circ}\text{C}$), condiciones de baja visibilidad ($< 15\text{ m}$), baja cobertura de nubes (0-25%), mareas bajas y después de una luna creciente. El modelo que involucra los datos de esta categoría explicó el 67.4% de la desviación (Fig. 13).

Machos inmaduros. Este modelo evidenció una mayor probabilidad de ocurrencia de machos inmaduros cerca de la costa y en la parte central de la bahía Rada Norte ($< 100\text{ m}$, Fig. 14, 17); antes del mediodía (1200 h), durante TSM cálida ($> 22^{\circ}\text{C}$), condiciones de alta visibilidad ($> 20\text{ m}$), y después de medialuna o luna llena. Las variables categóricas sugieren que la presencia de machos juveniles fue mayor en 2014, con nubosidad entre 25-50% y marea alta. El modelo que involucra los datos de esta categoría explicó el 41.3% de la desviación (Fig. 14).

Hembras maduras. Una mayor probabilidad de ocurrencia de hembras maduras se vinculó con la parte norte y sur de la bahía Rada Norte a profundidades $< 500\text{ m}$ (Fig. 15, 17); después de las 1400 h, tanto en condiciones frías ($< 21^{\circ}\text{C}$) como cálidas de TSM ($> 24^{\circ}\text{C}$), baja visibilidad ($< 15\text{ m}$), marea baja, cielos despejados ($< 25\%$ de cobertura de nubes) y después de noches con menos de 0,6 de cobertura de luz lunar. Este modelo sugiere que la probabilidad de ocurrencia de hembras maduras fue similar durante el período de estudio. El modelo que involucra los datos de esta categoría explicó el 54.3% de la desviación total (Fig. 15).

Hembras inmaduras. Una mayor probabilidad de ocurrencia se relacionó con la costa de la parte norte y sur de la bahía Rada Norte (<100 m, Fig. 16, 17); después del mediodía (1200 h), durante TSM fría (<22 ° C) y condiciones de baja visibilidad (<15 m), mareas altas, nubosidad entre 25-50% y después de medialuna o luna llena. Este modelo explicó el 63.8% de la desviación total (Fig. 16).

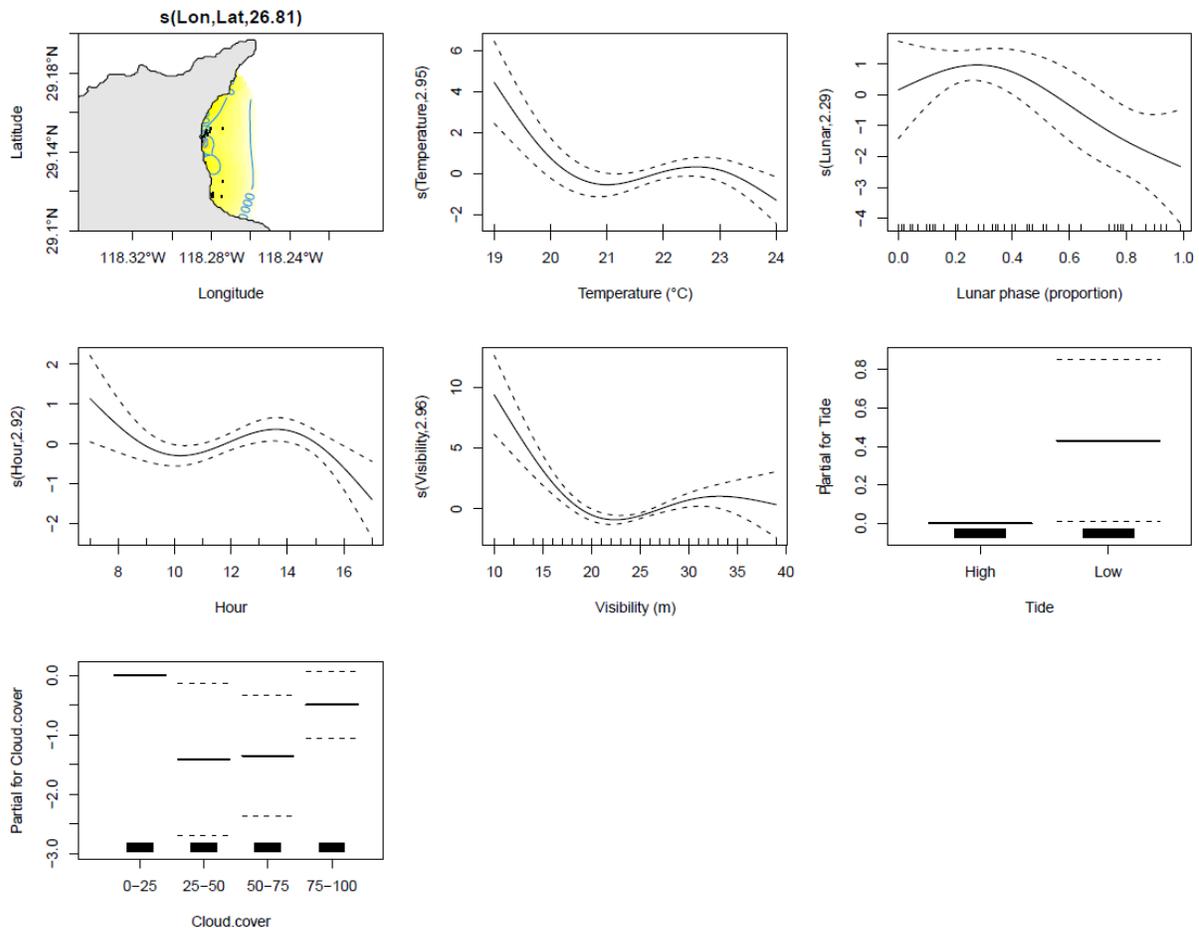


Figura 13. Gráficos de efectos del modelo aditivo generalizado para machos maduros de *C. carcharias*. Todos los valores están en la escala del predictor lineal. Las gráficas de contorno indican la distribución preferida de los tiburones, mientras que el color más altos. Las líneas discontinuas representan dos errores estándar por encima y por debajo de la estimación de la curva suave. Los números que siguen al nombre de la variable predictora indican los grados de libertad efectivos de la curva suave. El gráfico de alfombra muestra observaciones de variables predictoras.

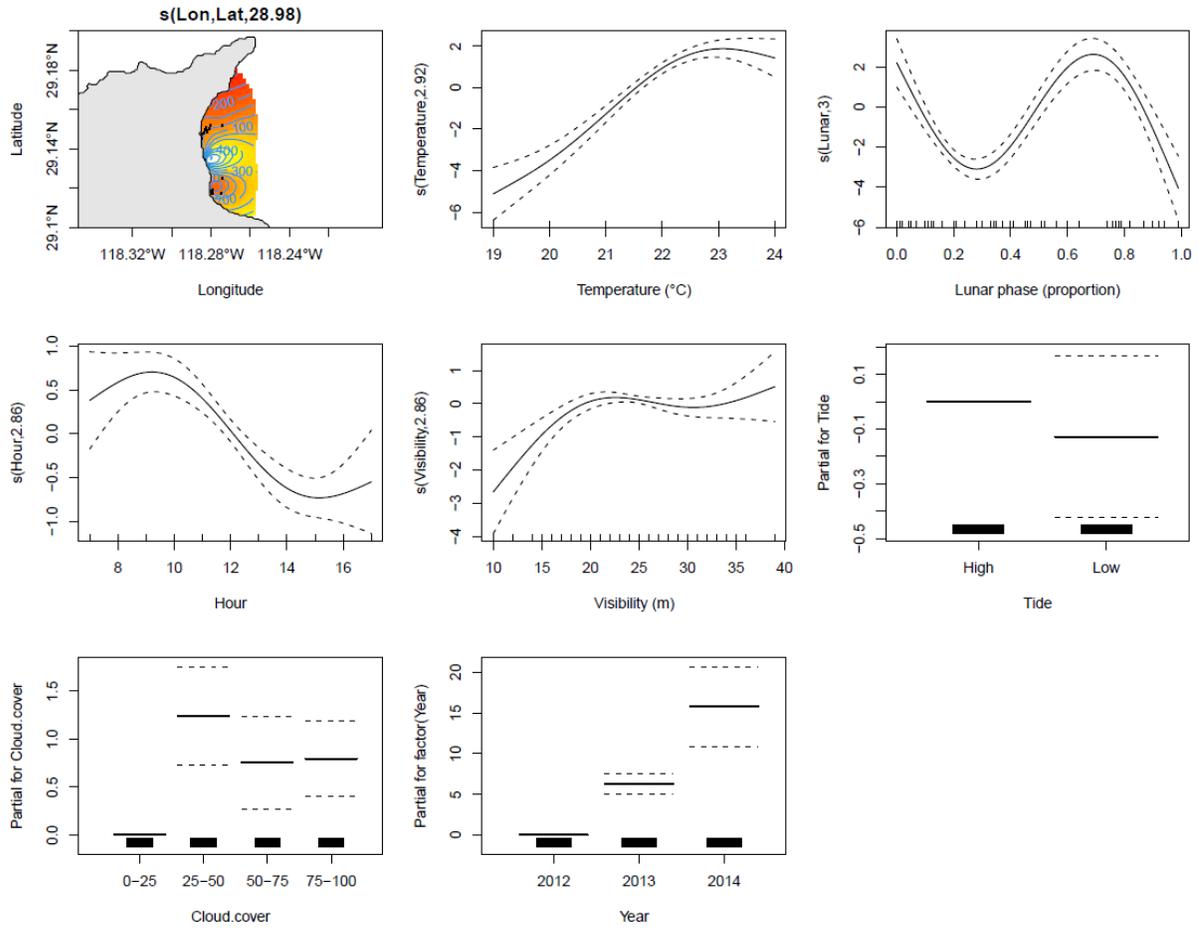


Figura 14. Gráficas de efectos del modelo aditivo generalizado para machos inmaduros de *C. carcharias*. Todos los valores están en la escala del predictor lineal. Las gráficas de contorno indican la distribución preferida de los tiburones, mientras que el color más claro indica valores más altos. Las líneas discontinuas representan dos errores estándar por encima y por debajo de la estimación de la curva suave. Los números que siguen al nombre de la variable predictora indican los grados de libertad efectivos de la curva suave. El gráfico de alfombra muestra observaciones de variables predictoras.

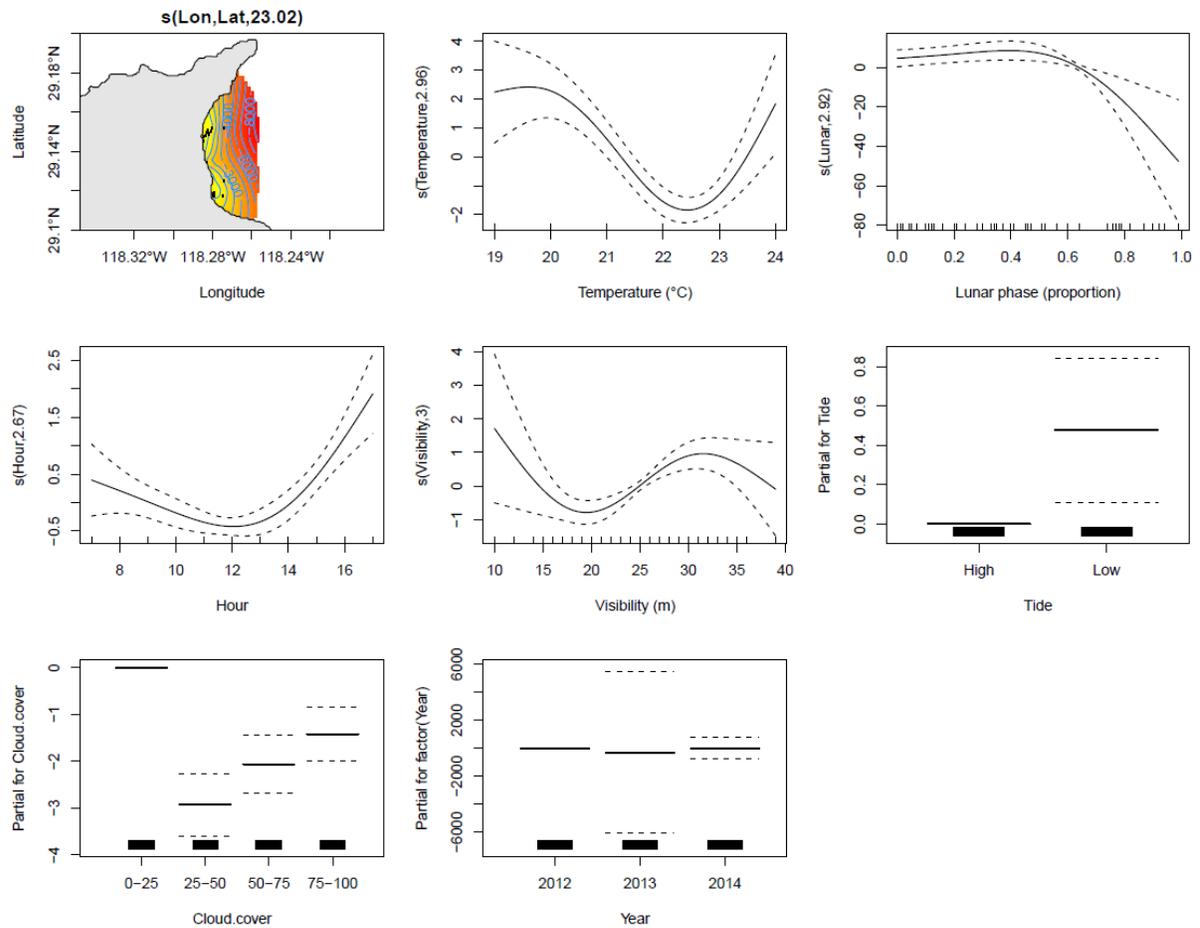


Figura 15. Gráficos de efectos del modelo aditivo generalizado para hembras maduras de *C. carcharias*. Todos los valores están en la escala del predictor lineal. Las gráficas de contorno indican la distribución preferida de los tiburones, mientras que el color más claro indica valores más altos. Las líneas discontinuas representan dos errores estándar por encima y por debajo de la estimación de la curva suave. Los números que siguen al nombre de la variable predictora indican los grados de libertad efectivos de la curva suave. El gráfico de alfombra muestra observaciones de variables predictoras.

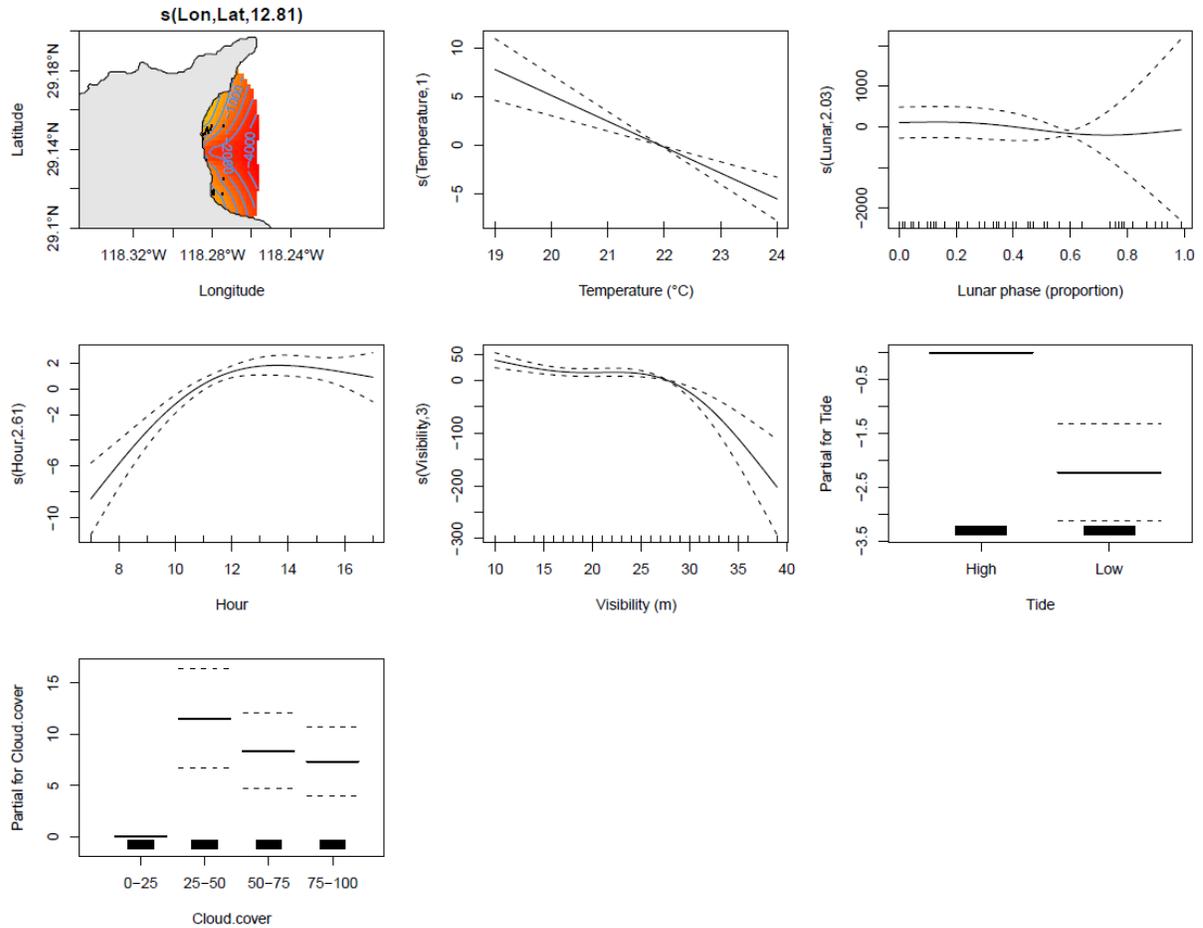


Figura 16. Gráficas de efectos del modelo aditivo generalizado para hembras inmaduras de *C. carcharias*. Todos los valores están en la escala del predictor lineal. Las gráficas de contorno indican la distribución preferida de los tiburones, mientras que el color más claro indica valores más altos. Las líneas discontinuas representan dos errores estándar por encima y por debajo de la estimación de la curva suave. Los números que siguen al nombre de la variable predictora indican los grados de libertad efectivos de la curva suave. El gráfico de alfombra muestra observaciones de variables predictoras.

Tabla 2. Selección progresiva hacia atrás del modelo aditivo generalizado para *C. carcharias* según sexo y estadio de madurez (n = 3.033 registros). Dev. exp. = desviación explicada (%), Aj. R² = R² ajustado, AIC = Criterio de información de Akaike. En negrita los modelos mejor equipados. La última fila representa el modelo nulo (media general).

Machos maduros				Machos inmaduros			
Modelo	AIC	Aj. R ²	Dev. exp. (%)	Modelo	AIC	Aj. R ²	Dev. exp. (%)
Completo	1266	0.711	67.403	Completo	2538	0.465	41.270
-Año	1264	0.711	67.404	-Year	2715	0.416	36.930
- Nubes	1267	0.707	67.155	-Nubes	2711	0.416	36.874
-Marea	1269	0.705	67.047	-Marea	2710	0.415	36.860
-s(Hora)	1281	0.701	66.538	-s(Visibilidad)	2728	0.411	36.292
-				-			
s(Temperatura)	1312	0.689	65.573	s(Temperatura)	2784	0.387	34.794
-s(Visibilidad)	1337	0.686	64.706	-s(Hora)	2843	0.371	33.244
-s(Luna)	1379	0.674	63.384	-s(Luna)	3088	0.314	27.201
-s(Lon, Lat)	3617	0.000	0.000	-s(Lon, Lat)	4162	0.000	0.000
Hembras maduras				Hembras inmaduras			
Modelo	AIC	Aj. R ²	Dev. exp. (%)	Modelo	AIC	Aj. R ²	Dev. exp. (%)
Completo	1551	0.536	54.331	Completo	525	0.516	63.886
-Año	1556	0.536	54.323	-Año	522	0.516	63.875
-Marea	1566	0.529	53.831	-s(Luna)	573	0.476	60.469
-Nubes	1644	0.500	51.182	-			
-s(Luna)	1709	0.469	49.015	s(Temperatura)	579	0.463	59.633
-s(Visibilidad)	1753	0.453	47.458	-Marea	583	0.457	59.176
-s(Hora)	1809	0.425	45.501	-Nubes	604	0.450	57.130
-				-s(Visibilidad)	781	0.274	42.834
s(Temperatura)	1931	0.374	41.564	-s(Hora)	832	0.224	38.511
-s(Lon, Lat)	3215	0.000	0.000	-s(Lon, Lat)	1301	0.000	0.000

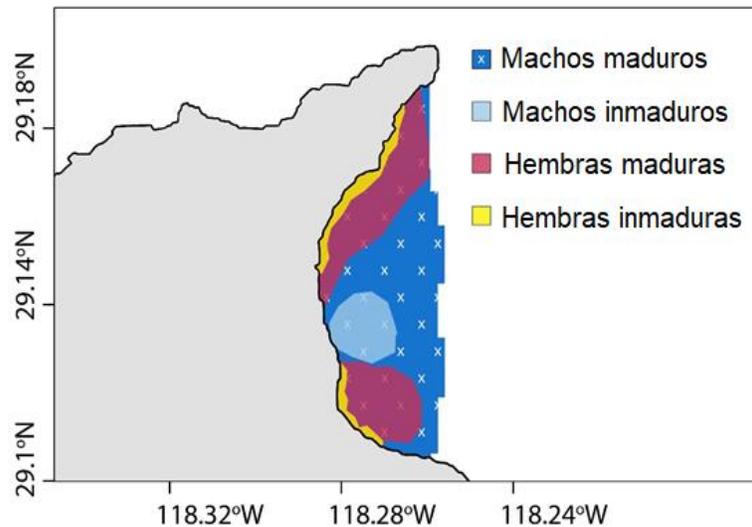


Figura 17. Zonas con mayor probabilidad de ocurrencia de tiburones blancos según su estadio de madurez sexual en Rada Norte, Isla Guadalupe, México.

Discusión

La modelación estadística permitió identificar una segregación espacial de tiburones blancos relacionada con el sexo y la madurez sexual. Esto es similar a lo observado en otros estudios que utilizaron telemetría pasiva o activa, en donde los tiburones inmaduros permanecieron cerca de la costa y los maduros fueron detectados en áreas más profundas (Hoyos-Padilla *et al.* 2016). La probabilidad de ocurrencia estuvo relacionada con la ubicación de la bahía y las preferencias ambientales de cada grupo analizado.

Segregación espacial y temporal

Los machos maduros e inmaduros fueron registrados a principios de agosto, mientras que las hembras de ambos estados de madurez fueron detectadas a finales de septiembre. Estos resultados son consistentes con la migración reportada de los tiburones blancos hacia Isla Guadalupe (Domeier & Nasby-Lucas, 2008, Hoyos-Padilla *et al.* 2016). El efecto de tales patrones migratorios fue evidente en la proporción de sexos mensual, ya que la proporción sexual fue diferente en agosto y septiembre, pero similar en octubre y noviembre. Estudios previos han demostrado que los tiburones maduros permanecen hasta enero (Domeier *et al.* 2012), por lo que es probable que

la proporción de sexos sea similar a lo largo de su estancia en Isla Guadalupe. La presencia de individuos maduros de ambos sexos resalta la importancia del área en términos de alimentación y adquisición de presas como cefalópodos, peces y pinnípedos (Jaime-Rivera *et al.*2013; Hoyos-Padilla *et al.*2016), pero también en la reproducción mediante la observación de individuos sexualmente maduros durante el mismo periodo. Sin embargo, la investigación sobre la biología reproductiva de los tiburones blancos en Isla Guadalupe es escasa, aunque podría evaluarse en el futuro con el análisis de perfiles hormonales esteroides mediante técnicas mínimamente invasivas, como la sugerida en el quinto capítulo de esta tesis (Sulikowski *et al.*2012, Domeier & Nasby-Lucas 2013; Becerril-García *et al.*2020c). La mayor probabilidad de ocurrencia de machos inmaduros durante 2013 y 2014 podría estar relacionada con un aumento en el número de esta categoría, ya que algunos autores han sugerido un aumento en el número de juveniles debido a las acciones de protección implementadas por México y Estados Unidos desde finales de la década de 1990 (Burgess *et al.*, 2014; Santana-Morales *et al.* 2021). No obstante, un aumento en la presencia de tiburones blancos también podría deberse a condiciones ambientales favorables, una mayor disponibilidad de presas en el área, o al manejo realizado en áreas marinas protegidas mexicanas como Isla Guadalupe (Pyle *et al.* 1996, Hammerschalg *et al.* 2006, Weltz *et al.* 2013).

Durante el periodo de estudio, la probabilidad de ocurrencia de machos maduros fue similar en toda la bahía con una mayor ocurrencia en áreas alejadas de la costa, a diferencia de los tiburones inmaduros. Esta segregación espacial podría estar asociada con la disponibilidad de presas para cada grupo, ya que la ocurrencia de machos maduros fue mayor en zonas de aguas profundas, lo que podría estar relacionado con la captura de presas como el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), el jurel de Castilla (*Seriola lalandi*), mamíferos marinos y calamares (Reyes-Bonilla *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2012, Jaime-Rivera *et al.*, 2013; Becerril-García *et al.*, 2020). En el caso de tiburones inmaduros, la ocurrencia en áreas someras estaría relacionada con la captura de presas más pequeñas, como peces óseos y otros elasmobranchios, así como para evitar encuentros con tiburones blancos maduros (Walther-Mendoza *et al.* 2013, Hoyos-Padilla *et al.*2016, Becerril-García *et al.* 2019b).

La presencia de hembras maduras se relacionó con áreas cercanas a las dos colonias de elefantes marinos del norte (*M. angustirostris*) ubicadas al norte y al sur de la bahía Rada Norte (Gallo-Reynoso *et al.* 2005b). La superposición de hábitats tanto para las hembras de tiburón blanco como para los elefantes marinos está relacionada con las condiciones favorables para el uso de hábitat y las interacciones tróficas entre estos taxones (Gallo-Reynoso *et al.* 2005b, Jaime-Rivera *et al.* 2013). Como una de las presas principales del tiburón blanco, es posible que los elefantes marinos del norte sean un elemento importante para la dieta de hembras maduras, ya que otros autores han sugerido la presencia de hembras preñadas entre octubre y diciembre (Domeier & Nasby-Lucas 2013, Hoyos- Padilla *et al.* 2016). La adquisición de energía para la vitelogénesis y nutrición de los embriones (oofagia), podría obtenerse sustancialmente al alimentarse de presas con alto contenido lipídico, como lo son cetáceos y pinnípedos de gran tamaño como *M. angustirostris* (Klimley *et al.* 1996, Compagno *et al.* 2005, Jaime-Rivera *et al.* 2013).

Temperatura superficial del mar

La probabilidad de aparición de tiburones blancos fue diferente según la TSM. La presencia de tiburones maduros fue mayor durante las condiciones de TSM más frías (<21 °C), mientras que los machos inmaduros se observaron principalmente durante condiciones más cálidas (> 22 °C). Esta observación podría estar relacionada con la tolerancia y regulación térmica, ya que los tiburones inmaduros tienen un cuerpo más pequeño y, por lo tanto, una mayor proporción superficie-volumen en comparación con los tiburones maduros de mayor tamaño (Block y Finnerty, 1994). La menor inercia térmica de los tiburones inmaduros, en comparación con individuos maduros, podría explicar la preferencia de este grupo en condiciones de aguas cálidas, lo que a su vez permitiría favorecer su metabolismo en términos de mayores tasas de crecimiento y maduración sexual, siempre que haya presas disponibles y los requerimientos energéticos de los tiburones blancos estén cubiertos dentro de un ecosistema saludable (Robbins 2007). Sin embargo, este efecto no se observó en el grupo de hembras inmaduras, ya que se observó una mayor probabilidad de ocurrencia durante la TSM más fría.

Aunque no hay evidencia suficiente para apoyar esta hipótesis y no la segregación sexual no ha sido analizada a profundidad en tiburones lamniformes, las diferencias en la TSM entre la aparición de machos y hembras inmaduros probablemente se deban a una segregación sexual durante etapas juveniles (Klimley 1987, Andrews *et al.* 2010, Hoyos-Padilla *et al.* 2014). La existencia de una segregación sexual durante el desarrollo temprano de los tiburones blancos debe evaluarse en estudios futuros mediante el uso de telemetría, ácidos grasos, o análisis detallados de isótopos estables en aminoácidos. Esto podría proporcionar evidencia de diferencias en el uso de hábitat, preferencias de presas y, por lo tanto, nicho ecológico, lo que conduciría a una mejor comprensión de la ecología de esta especie en diferentes estadios (Jaime-Rivera *et al.*, 2013, Huveneers *et al.*, 2018, Becerril-García *et al.*, 2019b, Alderete-Macal *et al.*, 2020).

La generación de calor interno y su distribución en el cuerpo a través de la *retia mirabilia* podría explicar una mayor ocurrencia de tiburones maduros en aguas más frías (Goldman 1997, Compagno *et al.* 2005). En el Mar Mediterráneo, los tiburones blancos maduros mostraron movimientos verticales hacia aguas profundas durante condiciones cálidas de TSM mayores a 25°C (Fergusson 1994, 1996), lo que podría sugerir un comportamiento de buceo que permitirían una termorregulación conductual. En la Isla Guadalupe, los tiburones maduros permanecen la mayor parte del tiempo en profundidades cercanas a los 250 m, lo que podría relacionarse con su termorregulación y la búsqueda de presas durante el día (Hoyos-Padilla *et al.* 2016). Las investigaciones futuras sobre la termorregulación de los tiburones podrían proporcionar información sobre este tema, ya que se podrían observar diferencias claras entre la termorregulación y comportamiento de individuos maduros e inmaduros (Goldman 1997, Bernal & Sepulveda 2005). Por el contrario, algunos de los avistamientos de hembras maduras ocurrieron durante condiciones cálidas de TSM (> 24 °C), lo que influyó en el modelo de ocurrencia de esta categoría. Si se considera un período de gestación de 18 meses (Domeier, 2012, Domeier & Nasby-Lucas 2013), es probable que las hembras gestantes visiten Isla Guadalupe para alimentarse y mantener el crecimiento óptimo de los embriones, lo que también podría verse favorecido por las aguas cálidas al aumentar la tasa de desarrollo embrionario (Hight

& Lowe, 2007, Robbins 2007). En este sentido, Isla Guadalupe podría ser considerada como un área importante para el ciclo reproductivo de los tiburones blancos en el Pacífico Oriental, aunque su biología reproductiva debe evaluarse a profundidad en próximos estudios (Sulikowski *et al.* 2012, Huveneers *et al.* 2018).

Visibilidad y Marea

Las condiciones de alta visibilidad (> 15 m) favorecieron la probabilidad de ocurrencia de machos juveniles, lo que puede estar relacionado con la capacidad de percibir tiburones más grandes y evadir encuentros bajo situaciones jerárquicas (Becerril-García *et al.* 2019b). En cambio, la baja visibilidad se relacionó con la presencia de tiburones maduros, lo que favorecería el acecho y captura de presas (Pyle *et al.* 1996, Hammerschlag *et al.* 2006). El valor mínimo de visibilidad fue de 9 m, por lo que incluso en estas condiciones fue posible registrar tiburones en superficie (0-3 m). Otros estudios han demostrado que las mareas altas favorecen la disponibilidad de pinnípedos en el agua y, por lo tanto, la frecuencia de intentos de alimentación desde los tiburones blancos hasta las focas (Anderson *et al.* 1996, Klimley *et al.* 1996). Sin embargo, el efecto de la marea sobre los tiburones blancos de la Isla Guadalupe fue diferente, ya que la probabilidad de ocurrencia de tiburones maduros fue mayor durante la marea baja. Esto podría estar relacionado con la baja abundancia de elefantes marinos del norte durante el periodo de estudio y, por lo tanto, la falta de competencia intraespecífica por espacio en costa que podría empujar a elefantes marinos al mar (Anderson *et al.* 1996, Gallo-Reynoso *et al.* 2005). Además de esto, se ha sugerido que la depredación de elefantes marinos y otras presas ocurre en aguas profundas y no en superficie como sucede en sitios de agregación costeros (Skomal *et al.* 2015, Hoyos-Padilla *et al.* 2016). La probabilidad de ocurrencia de hembras inmaduras fue mayor durante la marea alta y en condiciones de baja visibilidad, particularmente en áreas cercanas a colonias reproductoras del lobo fino de Guadalupe *Arctocephalus philippi townsendi* (Gallo-Reynoso *et al.* 2005b, Hoyos-Padilla *et al.* 2016). Esto permitiría sugerir que las hembras inmaduras se benefician de tales condiciones y se alimentan de las crías del lobo fino de Guadalupe, que nacen entre junio-julio y son abundantes en esta costa durante los meses siguientes (Gallo-

Reynoso *et al.* 2005b). Adicionalmente, la intensidad de los ciclos de mareas por efecto de ciertas fases lunares pudo haber influido en la presencia de tiburones blancos, ya que la probabilidad de ocurrencia de machos inmaduros y machos maduros fue mayor durante las lunas nueva y creciente, respectivamente.

Fase Lunar y cobertura de nubes

Aunque el conocimiento sobre el efecto de la luna y las nubes sobre los tiburones blancos es escaso, algunos estudios han buscado inferir la relación entre este factor y la presencia de tiburones (Pyle *et al.*, 1996, Dewar *et al.* 2003, Clarke *et al.* 2011). La luminosidad lunar puede proporcionar las condiciones de luz necesarias para favorecer las estrategias de caza de los tiburones (Dewar *et al.* 2003, Clarke *et al.* 2011). El efecto sobre la presencia de los tiburones persiste durante las horas de luz, debido probablemente a la actividad de sus presas y también, a una jerarquía de territorialidad temporal (Pyle *et al.*, 1996, Dewar *et al.* 2003, Towner *et al.*, 2013).

Durante el periodo de estudio, la probabilidad de ocurrencia de los tiburones maduros fue mayor en los días con cielo despejado y luna creciente. En contraste, los individuos inmaduros eran más propensos a ocurrir durante cielos nublados y después de noches de luna nueva o gibosa. Dado que los juveniles se encuentran cerca de la costa, la luz durante la luna gibosa podría favorecer su visión para capturar presas específicas como peces óseos u otros elasmobranquios, mientras que la depredación de crías de lobo fino podría verse favorecida durante la luna nueva y las mareas altas (Pyle *et al.* 1996, Towner *et al.* 2013, Walther-Mendoza *et al.* 2013). La baja luminosidad podría afectar la visión de las crías de lobo fino, mientras que la marea alta podría reducir el espacio en tierra y motivar el empuje de las crías al mar (Pyle *et al.*, 1996). En el caso de los individuos maduros, la poca luminosidad podría favorecer la depredación de especies que realizan migraciones verticales en ambientes pelágicos como los cefalópodos (Jaime-Rivera *et al.* 2013), lo que explicaría la mayor probabilidad de ocurrencia de tiburones maduros tras noches con luna nueva (Skomal *et al.* 2015, Hoyos-Padilla *et al.* 2016). Estas inferencias se fortalecen con los resultados del tercer capítulo de la presente tesis, el cual, proporciona evidencia sobre la

interacción de calamares con individuos subadultos (en maduración sexual) e individuos maduros en Isla Guadalupe.

Manejo y conservación

Las técnicas no invasivas como el monitoreo visual y la modelación estadística son herramientas útiles para entender la ecología de especies amenazadas como el tiburón blanco. Además del efecto del medio ambiente y las preferencias espaciales, las diferencias observadas en la ocurrencia de tiburones según la hora del día podrían favorecer aspectos específicos del turismo en Isla Guadalupe (Torres-Aguilar *et al.* 2015; Santana-Morales *et al.*, 2021). Se ha sugerido que los tiburones inmaduros podrían presentar una mayor vulnerabilidad a los efectos negativos del turismo como la pérdida de energía, afectaciones en su comportamiento superficial y uso del hábitat (Orams 2000, Cisneros-Montemayor *et al.* 2020). Sin embargo, una de las principales preocupaciones está relacionada con los incidentes recientes que involucran a tiburones inmaduros atrapados en jaulas de buceo (Becerril-García *et al.* 2019b, Tanno 2019). Disminuir la intensidad del cebo durante la mañana (1000-1200 h), así como evitar áreas con mayor probabilidad de aparición de tiburones inmaduros podría favorecer las acciones de manejo; específicamente considerando que la proporción de tiburones inmaduros parece haber aumentado en los últimos años (Santana-Morales *et al.* 2021). Esta propuesta podría fortalecerse mediante el estudio de los movimientos de los tiburones blancos con respecto a las embarcaciones, así como el monitoreo con bases científicas que debe ser mejorado por las autoridades locales ya que las bitácoras actuales son deficientes e impiden el correcto desarrollo de evaluaciones con alto rigor científico.

Las implicaciones para la conservación de los tiburones blancos están relacionadas con la comprensión de las preferencias climáticas de esta especie vulnerable, lo que podría ser considerado en futuras investigaciones que involucren los efectos del cambio climático o eventos de calentamiento como la “Mancha Cálida” (*O Warm Blob*) o El Niño Oscilación del Sur (Cavole *et al.*, 2016, Gálvez *et al.*, 2020). En el futuro se debe realizar una evaluación adecuada que involucre el potencial incremento de la TSM en términos de afectaciones ecológicas y económicas

(Cisneros-Montemayor *et al.*2020), ya que el ecosistema de Isla Guadalupe podría cambiar en próximas décadas, y, por tanto, afectar la disponibilidad de presas para el tiburón blanco. Esto impondría desafíos fisiológicos para la especie en términos alimenticios y reproductivos (Elorriaga-Verplancken *et al.*2016, Gálvez *et al.*2020). En este sentido, sería necesario que el manejo y las acciones de investigación involucren obligatoriamente a las embarcaciones de buceo en jaulas y a la pesca deportiva, ya que en Isla Guadalupe se generan ingresos importantes por parte de empresas nacionales e internacionales que estacionalmente visitan esta zona marina protegida (Becerril-García *et al.* 2019b, Cisneros-Montemayor *et al.*2020).

CAPÍTULO III. INTERACCIONES CON CEFALÓPODOS

Resumen

Las interacciones entre diferentes especies de tiburones y cefalópodos se han documentado en estudios de ecología trófica alrededor del mundo. Sin embargo, hay poca información sobre los encuentros entre tiburones blancos *C. carcharias* y calamares en el Océano Pacífico. En este capítulo, proporcionamos evidencia de interacciones entre tiburones blancos y calamares en las aguas de Isla Guadalupe, México. Mediante el uso de técnicas no invasivas, se registró la presencia de cicatrices de calamares en el cuerpo de los tiburones blancos, principalmente en la cabeza y el tronco, de al menos 14 tiburones registrados durante agosto-diciembre en los años 2008, 2012, 2013, 2017 y 2019. La longitud media de los tiburones blancos analizados fue de 3,7 m (DE \pm 0,6; longitud total), aunque la mayoría de los tiburones con cicatrices eran machos adultos y subadultos (n = 9; 64%). Uno de estos machos fue registrado durante la misma temporada en la que el mismo individuo mostró nuevas cicatrices, lo que confirma que la interacción calamar-tiburón blanco ocurre cerca de Isla Guadalupe. Los resultados de este capítulo destacan la importancia de la zona mesopelágica para los tiburones blancos, así como el uso de hábitat compartido e interacciones tróficas entre calamares y tiburones blancos. Los futuros estudios del ecosistema de Isla Guadalupe deberán considerar a ambas especies para fines de gestión y conservación.

Introducción

Las interacciones entre tiburones y cefalópodos son fundamentales en los ecosistemas costeros y oceánicos (Smale & Cliff, 2010, 2012; Galván-Magaña *et al.*, 2013). Los cefalópodos pueden representar hasta el 98% de la biomasa de la dieta de especies como el tiburón azul *Prionace glauca*, la cornuda común *Sphyrna lewini* (68%) o el zorro pelágico *Alopias pelagicus* (69%), ya que aportan nutrientes en términos de proteínas, carbohidratos y ácidos grasos (Ellis & McCosker, 1991; Galván-Magaña *et al.*, 2013). En algunas especies como el tiburón blanco *C. carcharias*, estudios previos han sugerido que los cefalópodos son un componente importante de su dieta, ya que se han encontrado grandes cantidades de calamares en sus estómagos (Ellis & McCosker, 1991; Smale & Cliff, 2012) y existe evidencia sobre su relevancia en valores isotópicos del músculo de los tiburones (Jaime-Rivera *et al.*, 2014).

En el este del Océano Pacífico Norte, los tiburones blancos tienen patrones migratorios que involucran su presencia en una zona oceánica conocida como *Shared Offshore Foraging Area (SOFA)*, por sus siglas en inglés) de febrero a junio (Boustany *et al.*, 2002; Nasby-Lucas *et al.*, 2009) y en las aguas que rodean Isla Guadalupe de julio a febrero (Domeier & Nasby-Lucas 2008; Nasby-Lucas *et al.*, 2009), con algunos tiburones desplazándose hacia Hawái, la costa de Baja California y el Golfo de California (Galván-Magaña *et al.*, 2010; Domeier, 2012). Aunque los eventos de depredación no han sido documentados, los movimientos verticales de los tiburones blancos han sido sugeridos como un posible comportamiento de alimentación al bucear a profundidades promedio de 442-498 m en el *SOFA* (Nasby-Lucas *et al.*, 2009) y > 300 m en la Isla Guadalupe (Hoyos-Padilla *et al.*, 2016). Ambas localidades, el *SOFA* e Isla Guadalupe han sido sugeridas como áreas con alta diversidad de presas potenciales para el tiburón blanco, en las que se encuentran varias especies de cetáceos, tiburones, peces óseos y cefalópodos (Zeidberg & Robinson, 2007; Domeier & Nasby-Lucas 2008; Nasby-Lucas *et al.*, 2009; Walther-Mendoza *et al.*, 2013; Hoyos-Padilla *et al.*, 2016; Gálvez *et al.*, 2020).

Dentro de la distribución de tiburones blancos en el este del Océano Pacífico Norte, existen áreas importantes para la ocurrencia de grandes especies de calamares como el calamar volador de neón *Ommastrephes bartramii*, el calamar volador morado *Sthenoteuthis oualaniensis*, el calamar *enope* *Ancistrocheirus lesueurii*, el calamar de Humboldt *Dosidicus gigas* y probablemente el calamar gigante *Architeuthis dux* (Gilly *et al.*, 2006; Zeidberg & Robinson, 2007; Galván-Magaña *et al.*, 2010, 2013; Medellín-Ortiz *et al.*, 2016). Sin embargo, la investigación científica se ha centrado principalmente en las actividades pesqueras cercanas a la costa donde se ha reportado una mayor captura de *D. gigas* durante los meses de julio-diciembre; los cuales, coinciden con la temporada de avistamiento de tiburón blanco en Isla Guadalupe (Domeier & Nasby-Lucas, 2008; Hoyos-Padilla *et al.*, 2016; Medellín-Ortiz *et al.*, 2016). No obstante, los estudios que involucran tiburones blancos y calamares son escasos, por lo que no existe información sobre estas interacciones en el este del Pacífico Norte. El objetivo del presente capítulo es proporcionar evidencia de la interacción de calamares grandes y tiburones blancos en Isla Guadalupe para resaltar la importancia del calamar como presa potencial en estadios subadultos y adultos de *C. carcharias*.

Materiales y Método

Se analizaron 2,500 fotografías submarinas de tiburones blancos durante varias expediciones a bordo de los barcos turísticos que visitaron la Rada Norte de Isla Guadalupe durante agosto-diciembre (2008-2019). Los procedimientos para la estimación de talla total, sexo y foto identificación de tiburones blancos fueron seguidos según lo indicado en la sección “Consideraciones metodológicas” de esta tesis, mientras que la determinación de madurez sexual para este capítulo se realizó según lo mencionado por Bruce y Bradford (2012). Las fotografías y videos submarinos fueron analizadas, en los que se observaron cicatrices y marcas inusuales en el cuerpo del tiburón. Estas fotografías se clasificaron según la fecha y los datos biológicos de cada avistamiento de tiburón blanco. En particular, la calidad fotográfica y el ángulo adecuado de algunas fotografías del tiburón WS11, junto con los datos de su tamaño

estimado (longitud total), permitieron estimar la longitud de las cicatrices y el diámetro de las ventosas utilizando el software AxioVision SE64 Rel. 4.9.1.

Resultados

Se detectaron un total de 14 tiburones blancos con cicatrices inusuales en su cuerpo durante agosto-diciembre de los años 2008, 2012, 2013, 2017 y 2019 (Tabla 3; Fig. 18, 19). La LT de los tiburones blancos fue de 3,7 m (DE \pm 0,6), en el que nueve tiburones (64%) eran machos (siete subadultos; dos adultos) y cinco eran hembras (36%; tres subadultos; dos adultos). En cuanto a la madurez sexual, la mayoría de los tiburones blancos observados con cicatrices fueron subadultos (n = 10; 71%), aunque también se observaron adultos (n = 4; 29%).

El tiburón WS11 fue observado por primera vez con una cicatriz en su tronco el 13 de octubre de 2017, la cual fue detectada nuevamente con la misma cicatriz durante su recaptura en agosto y septiembre de 2019. Unas semanas después, este tiburón fue registrado con nuevas cicatrices que se registraron por primera vez. en septiembre, octubre y noviembre (Fig. 18 a, b), lo que indica que esta interacción probablemente ocurrió en la Isla Guadalupe entre el 9 y el 21 de septiembre (Tabla 3; Fig. 20).

Las cicatrices observadas en los tiburones blancos eran de una o dos capas con múltiples marcas de ventosas alrededor de la cabeza del tiburón y en el tronco entre las aletas dorsal y pectoral (Fig. 18). Las heridas cerca de la boca y el tronco del tiburón sugieren una respuesta defensiva del calamar al tiburón blanco, aunque esto no se pudo confirmar. El patrón y la forma de las cicatrices coincide con las ventosas en los brazos y tentáculos de los cefalópodos como se observa en otras especies de tiburones (Papastamatiou *et al.*, 2020). La estimación del diámetro de las marcas de ventosa más evidentes en el tiburón WS11 (Fig. 18a) permitió determinar que la cicatriz del lado izquierdo (\approx 20 cm de largo) tenía ventosas que medían 1-3 cm, mientras que el largo de la cicatriz del lado derecho mide \approx 60 cm de largo. Aunque no se pudo confirmar la especie de cefalópodo, las marcas observadas de todos los tiburones analizados podrían sugerir un encuentro con taxones como el calamar gigante *D. gigas*, el calamar volador de neón *O. bartramii* o el calamar gigante *A. dux* según su

potencial. distribución, longitud de brazos y tentáculos, así como el tamaño estimado de cicatrices y ventosas (Ruiz-Cooley *et al.*, 2006; Zeidberg & Robinson, 2007; Medellín-Ortiz *et al.*, 2016; Papastamatiou *et al.*, 2020).

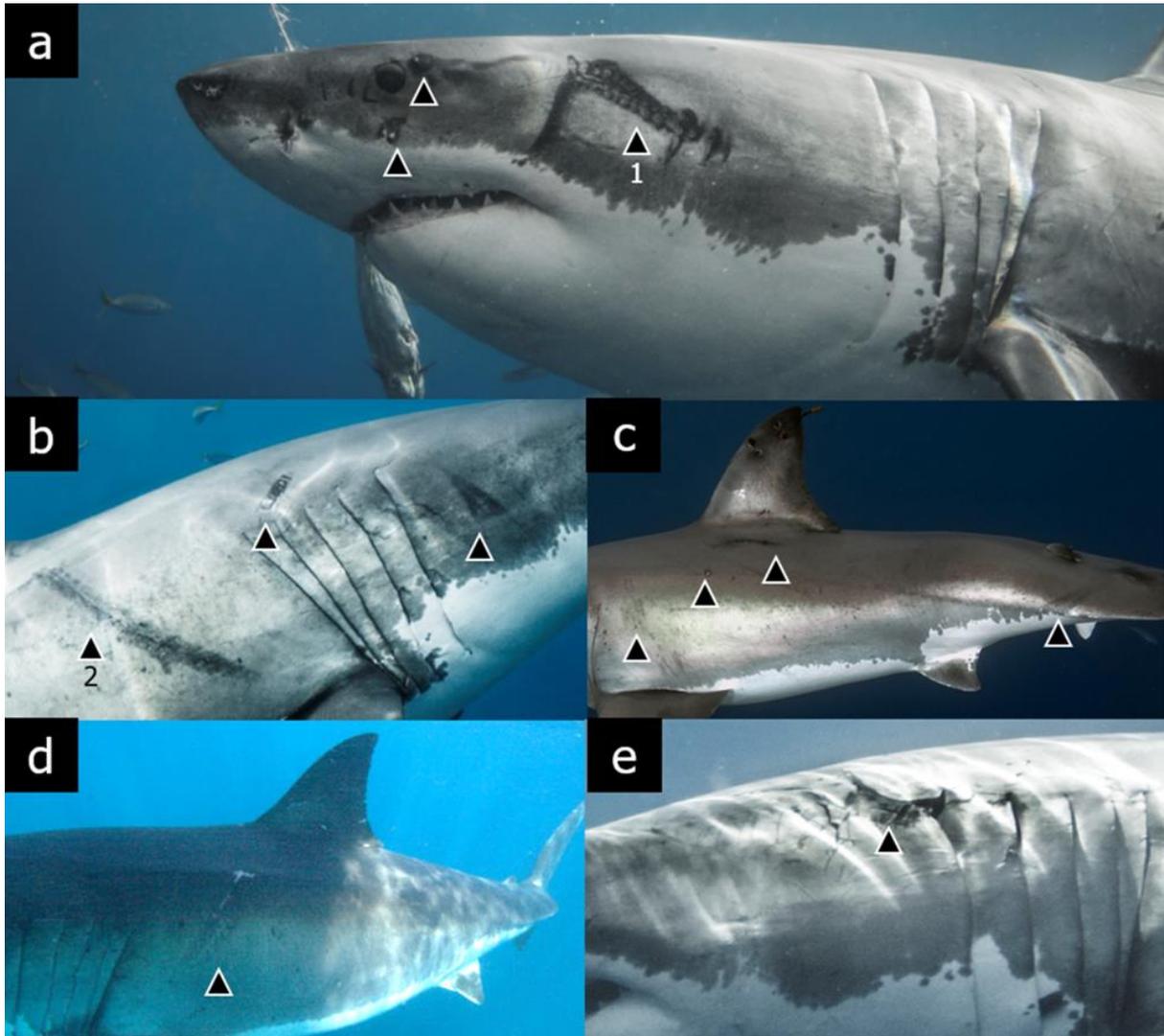


Figura 18. Registros más conspicuos de cicatrices de calamar (▲) sobre individuos de *C. carcharias* en Isla Guadalupe, México (2008-2019). WS11 (a, b); WS12 (c); WS01 (d); WS13 (e). Cicatrices en las que se estimó digitalmente su longitud (1,2).

Tabla 3. Registros de tiburones blancos con cicatrices infligidas por calamares en Isla Guadalupe, México. Longitud total (LT). Misma cicatriz observada después de dos temporadas (*).

Código	Sexo	LT (m)	Madurez	Fecha	Área corporal
WS01	Hembra	4	Subadulto	29/12/2008	Tronco
WS02	Macho	3	Subadulto	18/08/2012	Tronco
WS03	Macho	3	Subadulto	18/08/2012	Cabeza y tronco
WS04	Macho	3.5	Subadulto	05/09/2012	Tronco
WS02	Macho	3	Subadulto	11/09/2012	Cabeza y tronco
WS05	Macho	3.5	Subadulto	22/09/2012	Cabeza y aleta pectoral
WS06	Hembra	3.5	Subadulto	24/10/2012	Tronco
WS07	Macho	3	Subadulto	25/08/2013	Tronco
WS08	Hembra	5	Adulto	13/10/2013	Cabeza
WS09	Macho	4.5	Adulto	30/10/2013	Cabeza
WS10	Macho	3	Subadulto	10/08/2017	Cabeza
WS11	Macho	4	Adulto	13/10/2017	Tronco*
WS12	Hembra	3.5	Subadulto	02/11/2017	Cabeza, tronco, y cola
WS11	Macho	4	Adulto	24/08/2019	Tronco
WS11	Macho	4	Adulto	09/09/2019	Tronco*
WS11	Macho	4	Adulto	21/09/2019	Tronco* y cabeza
WS11	Macho	4	Adulto	16/10/2019	Tronco* y cabeza
WS13	Hembra	4.5	Adulto	09/11/2019	Cabeza
WS11	Macho	4	Adulto	10/11/2019	Tronco* y cabeza
WS14	Macho	3.5	Subadulto	10/11/2019	Tronco

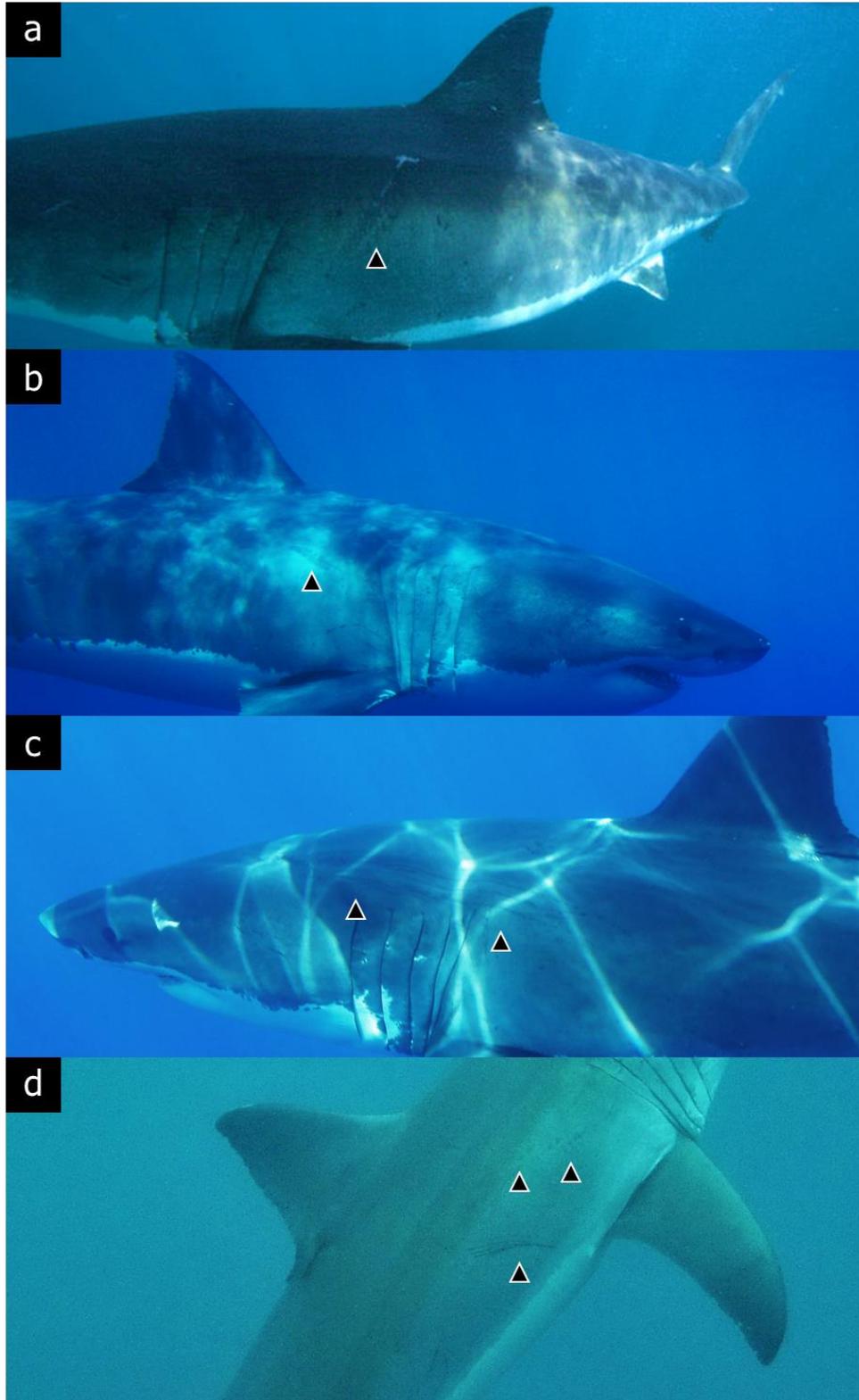


Figura 19. Individuos de *C. carcharias* registrados con cicatrices de calamar (▲) en Isla Guadalupe, México (2008-2019); a) WS01; b) WS02; c) WS03; d) WS04.

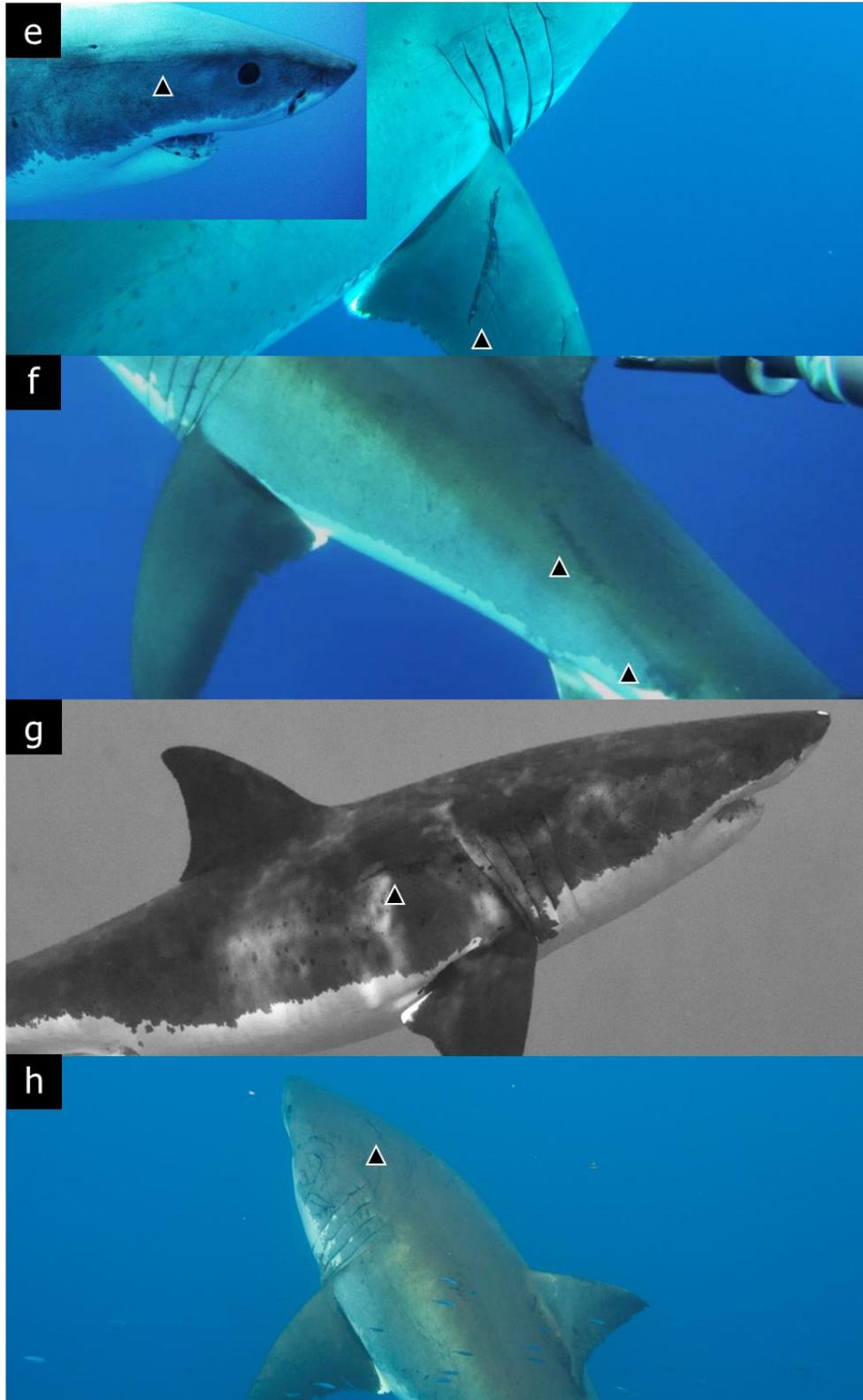


Figura 19. Continuación. Individuos de *C. carcharias* registrados con cicatrices de calamar (▲) en Isla Guadalupe, México (2008-2019); e) WS05; f) WS06; g) WS07; h) WS08.

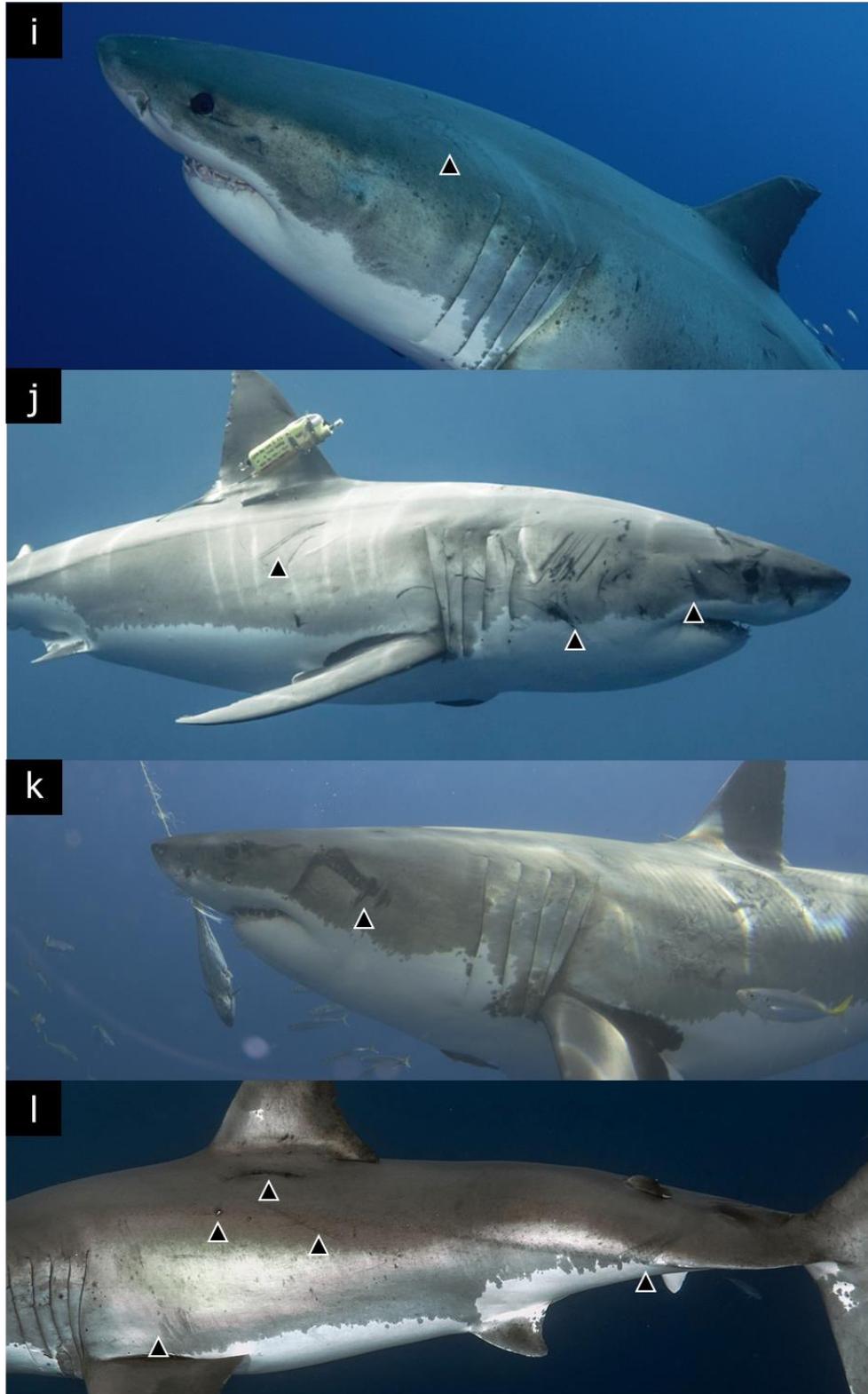


Figura 19. Continuación. Individuos de *C. carcharias* registrados con cicatrices de calamar (▲) en Isla Guadalupe, México (2008-2019); i) WS09; j) WS10; k) WS11; l) WS12.

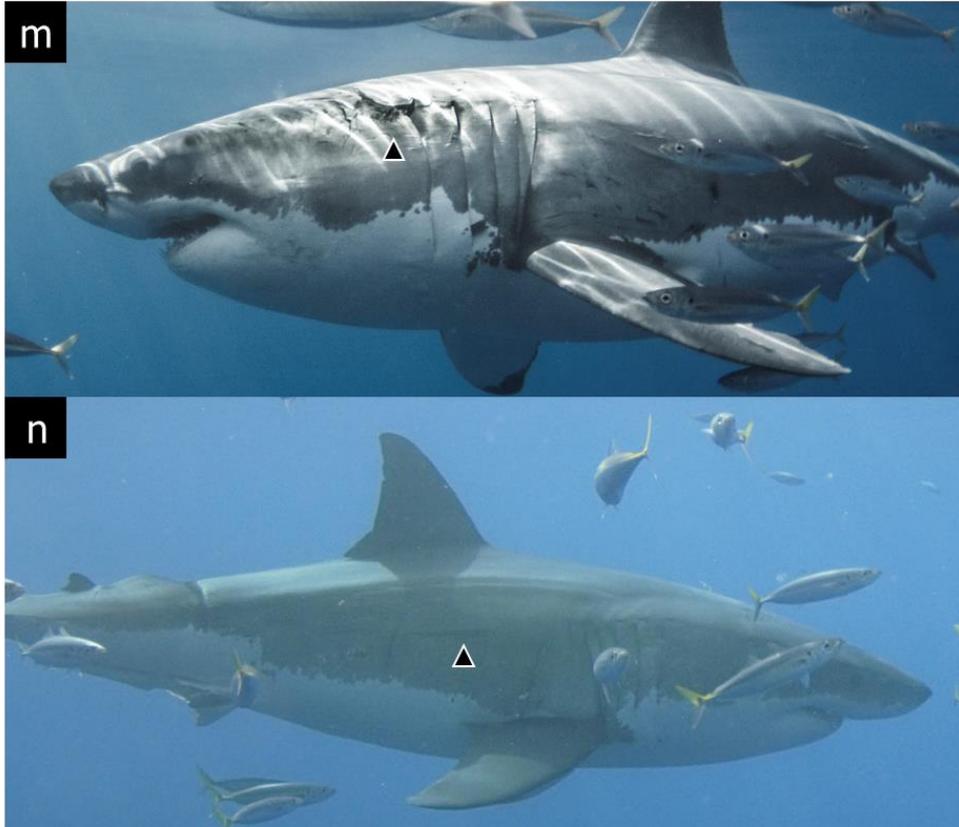


Figura 19. Continuación. Individuos de *C. carcharias* registrados con cicatrices de calamar (▲) en Isla Guadalupe, México (2008-2019); m) WS13; n) WS14.

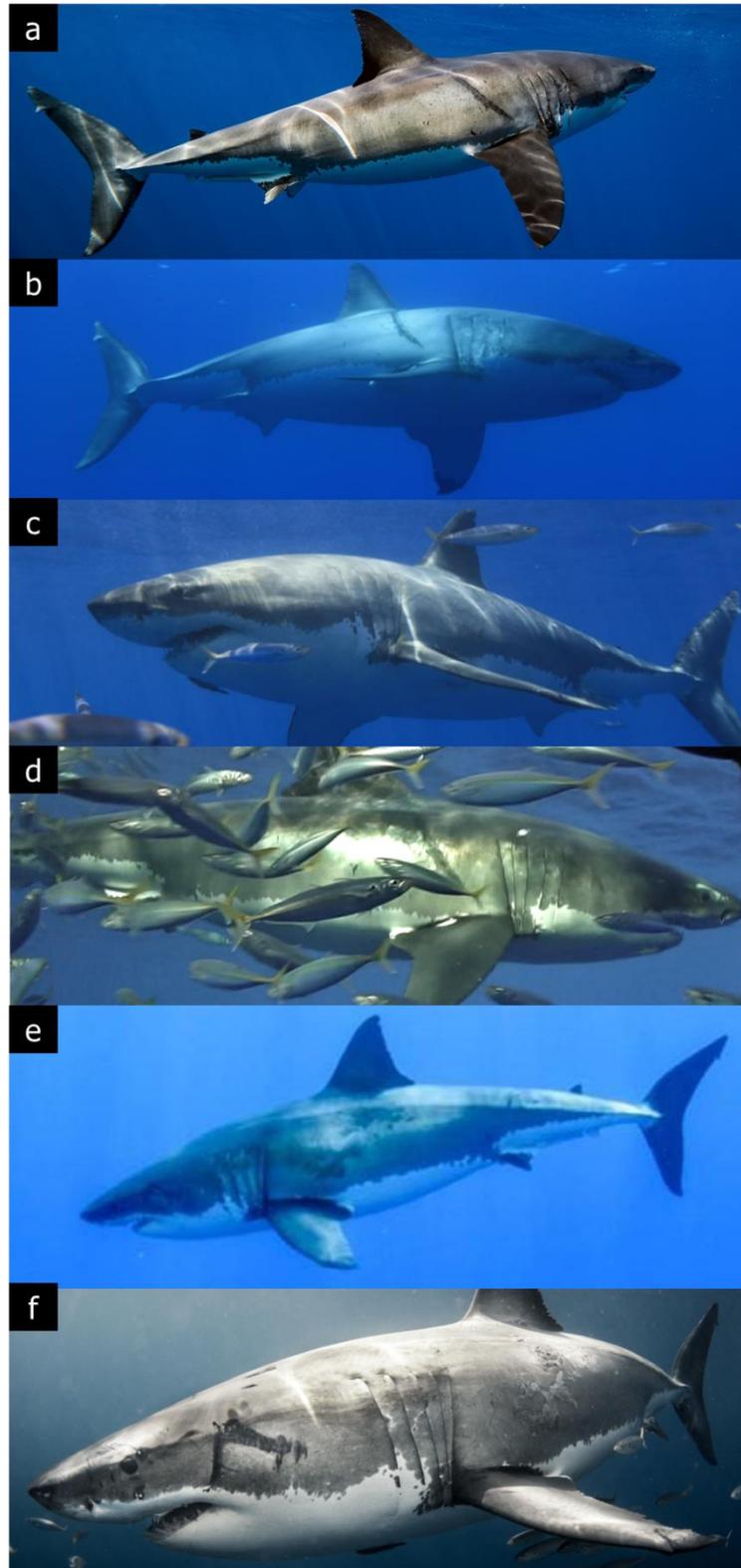


Figura 20. Registros fotográficos del individuo *C. carcharias* WS11 los días: 13 de octubre de 2017 (a); 9 de septiembre de 2019 (b, c); 21 de septiembre de 2019 (d); 16 de octubre de 2019 (e); y 10 de noviembre de 2019 (f) en las aguas que rodean Isla Guadalupe, México.

Discusión

Isla Guadalupe es un sitio relevante para la alimentación y reproducción de tiburones blancos en el Océano Pacífico. La presencia simultánea de pinnípedos, atunes (*Thunnus albacares*), otros elasmobranquios y calamares es un claro indicador de la disponibilidad de presas para el tiburón blanco durante las etapas de subadultos y adultos. Estudios previos que analizaron isótopos estables han evidenciado la contribución de presas como pinnípedos y *D. gigas* en el músculo de tiburones blancos de Isla Guadalupe (Jaime-Rivera *et al.*, 2014). Además, esta especie de calamar también ha sido observada en el estómago de una hembra de 4,6 m (LT) capturada cerca de California, E.U.A. (Ellis & McCosker, 1991). En el presente capítulo, el uso de técnicas no invasivas proporcionó evidencia de interacciones recientes entre tiburones blancos y los cefalópodos. Dichas observaciones resaltan la importancia de la zona mesopelágica para los tiburones blancos en términos de alimentación, ya que los tiburones subadultos y adultos permanecen en aguas profundas por debajo de los 100 m durante el día (Domeier & Nasby-Lucas, 2008), similar a lo registrado en otras zonas pelágicas como el SOFA (Boustany *et al.*, 2002, Nasby-Lucas *et al.*, 2009). Además, el rango de profundidad habitual de las especies probables de cefalópodos durante el día es de 300-600 m para *O. bartramii* (Watanabe *et al.*, 2004) y de 200-300 m para *D. gigas* (Gilly *et al.*, 2006), lo que es consistente con las profundidades de patrullaje reportadas para el tiburón blanco en el área (Nasby-Lucas *et al.*, 2009, Hoyos-Padilla *et al.*, 2016) y que coincide a su vez, con la batimetría de las aguas circundantes de Isla Guadalupe.

Las interacciones de los calamares se han observado ampliamente en otros depredadores marinos como los cachalotes *Physeter macrocephalus* (Roe 1969, Evans *et al.*, 2002). Estas interacciones han sido confirmadas por la presencia de picos de calamar en el estómago de los cachalotes analizados, además de las cicatrices observadas en la cabeza y el cuerpo de estos cetáceos (Roe 1969, Evans *et al.*, 2002). El hecho de que los calamares provoquen estas marcas en los tiburones sugiere un encuentro agresivo entre depredador y presa, en el que las cicatrices defensivas sobresalen en la cabeza, branquias y cuerpo del tiburón blanco. El poder de succión de los brazos y tentáculos de los calamares puede deformar la estructura de los

dentículos dérmicos del tiburón blanco y por ende generar las cicatrices que permitieron inferir dicha interacción (Smith, 1996).

En cuanto a ecología trófica, el consumo de cefalópodos podría ser fundamental en la dieta del tiburón blanco al permitir una rápida digestión y absorción debido a la gran cantidad de proteínas y el bajo contenido de lípidos presentes en este grupo de invertebrados (Galván-Magaña *et al.*, 2013, 2019, Pethybridge *et al.*, 2014, Saito *et al.*, 2014). Además del contenido de proteínas, se ha sugerido que algunas especies de cefalópodos como *D. gigas* contienen altos contenidos de ácidos grasos esenciales para procesos reproductivos tales como la maduración gonadal y el desarrollo embrionario, lo que podría favorecer la espermatogénesis en machos subadultos y adultos, y la gestación en hembras adultas (Rodríguez-Barreto *et al.*, 2012, Pethybridge *et al.*, 2014, Saito *et al.*, 2014, Galván-Magaña *et al.*, 2019). La aportación de nutrientes y otros compuestos de la zona mesopelágica en tiburones blancos se han detectado en estudios recientes (Le Crozier *et al.* 2020), en donde se resalta la importancia de las presas que se distribuyen en dichas capas de agua.

La presencia de cicatrices causadas por calamares en 14 tiburones durante el período de estudio podría parecer un número bajo en comparación con el número estimado de 69-120 tiburones blancos en Isla Guadalupe (Sosa-Nishizaki *et al.*, 2012, Becerril-García *et al.*, 2020). Sin embargo, la presencia de cicatrices podría no ser visible en todos los tiburones blancos que se alimentan de calamares, ya que esto dependerá de la intensidad de la interacción, la efectividad del ataque y el manejo de la presa por parte del tiburón. La frecuencia de estas interacciones y su relevancia en la ecología trófica del tiburón blanco se puede estudiar marcando mediante técnicas de telemetría a tiburones y calamares. Dichos estudios podrían complementarse con análisis de ácidos grasos e isótopos estables de carbono, nitrógeno, oxígeno y de aminoácidos (Ruiz-Cooley *et al.*, 2006, Saito *et al.*, 2014, Galván-Magaña *et al.*, 2019).

Los tiburones blancos de Isla Guadalupe tienen una migración segregada en la que los machos subadultos y adultos ocurren en agosto y las hembras adultas a fines de septiembre (Domeier & Nasby-Lucas 2008, Hoyos-Padilla *et al.*, 2016; Becerril-García *et al.*, 2020-meps-). En este estudio, la mayoría de las cicatrices de calamar se

observaron en tiburones machos subadultos a lo largo de la temporada, lo que sugiere que su llegada a Isla Guadalupe podría estar relacionada con el consumo de calamares y atunes, mientras que los elefantes marinos *M. angustirostris* adultos (que llegan en diciembre) complementarían la dieta de tiburones en un cambio alimenticio relacionado con su madurez (Ellis & McCosker, 1991; Jaime-Rivera *et al.*, 2014; Hoyos-Padilla *et al.*, 2016). Esto enfatiza la importancia del uso del hábitat tanto para tiburones blancos como para calamares, donde los estudios futuros relacionados con la conservación deben incluir los impactos potenciales de la distribución de presas y depredadores, principalmente en términos de cambios oceanográficos relacionados con la temperatura, la productividad y las capas mínimas de oxígeno (Boustany *et al.*, 2002; Gilly *et al.*, 2006; Hoyos-Padilla *et al.*, 2016; Medellín-Ortiz *et al.*, 2016; Galván-Magaña *et al.*, 2019; Gálvez *et al.*, 2020). Este tipo de investigaciones también podrán dilucidar aspectos evolutivos de la interacción entre tiburones y cefalópodos, ya que ambos linajes son antiguos (> 400 millones de años) y su estudio podría aportar información relevante sobre la importancia ecológica de ambos taxones en el intercambio dinámico tanto de materia como energía en los ecosistemas marinos (Boustany *et al.*, 2002; Ruiz-Cooley *et al.*, 2006; Zeidberg & Robinson, 2007; Galván-Magaña *et al.*, 2019).

CAPÍTULO IV. BIOPSIAS DE PIEL (50 mg) COMO MATRIZ BIOLÓGICA PARA EL MONITOREO LC-MS/MS DE HORMONAS ESTEROIDES

Resumen

El presente capítulo incluye información inédita sobre la medición de hormonas esteroideas en piel de elasmobranquios y su aplicación en el monitoreo de especies protegidas como el tiburón blanco *C. carcharias*. La metodología para la extracción líquido-líquido en 50 mg de piel y su análisis vía LC-MS/MS se desarrolló a partir de pruebas realizadas en dos especies modelo de interés pesquero (raya diamante *Hypanus dipterurus* y cazón mamón *M. lunulatus*). Esto permitió generar un panel de siete hormonas esteroideas (E1, E2, T, A4, P4, 17-OHP, F, CORT, y E) en concentraciones ng/mL; lo cual, supera al 90% de los estudios publicados. Estas pruebas proporcionaron información sobre la cantidad mínima de masa a utilizar (50 vs 150 mg) y mostraron que las biopsias de 50 mg tuvieron un mejor desempeño en las cuantificaciones. Se evaluó también la relación entre concentraciones de suero sanguíneo y piel, sin encontrarse relación estadística alguna ($r=-0.22$). Esto permite sugerir que la piel tiene potencial de reflejar periodos fisiológicos relevantes en una ventana de tiempo propuesta de horas a días. Los análisis en *C. carcharias* se realizaron en 19 biopsias recolectadas de diferentes estadios reproductivos en Isla Guadalupe, México. La foto identificación permitió vincular las mediciones con 11 hembras y ocho machos. Los andrógenos solo fueron detectados en machos, mientras que los progestágenos y estrógenos solo se observaron en hembras. Ningún juvenil mostró picos hormonales detectables en piel. Los perfiles incluyeron detecciones mayores al límite de cuantificación en E1, T, y 17-OHP de seis individuos tanto maduros como inmaduros. El límite de detección fue de 0.38-2.77 ng/mL, mientras que el límite de cuantificación fue 1.25-8.80 ng/mL. La precisión mostró un rango de 13.02-19.36, mientras que la recuperación fue de 80-91% según la hormona analizada. Junto con los análisis realizados en las especies comerciales, este capítulo constituye las primeras detecciones hormonales realizadas en piel de cualquier elasmobranquio, la primera detección de cortisol en tiburones, y la primera detección de estrona e hidroxiprogesterona en *C. carcharias*.

Introducción

Generalidades

Las hormonas son biomoléculas secretadas por células especializadas en glándulas endocrinas del cuerpo. Estas sustancias tienen la capacidad de regular funciones clave en órganos como las gónadas, riñones, hígado y otros (Campbell y Farrell, 2012; Idler, 2012). El sistema circulatorio y la sangre es el medio de transporte principal de las hormonas, lo cual, implica su exposición con múltiples células y tejidos. A pesar de esto, las hormonas solo interactúan con aquellas células diana que cuentan con los receptores adecuados para su reconocimiento (Beato et al. 1996, Campbell et al. 2008). Dentro de los diferentes tipos, las hormonas esteroides son clave en los análisis fisiológicos debido a su relevancia en la regulación de estrés, crecimiento, y reproducción. Las hormonas esteroides, incluyendo progestágenos, andrógenos, estrógenos y corticosteroides, participan en la regulación de procesos biológicos mediante retroalimentaciones positivas y negativas (Idler 2012, Melmed et al. 2015).

Las hormonas esteroides reciben su nombre al sintetizarse del colesterol, lo que también explica sus propiedades lipídicas (Beato et al. 1996, Melmed et al. 2015). La esteroidogénesis requiere de varias enzimas para la transformación del colesterol en esteroides específicos (Fig. 21). Este proceso comienza en la mitocondria con la reacción del colesterol y la enzima de escisión de la cadena lateral, las cuales, permiten la síntesis de pregnenolona; la principal precursora de hormonas esteroides (Beato et al. 1996). Posteriormente, la síntesis de hormonas nuevas estará relacionada con la glándula de origen, así como con su interacción con enzimas, otras hormonas, y metabolitos específicos. Al secretarse, las hormonas esteroides son transportadas en la sangre a través de proteínas transportadoras específicas, como la globulina fijadora de hormonas sexuales y la globulina fijadora de corticosteroides. El mecanismo de acción de las hormonas esteroides está ligado a aquellas células diana con los receptores específicos para el reconocimiento de cada hormona (Beato et al. 1996, Melmed et al. 2015).

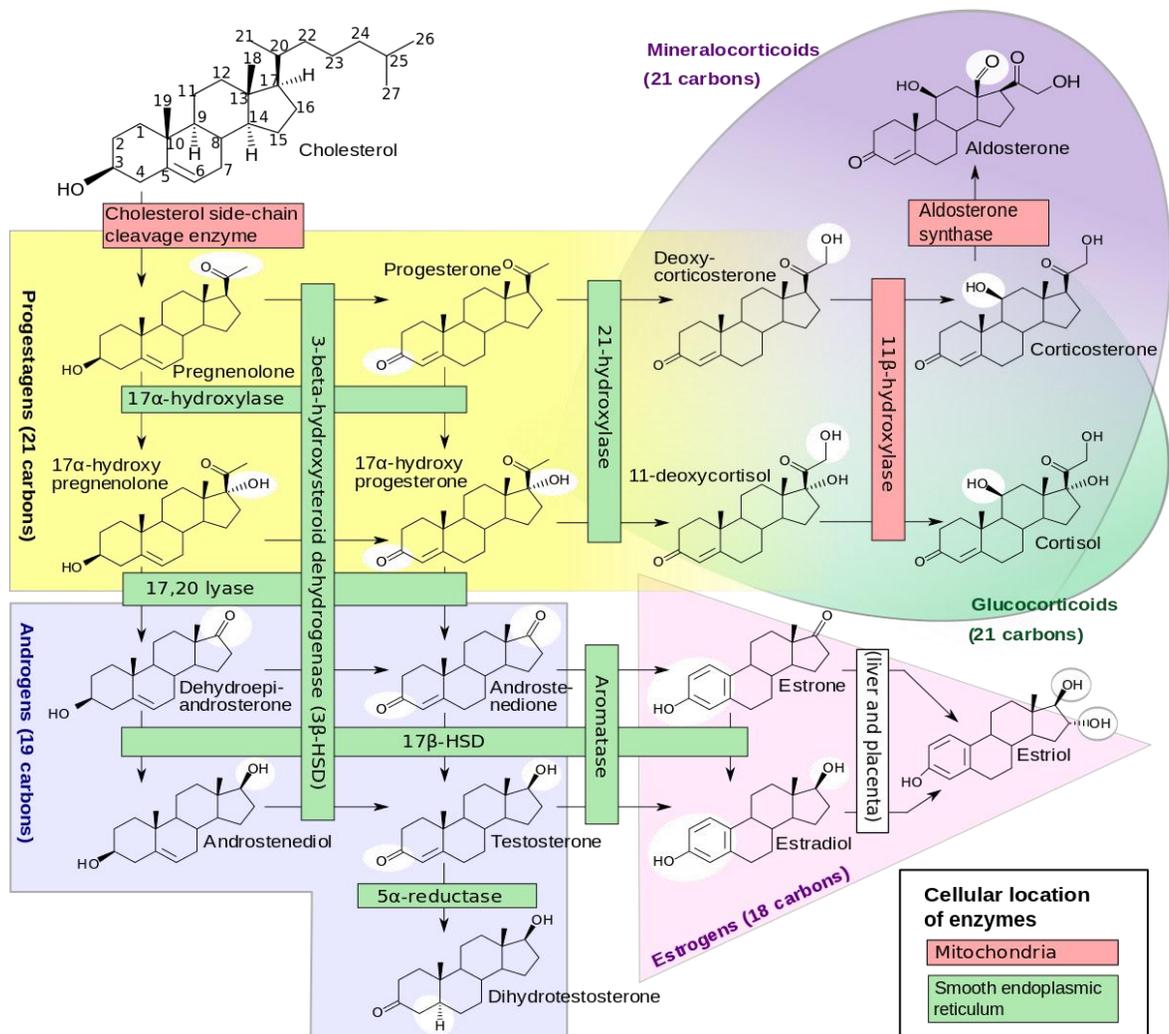


Figura 21. Diagrama general de las rutas en la esteroidogénesis humana como ejemplo de las rutas metabólicas para la síntesis de esteroides en vertebrados (Tomado de: Häggström y Richfield 2014).

A diferencia de las hormonas peptídicas que tienen sus receptores en la membrana de las células diana, las hormonas esteroides interactúan con receptores intracelulares. Debido a su naturaleza lipídica, estas hormonas pasan por difusión a través de la membrana plasmática. Una vez en el citoplasma, se unen a receptores específicos y se dirigen al núcleo de la célula. El complejo hormona-receptor se une a secuencias específicas de ADN para la regulación de ciertos genes y aumenta así, la producción y disponibilidad de las proteínas codificadas (Beato et al. 1996, Melmed et al. 2015).

Investigación en vertebrados y estado del arte en condriictios

Los estudios sobre hormonas esteroides en vertebrados han enfocado sus esfuerzos en conocer el efecto de hormonas específicas como el estradiol (E2), la testosterona (T), y la progesterona (P; Idler 2012). Esto se debe a que dichas sustancias juegan un papel clave en procesos reproductivos como la gametogénesis, la maduración sexual y la gestación en mamíferos, aves, peces óseos y condriictios (Amaral et al. 2010, Awruch 2013, Ramírez-González et al. 2016).

La mayoría de los estudios con vida salvaje se realizan mediante necropsias o con el manejo de individuos en cautiverio. Esto está relacionado en parte, con la naturaleza invasiva - o letal- de los métodos utilizados y a las dificultades de aplicar dichas metodologías en individuos de vida libre (Becerril-García et al. 2020a). Estas limitaciones han contribuido al desconocimiento de la endocrinología de varias especies marinas, incluidos taxones vulnerables como los condriictios (Hammerschlag y Sulikoski 2011, Maruska y Gelsleichter 2011, Awruch 2013).

Los condriictios se caracterizan por un esqueleto cartilaginoso, fertilización interna y ausencia de vejiga natatoria (Compagno et al. 2005). Este grupo incluye a más de 500 especies de tiburones, 630 de rayas y 49 de quimeras, incluyendo especies ovíparas y vivíparas tanto placentarias como aplacentarias (Hamlett 2011; Castro et al. 2016; Weigmann, 2016). La diversidad de estrategias reproductivas en estas especies refleja los diferentes procesos fisiológicos y hormonales que han evolucionado desde hace más de 400 millones de años (Compagno et al. 2005; Maruska y Gelsleichter 2011; Gelsleichter y Evans 2012; Castro et al. 2016).

En tiburones y rayas, el análisis endocrinológico ha brindado información sobre mecanismos fisiológicos durante la maduración sexual, apareamiento, gestación, y alumbramiento (Awruch 2013, Becerril-García et al. 2020a). Dicho entendimiento se sustenta en los estudios (n=59 artículos) realizados a la fecha en al menos 30 especies de elasmobranquios. A pesar de que dichos estudios se hayan realizado en ovíparos y vivíparos, el porcentaje total de especies estudiadas representa menos del 5% de la diversidad global de elasmobranquios (Becerril-García et al. 2020a). La plasticidad biológica observada en este taxón cosmopolita, así como a los inherentes estímulos

ambientales a los que se ve sometido, son factores relevantes que explican el vacío de información que existe en una línea de investigación poco explorada como la endocrinología de condricios (Hamlett 2013). Aunado a la baja cantidad de especies estudiadas, la diversidad de métodos implica un sesgo natural en las comparaciones entre estudios. Actualmente, los esfuerzos globales están poco coordinados y no cuentan con un sistema de estandarización para mejorar las comparaciones entre diferentes especies y regiones (Becerril-García et al. 2020a).

En términos de conservación, el entendimiento de los procesos fisiológicos - como aquellos relacionados con la generación de hormonas esteroides- permite complementar evaluaciones para el manejo ecosistémico (Manire et al. 2007, Bouyoucos et al. 2018, Rangel et al. 2021a,b). Este entendimiento puede resultar relevante en el manejo de los elasmobranquios aprovechados por pesca (Carcharhinidae, Alopiidae, Dasyatidae, Gymnuridae) y/o turismo (Carcharhinidae, Lamnidae, Myliobatidae) en lugares con el interés y la capacidad técnica como México y otros países (Arreguín-Sánchez y Arcos-Huitrón 2011, Ramírez-Amaro et al. 2013, Cisneros-Montemayor et al. 2020).

Panorama y futuras direcciones de investigación

A pesar de los avances obtenidos, el estudio de las hormonas esteroides en la reproducción de condricios puede ser considerado como una línea de investigación reciente, la cual, nace en los años sesenta y tiene un primer auge en la década de los 90's (Fig. 21). Para la detección de las hormonas esteroides se han utilizado métodos analíticos de naturaleza física (cromatografía de gases; líquida), o bioquímica (inmunoensayos), siendo el radioinmunoensayo el método más utilizado a la fecha. A pesar de ello, el mayor número de hormonas se detectó utilizando técnicas de cromatografía líquida con espectrometría de masas (Fig. 21). Los alcances de la técnica permiten una optimización en el uso de biopsias, ya que es posible medir múltiples parámetros a partir de una sola extracción (Lyons y Wynne-Edwards, 2019). Esta es una de las principales ventajas de los métodos físicos ante los inmunoensayos. La matriz biológica utilizada con mayor frecuencia es el plasma sanguíneo, aunque

otras matrices también han sido exploradas, tales como el músculo, gónadas, semen y vitelo (Fig. 22).

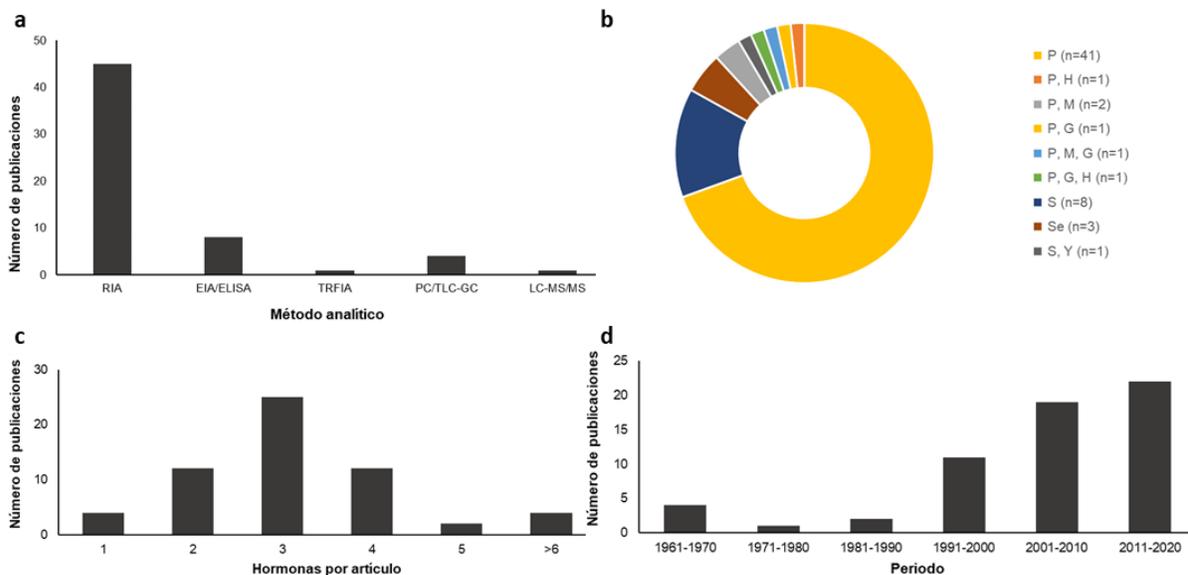


Figura 22. Literatura científica relacionada con el análisis de hormonas esteroides en condriictios durante 1963-2020 (n = 59 artículos). (A) Metodología, (B) matriz biológica, (C) hormonas por artículo y (D) número de artículos según periodo de estudio. Abreviaturas: RIA, radioinmunoensayo; EIA / ELISA, inmunoensayo enzimático o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima; TRFIA, inmunoensayo fluorescente de resolución temporal; PC / TLC-GC, cromatografía en papel o cromatografía en capa fina seguida de cromatografía de gases; LC-MS / MS, cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo e ionización por electro pulverización con monitorización de reacciones múltiples; P, plasma; H, histotrofo; M, músculo; G, gónada; S, suero; Se, Semen; Y, yema de huevo (Tomado de: Becerril-García et al. 2020a).

Los avances tecnológicos en la optimización de métodos analíticos han permitido complementar y estandarizar procedimientos para extraer, detectar y cuantificar hormonas. No obstante, los estudios publicados son escasos y en general, constituyen exploraciones descriptivas. De esta manera, las investigaciones al respecto pueden ser consideradas como una frontera de conocimiento que no ha sido desarrollada como otras disciplinas médico-biológicas (Becerril-García et al. 2020b). En este sentido, los constantes avances tecnológicos, la actualización y optimización de estos estudios pueden favorecer la implementación de nuevas herramientas para el monitoreo y entendimiento de los condriictios y otras especies.

El presente capítulo tuvo el objetivo de desarrollar e implementar un método poco invasivo para el estudio de la fisiología reproductiva del tiburón blanco *C. carcharias*. Su desarrollo se realizó mediante pruebas en las especies comerciales *Mustelus lunulatus* e *Hypanus dipterus* (Ramírez-Amaro et al. 2013; DOF 2018), las cuales, proporcionaron información inédita sobre niveles hormonales en ambos taxones. Los resultados de las pruebas (Anexo I y II) permitieron cumplir la meta principal del capítulo, la cual, fue proporcionar una herramienta alternativa para eficientizar el uso de biopsias de especies protegidas como *C. carcharias*.

Materiales y Método

El análisis de hormonas esteroides en piel del tiburón blanco vía LC-MS/MS se desarrolló a partir de pruebas (precisión/recuperación, supresión de iones, efecto de la matriz biológica y tamaño de la biopsia) realizadas en dos especies de interés pesquero (Anexo I y II). El primer anexo incluye las pruebas realizadas con extracciones en fase sólida y, junto con los resultados de este capítulo, constituyen las primeras detecciones de hormonas esteroides en piel (150 mg) de elasmobranquios.

Las primeras extracciones fueron aceptables en términos de precisión y recuperación para ciertas hormonas (Tabla 7, Anexo I). No obstante, los extractos presentaron sedimentos que interfirieron con el funcionamiento del LC-MS/MS. La presencia de estos precipitados se vinculó con la interacción de los tejidos de elasmobranquio, con las sales del kit QuEChERS y la necesidad de un ajuste en el filtrado.

El conocimiento generado trajo consigo nuevos aspectos a considerar, como la cantidad mínima de materia a utilizar y los procesos a realizar para una extracción compatible con LC-MS/MS. Aunque los problemas de filtración en la extracción de fase sólida no pudieron ser solventados, los resultados sirvieron de base para realizar nuevas pruebas de extracción líquido-líquido según el método implementado por Whittmaack et al. (2022). La cantidad de masa (mg) se definió mediante la comparación de los perfiles hormonales obtenidos en piel de 50 y 150 mg. Los resultados preliminares (Anexo 2) mostraron que las biopsias de 50 mg tuvieron un

mejor rendimiento al superar el control de calidad y proporcionar detecciones hormonales con concentraciones por encima del límite de cuantificación. Estas conclusiones, junto con la necesidad de optimizar el uso de biopsias, motivó el estudio de la piel del tiburón blanco como una matriz biológica para la medición de hormonas esteroides de forma poco invasiva.

Datos biológicos y obtención de muestras

La identificación de los tiburones blancos, así como su estimación de talla, se realizó conforme a las consideraciones metodológicas generales (pág. 43). A partir de investigaciones recientes y los criterios mencionados por Bruce y Bradford (2012), se utilizó la siguiente caracterización para definir el estadio reproductivo de *C. carcharias* en Isla Guadalupe:

Juvenil (151-230 cm). Tiburones que inician procesos fisiológicos relacionados con la maduración sexual. Contempla individuos con tallas mayores que los neonatos, pero menores a las tallas más pequeñas que usualmente son observadas en las aguas circundantes de Isla Guadalupe. El rango considera información de Oñate-González et al. (2017) y el reporte de un macho con gonopterigios semi calcificados en Galván et al. (2010).

Subadulto (Machos: 231-340 cm LT; Hembras: 250-410 cm LT). Tiburones que depredan sobre pinnípedos y cefalópodos en sitios oceánicos de agregación como Isla Guadalupe y el SOFA (Weng et al. 2007; Hoyos-Padilla et al. 2016; Becerril-García et al. 2020b). El rango incluye las tallas mínimas de ambos sexos, usualmente observadas en aguas de Isla Guadalupe según Becerril-García et al. (2019c), así como el registro de un macho maduro en el noroeste de México por Galván et al. (2010) y la talla de madurez sexual para hembras mencionada por Ebert et al. (2020)

Adulto (Machos >340 cm; Hembras > 410 cm). Tiburones que han alcanzado la madurez sexual y que fisiológicamente son capaces de reproducirse (Galván et al. 2010, Ebert et al. 2020).

Las biopsias de tiburón blanco (n=38) y los videos para foto-identificación fueron recabados por el equipo de la UABC, ECOCIMATI A.C., Pelagios-Kakunjá A.C. y

CICIMAR-IPN entre el 15 de octubre y el 20 de noviembre de 2018 (Oficios de autorización de colecta SGPA/DGGVS/004284/18, SGPA/DGGVS/06999/17, y SGPA/DGGVS/06673/17). Dichas instituciones participan desde hace más de una década en el estudio de *C. carcharias* en la Reserva de la Biósfera Isla Guadalupe (Hoyos-Padilla et al. 2016; Santana-Morales et al. 2021).

La intención de probar una nueva herramienta poco invasiva para evaluar niveles hormonales surgió con el fin de complementar este y otros monitoreos de especies protegidas a nivel nacional e internacional. Las biopsias fueron obtenidas mediante un arpón hawaiano con punta modificada y posteriormente almacenadas en un tubo Eppendorf de 2 mL a -20 °C. Al finalizar la temporada en diciembre de 2018, las biopsias fueron trasladadas a *The Institute of Environmental and Human Health (Texas Tech University)* para su resguardo previo a la extracción y análisis de hormonas esteroides (Permiso CITES No. MX 94515).

Extracción líquido-líquido de hormonas esteroides

Se utilizó un método modificado de Whitmaak et al. (2022) para la extracción de muestras de piel (50 mg) de *C. carcharias*. El tejido se colocó en tubos de tipo *Lysing Matrix A* de 2 mL (MP Biomedicals) que contenían una perla de cerámica y arena. Se agregaron 1400 µL de acetonitrilo (A955-4; Optima LC/MS; *Fisher Chemical*) a los tubos antes de agregar las muestras. Luego, los tubos se colocaron en un *FastPrep 24* (FastPrep Instrument, Q-Biogene, CA, EUA) y se homogeneizaron durante ocho rondas durante 45 s a 6.5 m/s. Una vez que se homogeneizó el tejido, los tubos se agitaron en vórtex durante 30 s (mezclador vórtex de velocidad fija; Fisher Scientific) y luego se centrifugaron a 5000 xg durante 5 min (Eppendorf® 5424 R) para separar el sobrenadante del tejido, las perlas, y la arena.

Una vez centrifugado, el sobrenadante se transfirió a tubos de vidrio de borosilicato (Fisherbrand®). Se agregaron 800 µL de acetonitrilo a los tubos de homogeneización y el proceso se repitió tres veces. Se añadieron 2.75 mL de hexano (H303-1; Optima Fisher Scientific) a los tubos de vidrio de borosilicato que contenían el sobrenadante y los tubos se agitaron durante 30 s. Una vez que los dos disolventes

se separaron por densidad, el hexano de la capa superior se eliminó con cuidado y se desechó adecuadamente. Este paso se repitió tres veces para eliminar lípidos. Luego, el sobrenadante restante se incubó a -20 °C durante la noche para solidificar los lípidos restantes. El sobrenadante fue recuperado y evaporado bajo nitrógeno a 30 °C. Todos los tubos se reconstituyeron con 500 µL de metanol de grado LC-MS, se agitaron durante 30 s y permanecieron en sonicación durante 5 min. Posteriormente, las muestras se filtraron a través de filtros giratorios de acetato de celulosa (0.22 µm; Corning® Costar® Spin-X®) y se centrifugaron a 12,000 x g durante 1 min. Una vez filtradas, las muestras se transfirieron a tubos de vidrio de borosilicato limpios. Se agregaron 500 µL adicionales de metanol de grado LC-MS al tubo, se agitó con vórtex durante 30 s, y se filtró para enjuagar cualquier resto de hormona del tubo o la membrana del filtro. El filtrado se transfirió a un tubo de vidrio nuevo y limpio y posteriormente se evaporó a 30 °C. Las muestras se reconstituyeron con 50 µL de estándares hormonales marcados isotópicamente de 50 ppb (Cerilliant, Round Rock, TX, EUA; o Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, WA, EUA). Por último, las muestras se transfirieron a viales *Wheaton* (0.3 mL, 12 x 32 mm; transparentes) y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis de detección.

Detección de hormonas

Control de calidad

Las pautas de control de calidad del Método 539 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) se utilizaron como referencia para los análisis de este capítulo. Según sus directrices, la precisión del método se evalúa mediante la desviación estándar relativa (% RSD) ≤ 20 para todos los analitos y por la eficiencia de extracción (porcentaje de recuperación) que debería encontrarse entre el 70 y el 130 % del valor real. No obstante, es importante señalar que este método de la EPA se estableció para muestras de agua y no tiene en cuenta las interferencias en tejidos orgánicos como los analizados en esta investigación. En este sentido, dicha referencia se utiliza únicamente como punto de comparación para los análisis en matrices biológicas.

Las curvas de calibración se prepararon utilizando los siguientes estándares conocidos: 1, 5, 10, 50, 250 y 500 ppb para todas las hormonas. Para calcular la recuperación de cada hormona, se comparó el promedio del área isotópica de las muestras enriquecidas con el promedio del área isotópica de las muestras no enriquecidas. En cuanto a la precisión, la desviación estándar del área isotópica de las muestras enriquecidas se comparó con el promedio de su área isotópica. El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) se calcularon utilizando un estándar de 1 ppb por hormona. A continuación, el instrumento midió el estándar de siete a diez veces consecutivas con el fin de calcular la desviación estándar de los valores obtenidos.

Análisis LC-MS/MS

Las hormonas se analizaron con un sistema *UPLC Dionex Ultimate 3000* acoplado con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo *TSQ Endura* (Thermo Fisher, Waltham, EUA). Se usó una sonda de ionización por electro pulverización calentada (HESI) para todos los analitos, con excepción de los estrógenos. Los estrógenos se analizaron en una sonda de ionización química a presión atmosférica (APCI) ya que la sensibilidad usando HESI no fue satisfactoria. La separación de los analitos se realizó en una columna C18 (Kinetex®; 2,6 µm C18 100 Å LC Column 50 x 2,1 mm) equipada con una pre-columna C18 (cartuchos SecurityGuard™ ULTRA UHPLC C18 para columnas de 2,1 mm de DI con soporte SecurityGuard™ ULTRA para Columnas UHPLC de 2,1 a 4,6 mm de DI). La columna se mantuvo a 30°C durante el análisis. El volumen de inyección fue de 10 mL por muestra. Los materiales de referencia no etiquetados utilizados para las curvas estándar se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

La separación cromatográfica de T, P4, A4, 17-OHP, F, E y CORT se logró con una sonda HESI en modo de iones positivos. Las fases móviles fueron agua con ácido fórmico (FA) al 0.1 % de grado LC-MS y acetonitrilo FA al 0.1 % de grado LC-MS, con un caudal mantenido de 300 µL/min. La separación de hormonas se realizó con el siguiente programa de gradiente: inicialmente se mantuvo el 5% de acetonitrilo FA al 0.1% durante 4 min, se aumentó al 95% de acetonitrilo FA al 0.1% y se mantuvo

durante los siguientes 4 min. Finalmente, el gradiente se regresó a las condiciones iniciales durante 4 min.

La separación cromatográfica de E2 y E1 se realizó utilizando la sonda APCI en modo ion negativo. Las fases móviles fueron agua de grado LC-MS y metanol de grado LC-MS, y se mantuvo un caudal de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. La separación de hormonas se realizó con el siguiente programa de gradiente: inicialmente se mantuvo el 40 % de metanol durante 2 min y se aumentó al 80 % de metanol durante los siguientes 4.5 min; posteriormente se aumentó al 100 % en los siguientes 2.5 min, y se mantuvo así durante 2.5 min más. Finalmente, el gradiente se devolvió a las condiciones iniciales después de 30 s.

La separación cromatográfica de la A4 se logró con una sonda HESI en modo de iones negativos. Las fases móviles fueron agua de grado LC-MS + acetato de amonio 20 mM y metanol de grado LC-MS con un caudal de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. La separación de hormonas se realizó con el siguiente programa de gradiente: inicialmente se mantuvo el 5 % de metanol durante 3 min y se aumentó al 95 % de metanol durante los siguientes 3 min. Esto se mantuvo durante 3 min antes de aumentar al 100 % de metanol durante los siguientes 2 min. Finalmente, el gradiente se devolvió a las condiciones iniciales durante 1 min.

El análisis de datos y la cuantificación se realizaron con el software *Xcalibur* (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). Se seleccionaron dos transiciones de monitoreo de reacción múltiple para cada analito con fines de cuantificación. Todos los datos de hormonas se evaluaron a través de la proporción de iones, con el fin de que los datos fueran robustos y concisos.

Resultados

El análisis de 50 mg de piel proporcionó un perfil de siete hormonas esteroides vinculadas con la reproducción y regulación del estrés en tiburones. Esto incluye la información de dos estrógenos (E1 y E2), dos andrógenos (A4, T), dos progestágenos (P4, 17-OHP) y dos glucocorticoides (F, CORT) en las tres especies analizadas en este capítulo. Según la hormona analizada, el límite de detección presentó un rango de 0.38-2.77 ng/mL, mientras que el rango del límite de cuantificación fue de 1.25-8.80 ng/mL. Los límites mínimos se observaron en A4 y los máximos en E2 (Tabla 4).

Tabla 4. Límites de detección (ng/mL) y cuantificación (ng/mL) de las hormonas analizadas en piel de *C. carcharias* vía extracción líquido-líquido y LC-MS/MS.

Hormona	Límite de detección	Límite de cuantificación
Estrona (E1)	0.62	1.98
Estradiol (E2)	2.77	8.80
Androstenediona (A4)	0.38	1.25
Testosterona (T)	0.54	1.80
Progesterona (P4)	0.40	1.34
Hidroxyprogesterona (17-OHP)	0.74	2.46
Cortisol (F)	1.15	3.83
Estrona (E1)	0.84	2.8

Los valores de precisión expresados en términos de desviación estándar relativa, así como el porcentaje de recuperación según la hormona analizada se muestran en la Tabla 6. La precisión tuvo un rango de 13.02-19.36, cumpliendo así con un error aceptable de acuerdo con la *EPA*. Los valores de recuperación según la hormona fueron de 80-91% (Tabla 5, Fig. 24). Todas las mediciones reflejaron valores favorables con respecto al control de calidad ejercido en el estudio, incluyendo valores aceptables a óptimos en términos de precisión (Fig. 23) y eficiencias de extracción (Fig. 24).

Las biopsias de piel (50 mg) proporcionaron perfiles de siete hormonas esteroides en 19 tiburones blancos (Tabla 6). El proceso de foto identificación y la determinación del sexo permitió vincular estos perfiles con 11 hembras (tres adultos, cinco subadultos, dos juveniles y uno sin identificar) y ocho machos (cuatro adultos, dos subadultos y dos juveniles). Estos perfiles incluyeron detecciones mayores al límite

de cuantificación en las hormonas E1, T, y 17-OHP en seis individuos (cuatro hembras y dos machos) tanto maduros como inmaduros.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación de hormonas esteroides extraídas de 50 mg de piel de *C. carcharias* y valores de precisión expresados en desviación estándar relativa. SD= Sin datos.

Hormona (abreviación)	Precisión	Recuperación
Estrona (E1)	SD	SD
Estradiol (E2)	SD	SD
Androstenediona (A4)	13.02	88%
Testosterona (T)	18.09	89%
Progesterona (P4)	19.36	80%
Hidroxyprogesterona (17-OHP)	15.97	91%
Cortisol (F)	15.76	81%

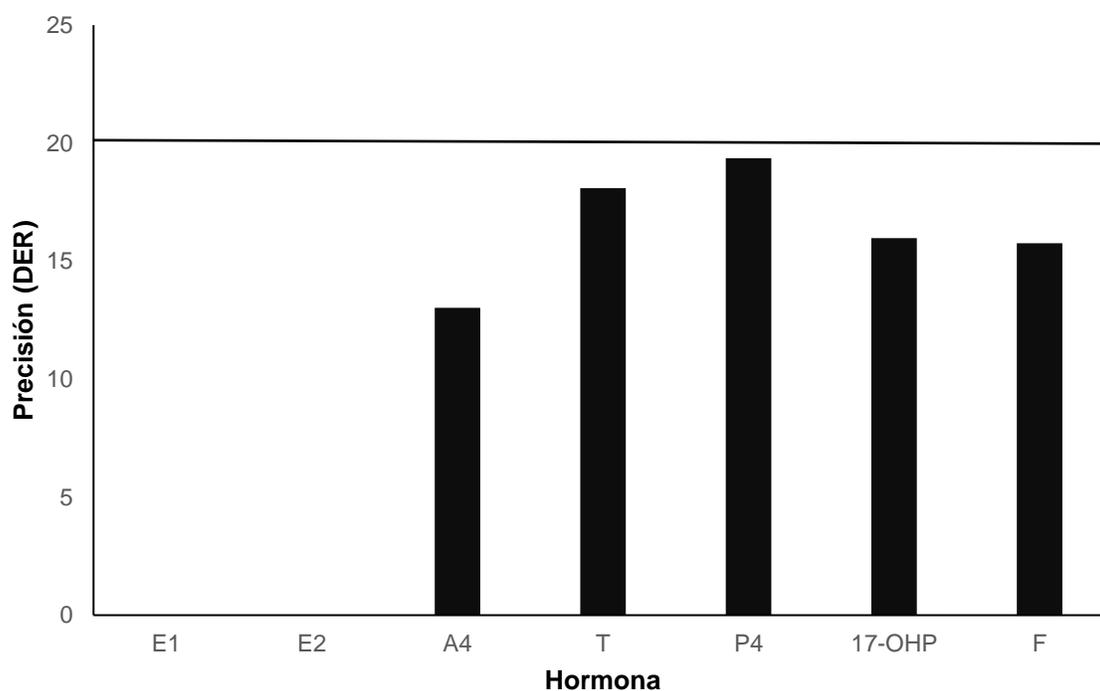


Figura 23. Valores de precisión en términos de desviación estándar relativa (DER) en la medición de siete hormonas esteroides de piel de *C. carcharias*. Línea marca el valor de precisión mínimo según los criterios del Método 539 EPA.

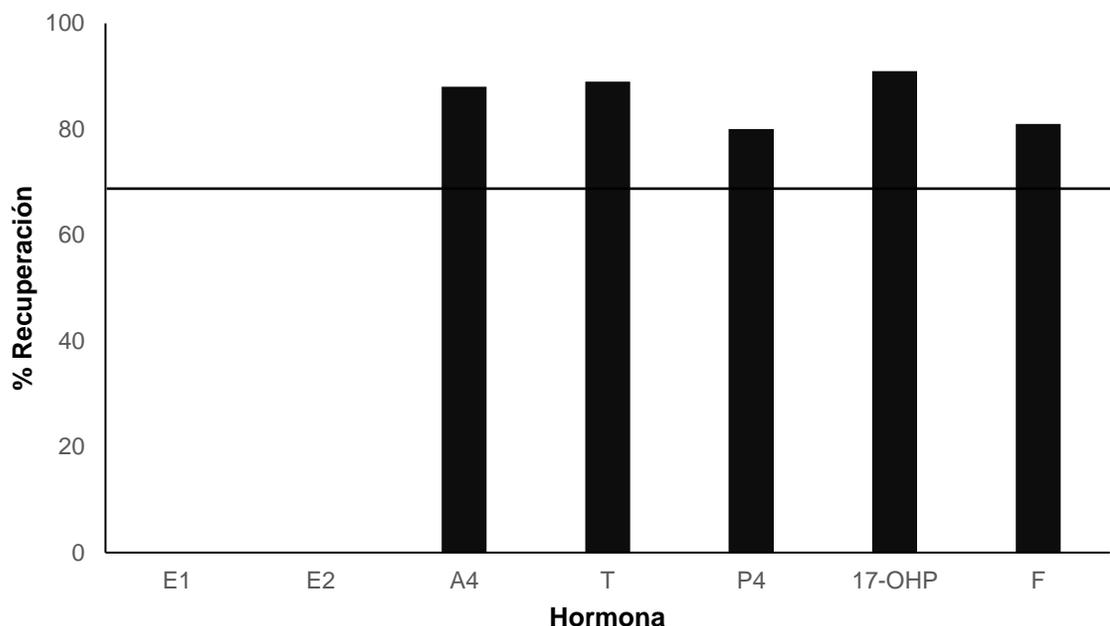


Figura 24. Porcentaje de recuperación de siete hormonas esteroides extraídas de 50 mg de piel de *C. carcharias*. Línea marca el % mínimo según los criterios del Método 539 EPA.

Las detecciones de andrógenos solo fueron observadas en machos, mientras que los progestágenos y estrógenos solo se observaron en hembras. Ninguno de los tiburones juveniles mostró picos hormonales en piel. Lo mismo sucedió con los picos hormonales de E2, A4, P4 y F, los cuales no fueron encontrados en ninguna de las biopsias analizadas. De las 171 mediciones reportadas en el panel de perfiles hormonales (Tabla 6), el 96% (n=165) evidenciaron la ausencia de hormonas esteroides.

El estrógeno E1 se detectó en la piel de tres hembras: dos adultas y una subadulta dentro de un rango de 3.5-5.4 ng/mL (Tabla 6). Estos individuos presentaron cicatrices de mordidas de otros tiburones cerca de las hendiduras branquiales y las aletas pectorales (Fig. 25a,b,c). El progestágeno 17-OHP se detectó en una hembra subadulta con una concentración de 8.3 ng/mL y cicatrices en la cabeza posiblemente ocasionadas por cefalópodos (Tabla 6, Fig. 25d). Las detecciones de T fueron las más altas en el panel hormonal analizado y se encontraron en un individuo adulto (83.3 ng/mL, Fig. 25e) y otro subadulto (71.6 ng/mL; Fig. 25f).

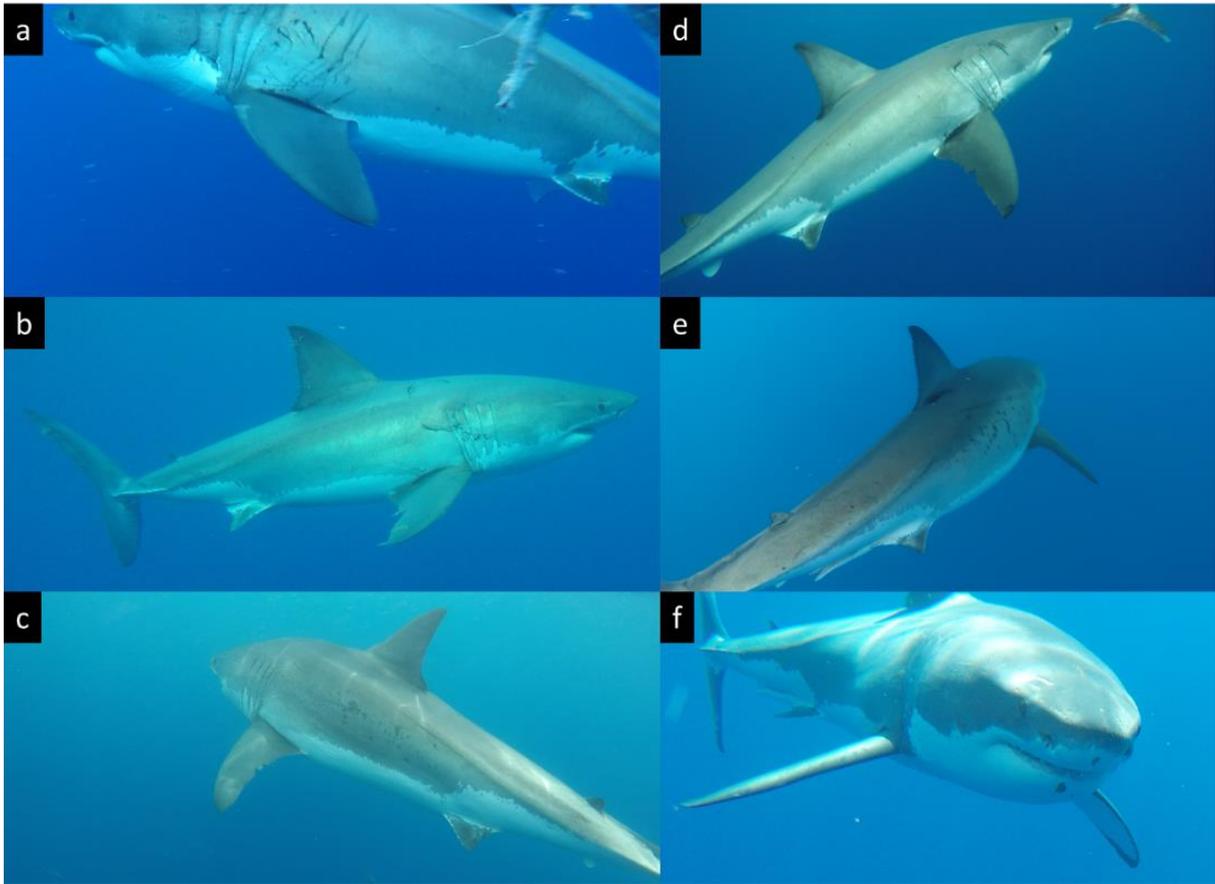


Figura 25. Tiburones blancos con detecciones de picos hormonales en 50 mg de piel analizada vía LC-MS/MS: a. TB4 (hembra, 450 cm LT, estrona); b. TB15 (hembra, 350 cm LT, estrona); c. TB16 (hembra, 600 cm LT, estrona); d. TB14 (hembra, 350 cm, 17- hidroxiprogesterona); e. TB2 (macho, 400 cm LT, testosterona); f. TB7 (macho, 250 cm LT, testosterona).

Tabla 6. Tabla 6. Perfiles hormonales de los individuos analizados de *Carcharodon carcharias* (n=20) provenientes de Isla Guadalupe, Baja California, vía extracción líquido-líquido en biopsias de piel (50 mg) y LC-MS/M, con información sobre su sexo (M=Macho; H= Hembra), estadio reproductivo, y concentración de hormonas en ng/mL (E2=estradiol; T= testosterona; P4= progesterona; CORT= corticosterona; E1= estrona; A4= androstenediona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol; E= cortisona). Valor entre paréntesis indica una detección por debajo del límite de cuantificación. NE= No encontrada.

Código	Fecha	Sexo	LT	Estadio	E1	E2	A4	T	P4	17-OHP	F
TB1	27-oct-18	M	375	Adulto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB2	29-oct-18	M	400	Adulto	NE	NE	NE	83.3173145	NE	NE	NE
TB3	06-nov-18	M	400	Adulto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB4	29-oct-18	H	450	Adulto	5.37069634	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB5	25-oct-18	H	Sin datos	Sin datos	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB6	03-nov-18	M	200	Juvenil	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB7	04-nov-18	M	250	Subadulto	NE	NE	NE	71.6558873	NE	NE	NE
TB8	27-oct-18	M	200	Juvenil	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB9	27-oct-18	H	200	Juvenil	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB10	20-nov-18	H	220	Juvenil	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB11	15-oct-18	H	420	Adulto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB12	25-oct-18	H	400	Subadulto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB13	29-oct-18	H	375	Subadulto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB14	06-nov-18	H	350	Subadulto	NE	NE	NE	NE	NE	8.337	NE
TB15	06-nov-18	H	350	Subadulto	(1.906)	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB16	28-oct-18	H	600	Adulto	3.528	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB17	04-nov-18	H	300	Subadulto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB18	04-nov-18	M	350	Adulto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TB19	04-nov-18	M	300	Subadulto	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

Discusión

La dermis de elasmobranquio es una matriz biológica en donde es posible evidenciar picos hormonales en biopsias tan pequeñas como 50 mg. Esto se vio reflejado en los resultados de las pruebas en especies comerciales y en la piel de *C. carcharias*. En esta especie fue posible obtener un panel con información sobre presencia/ausencia de siete hormonas esteroides, a partir de las biopsias obtenidas durante monitoreos poco invasivos. La metodología de mínima invasión implementada en este capítulo puede ser replicada y optimizada para el monitoreo de la fisiología reproductiva en poblaciones de condriictios (Hammerschlag y Sulikowsky 2011).

El método propuesto redujo la cantidad de materia necesaria en un 97.5%, y generó más del doble de información en términos del número de hormonas al compararlo con otros estudios en elasmobranquios (Prohaska et al. 2013 ab, Verkamp et al. 2021). En las investigaciones publicada hasta 2020, la media del número de hormonas analizadas por estudio era 3.3 (Becerril-García et al. 2020); por lo que se superó substancialmente una de las metas de la tesis. La media observada en otros estudios se vinculó con el uso de inmunoensayos y biopsias de aproximadamente 2,000-5,000 mg que permitieron analizar de 1-3 hormonas según el método en otras especies, incluyendo a tiburones blancos del Atlántico (Verkamp et al. 2021).

Los resultados de las especies analizadas constituyen, junto con el trabajo de Lyons y Wynne-Edwards (2019), los primeros estudios en aprovechar las ventajas del uso de LC-MS/MS (Becerril-García et al. 2020a). Las concentraciones observadas y el control de calidad implementado permiten comparaciones factibles en estudios futuros. Adicionalmente, otorga niveles altos de precisión al cuantificar estrógenos, progestágenos, andrógenos y glucocorticoides con una precisión cercana a 1 ng/mL. De esta manera, se proporciona una alternativa poco invasiva para el monitoreo de fauna amenazada incluyendo a tiburones y rayas (Hammerschlag y Sulikowsky 2011, Dulvy et al. 2021).

La ausencia de esteroides en juveniles, así como la detección de picos de andrógenos en machos y estrógenos/progestágenos en hembras sugieren que 50 mg

de piel son suficientes para monitorear el estado reproductivo y estrés de los tiburones blancos en Isla Guadalupe (Hammerschlag y Sulikowsky 2011, Verkamp et al. 2021). A diferencia de las detecciones de cortisol en especies comerciales (Anexo I y II), los tiburones blancos no mostraron señales de esta hormona en su piel. Es probable que esto sea indicador de buena salud en términos generales (Skomal y Bernal, 2010), aunque la medición de otras hormonas como la corticosterona, cortisona y sobre todo 1α -hidroxcorticosterona podrían complementar significativamente los perfiles obtenidos (Lyons y Wynne-Edwards 2019, Ruiz-Jarabo et al. 2019). Adicionalmente, es probable que los niveles de glucocorticoides observados en *H. dipterus* y *M. lunulatus* (Anexo I y II) estén relacionados. Los niveles de estrés podrían variar según la disponibilidad de alimento, interacción con depredadores y competidores, así como su propio estadio reproductivo (Awruch et al. 2013, Becerril-García et al. 2020, Towner et al. 2022).

La presencia de hormonas en la piel podría ser indicio de un proceso de excreción natural, posterior a flujos hormonales intensos dentro de los procesos reproductivos y retroalimentaciones hormonales de un individuo (Becerril-García et al. 2020a). Conocer y caracterizar el transporte de las hormonas hacia otros tejidos, sobre todo en tiempos de permanencia y su ventana de tiempo, es fundamental para construir argumentos sólidos. Esto se puede lograr a partir de marcadores y observaciones con animales en cautiverio, sobre todo aquellos que han regulado sus ciclos reproductivos y que proporcionan información clave sobre la biología reproductiva de este grupo taxonómico (Chapman et al. 2007, Feldheim et al. 2010, Henningsen et al. 2017).

Las hormonas excretadas podrían influenciar el olor y rastro de los tiburones blancos y otros condriactos (Johnson y Nelson 1978, Heuter et al. 2004). A reserva de las pruebas que confirmen o refuten este razonamiento, la comunicación química entre tiburones incluiría la detección de hormonas esteroides en otros individuos a través de su olor y la presencia de partículas químicas en el agua, tal y como sucede con la detección de presas estresadas mediante el olfato (Tester 1963 a,b, Strong et al. 1992, 1996). Esta comunicación química resultaría esencial durante sus migraciones y

agregaciones estacionales como sucede en las aguas circundantes de Isla Guadalupe (Hoyos-Padilla et al. 2016). La ventana de tiempo reflejada por la piel en el tema hormonal es incierta, y puede depender de la concentración sistémica de las hormonas, su interacción con otras sustancias, y el propio tiempo de replicación dérmica de cada individuo (Heuter et al. 2004; Awruch et al. 2013, Becerril-García et al. 2020a, Dillon et al. 2022).

En conjunto con las señales químicas de las heces y los desechos metabólicos de las branquias, el olor de la piel por influencia de picos de esteroides y derivados, podrían brindar información entre individuos con altas capacidades sensoriales como son los tiburones blancos (Northcutt 1978, Strong et al. 1992, 1996, Desmki y Northcutt 1996). Esto sería de particular relevancia para la detección de tiburones del mismo o diferente sexo, bajo la consideración de que sus concentraciones son variables según el estadio reproductivo (Johnson y Nelson 1978). Un análisis anatómico profundo junto con la consideración del estudio de receptores esclarecería el tema de la atracción por el olfato; el cual, representaría una de las fronteras en el estudio de feromonas en tiburones, rayas y quimeras (Heuter et al. 2004).

El corto periodo transcurrido entre la toma de biopsias (28 octubre-6 de noviembre), las pocas detecciones (n=6), y la falta de recapturas, fueron factores que no permitieron el análisis temporal de las concentraciones en aguas de Isla Guadalupe. Considerar la ampliación del periodo de muestreo incrementa el número de días de observación y, naturalmente, la probabilidad para la captura -y recaptura- de las unidades utilizadas en un análisis; ya sea en términos de biopsias, fotos, presencias y/o ausencias, etc. (Becerril-García et al. 2020f; Petatán-Ramírez et al. 2019). Independientemente, el alcance de futuras investigaciones se vería beneficiado a raíz de estudios de línea base con especies de elasmobranquios que actualmente se reproduzcan en cautiverio.

Conclusión

Las biopsias de piel de 50 mg son útiles para el monitoreo del estado reproductivo y estrés en tiburones. La metodología implementada en tiburones blancos de Isla Guadalupe proporcionó perfiles hormonales de siete hormonas en 19 tiburones analizados. Estos resultados junto con las detecciones en especies comerciales (Anexo I y II) constituyen la primera detección de hormonas en piel de elasmobranquios y las primeras cuantificaciones de cortisol en tiburones. Adicionalmente, el método propuesto optimiza la cantidad de muestra en un 97%, lo que pone en evidencia las ventajas y factibilidad de la extracción líquido-líquido y análisis LC-MS/MS para vida salvaje amenazada. Ante la evidencia obtenida, se propone que las hormonas en la piel del tiburón blanco podrían ser detectadas por otros tiburones. Esto tendría implicaciones en estudios de comunicación química y reconocimiento entre individuos principalmente durante sus agregaciones alimenticias y reproductivas. La optimización mediante estudios de línea base en condiciones controladas permitirá mejorar este método con el fin de generar inferencias sólidas en torno al fortalecimiento de monitoreos alrededor del mundo.

RECOMENDACIONES

- Optimizar el método de medición y cuantificación de hormonas en matrices como la piel, el músculo, o el mucus de la piel de los elasmobranquios con el fin de prevenir impactos y eficientizar el uso de las biopsias obtenidas.
- Utilizar, mejorar y actualizar la caracterización del estadio reproductivo propuesta para *C. carcharias* en aguas de Isla Guadalupe (Materiales y Método, Capítulo IV).
- Considerar la implementación de un monitoreo bioquímico para evaluar la reproducción y estrés del tiburón blanco y otras especies mediante el análisis de hormonas esteroides en biopsias de piel.
- Realizar estudios de línea base en sobre los niveles hormonales en los tejidos de especies modelo de tiburones y rayas bajo condiciones controladas de luz y temperatura.
- Conocer el tiempo de permanencia y mecanismos de transporte de las hormonas esteroides en tejidos de elasmobranquios, con el fin de optimizar su uso como herramienta para un monitoreo bioquímico.
- Investigar el efecto de la alimentación en la generación de hormonas esteroides en elasmobranquios bajo condiciones controladas de luz y temperatura.
- Promover la colaboración global entre laboratorios para la optimización y estandarización de la investigación sobre el efecto y función de las hormonas en condricios, así como su aplicación en el entendimiento de la fisiología humana.

ANEXO I. DESARROLLO DEL MÉTODO. Extracción en fase sólida y LC-MS/MS en de piel, músculo, hígado, gónadas y suero sanguíneo de *H. dipterurus* y *M. lunulatus*

Introducción

El método para analizar hormonas esteroideas en piel de *C. carcharias* se desarrolló a partir de pruebas realizadas en cinco tejidos (piel, músculo, hígado, gónada, y suero sanguíneo) de dos especies de elasmobranquios comerciales. El análisis de estos especímenes permitió la identificación del sexo y su estadio reproductivo. En este anexo se reportan los resultados de las extracciones en fase sólida mediante el uso de un kit QuEChERS –(acrónimo en inglés para *Quick, Easy, Cheap, Effective, and Safe*). Este kit ha demostrado su practicidad para el análisis de pesticidas y hormonas en muestras tanto marinas como terrestres (Munaretto et al. 2013, Camilleri y Vulliet 2015, Oliveira et al. 2018, Shen et al. 2021). Por lo tanto, fue probado como una primera alternativa para extraer hormonas de diferentes tejidos de elasmobranquios.

Objetivo general

Conocer la viabilidad de la extracción en fase sólida vía kit QuEChERS para el análisis LC-MS/MS de hormonas esteroideas en piel, músculo, hígado y gónadas de dos especies de elasmobranquios (*H. dipterurus* y *M. lunulatus*).

Objetivos particulares

- Conocer el límite de detección y cuantificación de hormonas esteroideas extraídas vía QuEChERS.
- Conocer los porcentajes de extracción y valores de precisión para cada hormona y tejido analizado.
- Obtener perfiles hormonales (> 3 esteroideas) a partir de 150 mg de piel, músculo, hígado y gónada de individuos de diferentes estadios reproductivos de *H. dipterurus* y *M. lunulatus*.
- Determinar las concentraciones hormonales en suero sanguíneo de individuos de *H. dipterurus* y *M. lunulatus* para utilizar sus valores como referencia en otros tejidos.

Materiales y Método

Obtención de biopsias de especies comerciales

En abril de 2018 se obtuvieron ejemplares de las especies *Mustelus lunulatus* (n=7) e *Hypanus dipterurus* (n=21) en las localidades mexicanas de Punta Lobos (23.4625 N; -110.2852 W) y Bahía de La Paz (24.1926 N;-110,3704 W), ambas en el estado de Baja California Sur. El sexo de los individuos se definió según la presencia de gonopterigios en machos y la ausencia de dichas estructuras en hembras (Compagno et al. 2005). La madurez sexual de los machos se determinó de acuerdo con la calcificación, rotación y apertura del rifiodón en gonopterigios, así como con la presencia de semen en dicha estructura. En el caso de las hembras, estas fueron consideradas sexualmente maduras al observarse conductos reproductivos desarrollados, cicatrices de apareamiento y cápsulas o embriones en el caso de las hembras preñadas. De cada espécimen, se obtuvo una muestra de 6 mL de sangre mediante venopunción cardíaca utilizando una jeringa esterilizada y un tubo de suero BD Vacutainer (Ref. 367820).

Posteriormente, se obtuvieron 1-2 g de hígado, gónada, músculo y piel utilizando un bisturí esterilizado y tubos Eppendorf para cada tejido. Todas las muestras fueron transportadas en hielo al Centro Interdisciplinario de Ciencias del Mar (CICIMAR-IPN) en La Paz, México. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 15 min (1500 rpm/19 °C) para la obtención de suero, el cual, se almacenó en criotubos a -80 °C junto con el resto de los tejidos. Todas las muestras fueron transportadas para el desarrollo de la metodología a *The Institute of Environmental and Human Health (Texas Tech University)*, en Lubbock, EUA, donde se realizó una estancia de investigación.

Extracción de hormonas

Valores de referencia en suero sanguíneo

La extracción de hormonas en muestras de suero sanguíneo se realizó mediante una extracción líquido-líquido utilizando 2mL de suero en un tubo de vidrio de borosilicato. Además, siete duplicados se enriquecieron con 50 mL de 50 ppb de hormona estándar marcada isotópicamente para la determinación del control de calidad. Todas las muestras no enriquecidas y enriquecidas se efluyeron utilizando al menos 8 mL de éter dietílico como

disolvente de lavado. Una vez agregado el eluyente, los tubos se mezclaron durante 1 minuto. Después de mezclar, se colocó el fondo del tubo en nitrógeno líquido para congelar la capa de suero. A continuación, el éter dietílico se decantó en un tubo de vidrio de borosilicato limpio y luego se evaporó bajo nitrógeno comprimido a 35°C. La muestra se reconstituyó en 1.1 mL de acetonitrilo de grado LC-MS; se agitó y luego ese solvente se evaporó bajo N₂ a 35 °C. Las muestras extraídas se almacenaron a -20°C hasta su análisis LC-MS/MS.

Extracción en fase sólida en tejidos de especies comerciales

En las matrices biológicas de piel, músculo, hígado, y gónada, la extracción se realizó a partir de 150 mg de tejido homogenizado a 4°C en un tubo de vidrio de borosilicato limpio con 1.4 mL de acetonitrilo grado LC-MS y el uso de un homogeneizador Kinematica Polytron™ PT 3100D. Una vez homogeneizado, el contenido de la muestra se transfirió a un tubo tipo *Falcon* de 50 mL. Para tener un control de calidad y de manera similar a las muestras de suero, siete duplicados se enriquecieron con 50 mL (50 ppb) de hormona estándar marcada isotópicamente para la determinación del control de calidad. Los tubos de borosilicato se lavaron con 1 mL de agua grado LC-MS y se transfirieron al tubo Falcon. Este paso se repitió para un total de tres lavados. Después del tercer lavado, se añadió agua de grado LC-MS al tubo Falcon hasta que el contenido llegó a 5 mL. Posteriormente, las muestras fueron agitadas en vórtex y los contenidos se llevaron hasta la marca de 15 mL con acetonitrilo de grado LC-MS. A continuación, las muestras se agitaron a mano durante 30 s.

Una vez agitado, se añadió el paquete de sal del kit QuEChERS y el contenido se volvió a agitar durante 60 s. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2,900 rpm durante 5 minutos a 4°C. La capa superior de acetonitrilo se transfirió a un tubo dSPE del mismo kit y se mezcló durante 60 s. A continuación, las muestras se centrifugaron durante tres minutos (18.000 rpm/4 °C). El acetonitrilo se transfirió a un tubo de vidrio de borosilicato limpio y se evaporó bajo nitrógeno comprimido a 25°C. Las muestras se reconstituyeron en 2 mL de 80:20 agua:metanol grado LC-MS; se mezclaron en vórtex y luego fueron sometidas a sonicación durante 9 min. Las muestras de 2 mL se filtraron a través de un filtro giratorio de acetato de celulosa de 0.22 µm y se centrifugaron durante 60 s (12,000 rpm/19 °C). El filtrado resultante se transfirió a un tubo de vidrio de borosilicato limpio y se evaporó bajo nitrógeno comprimido a 25°C. Las muestras extraídas se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Detección de hormonas y análisis LC-MS/MS

El control de calidad siguió las mismas pautas descritas en la sección de Materiales y Método del Capítulo IV de esta tesis (Método 539, Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América). Esto permitió conocer los valores de precisión y recuperación de las hormonas esteroides analizadas en cada tejido. La precisión del método se evaluó mediante la desviación estándar relativa (% RSD). Un valor ≤ 20 fue el indicador considerado como aceptable para todos los analitos. La eficiencia de extracción (porcentaje de recuperación) idealmente debe encontrarse entre el 70 y el 130 % del valor original de las muestras. Las curvas de calibración se prepararon en el mismo gradiente de concentraciones conocidas de 1, 5, 10, 50, 250 y 500 ppb para todas las hormonas. La recuperación de cada hormona se obtuvo mediante la comparación del promedio del área isotópica de las muestras enriquecidas con el promedio del área isotópica de las muestras no enriquecidas. En cuanto a la precisión, la desviación estándar del área isotópica de las muestras enriquecidas se comparó con el promedio de su área isotópica. El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) se calcularon utilizando un estándar de 1 ppb por hormona. A continuación, el instrumento midió el estándar de siete a diez veces consecutivas con el fin de calcular la desviación estándar de los valores obtenidos. Todas las hormonas fueron analizadas según el apartado Análisis LC-MS/MS (pág. 98) de la presente tesis.

Resultados

La extracción y análisis de hormonas esteroides vía QUEChERS y LC-MS/MS permitió la detección de nueve hormonas en los tejidos analizados de *M. lunulatus* y *H. dipterurus*. Los perfiles hormonales incluyeron valores de E2, T, P4, CORT, E1, A4, 17-OHP, F y E con un límite de detección entre 0.37-1.31 ng/mL; y un límite de cuantificación entre 1.25-4.17 ng/mL (Tabla 7). Las eficiencias de extracción y la precisión variaron según la hormona y matriz biológica dentro de un rango del 18-104%. Estos resultados son similares a lo observado en otros estudios con elasmobranchios (Awruch et al. 2013, Becerril-García et al. 2020a). No obstante, se espera que estos valores aumenten después de un proceso de optimización y la adquisición de nuevas muestras.

Tabla 7. Límites de detección (ng/mL) y cuantificación (ng/mL) para las nueve hormonas analizadas en tejidos de elasmobranquios comerciales vía QueChERS y LC-MS/MS.

Hormona	Límite de detección	Límite de cuantificación
Estradiol	0.74	2.63
Testosterona	0.53	1.79
Progesterona	0.40	1.34
Corticosterona	1.31	4.17
Estrona	1.23	4.11
Androstenediona	0.37	1.25
17-Hidroxyprogesterona	0.73	2.45
Cortisol	1.10	3.72
Cortisona	0.83	2.79

Valores de referencia en suero sanguíneo

El suero sanguíneo mostró los valores más altos de eficiencia de extracción y precisión en el análisis de esteroides (Tabla 8). Esta matriz permitió la detección de las nueve hormonas mencionadas durante la validación. Las concentraciones de dichas hormonas oscilaron entre 0.37-742.67 ng/mL (media 56,06 ± 17,41 ng/mL S.E.; n=55), con diferencias según sexo y estado de madurez de ambas especies.

Tabla 8. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en suero sanguíneo de elasmobranquios comerciales.

Hormona	Recuperación	Precisión
Estradiol	73	11.8
Testosterona	104	13.1
Progesterona	88	19.4
Corticosterona	103	14.3
Estrona	77	16.8
Androstenediona	100	13.4
17-Hidroxyprogesterona	103	14.3
Cortisol	87	5.2
Cortisona	87	5.2

Recuperación y precisión por matriz analizada

La piel de los elasmobranquios comerciales mostró valores aceptables en cuanto a eficiencia de extracción y precisión para el análisis de esteroides (Tabla 9; Becerril-García et al. 2020a). Como se observó en el suero sanguíneo, las muestras de piel permitieron la detección de los nueve esteroides obtenidos en este estudio de validación. Las concentraciones de dichas hormonas oscilaron entre 0.11-207.33 ng/mL (media 31,38 ± 4,40 ng/mL S.E.; n=84), con diferencias según el sexo y el estado de madurez de ambas especies.

Tabla 9. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en piel de elasmobranquios comerciales.

Hormona	Recuperación	Precisión
Estradiol	99	22.34
Testosterona	42	8.51
Progesterona	22	15.33
Corticosterona	53	13.21
Estrona	43	17.69
Androstenediona	31	12.71
17-Hidroxyprogesterona	53	13.21
Cortisol	46	4.93
Cortisona	46	4.93

Las muestras de músculo permitieron la detección de todos los esteroides obtenidos en este estudio a excepción de P4 y E1. Las concentraciones de esteroides detectados oscilaron entre 0.69-39.91 ng/mL (media 6,77 ± 1,63 ng/mL S.E.; n=31), con diferencias según sexo y el estado de madurez de ambas especies. Las recuperaciones y la precisión en cuanto a la extracción de hormonas fueron bajas, aunque similares a lo observado en otros estudios con suero (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en músculo de elasmobranquios comerciales.

Hormona	Recuperación	Precisión
Estradiol	32	15.82
Testosterona	44	19.93
Progesterona	29	21.50
Corticosterona	43	22.08
Estrona	28	18.96
Androstenediona	42	22.99
17-Hidroxyprogesterona	43	22.08
Cortisol	57	31.87
Cortisona	57	31.87

Un total de seis esteroides fueron detectadas en las muestras de hígado, incluidos T, CORT, A4, 17-OHP, F y E. Las concentraciones de dichas hormonas oscilaron entre 0.63 y 182.43 ng/mL (media 26,45 ± 8,27 ng/mL S.E.; n=21), con diferencias según sexo y estado de madurez de ambas especies. Los porcentajes de recuperaciones y de precisión Tabla 11. Los valores de E2 y E1 no se obtuvieron debido a problemas técnicos con el instrumento durante las mediciones.

Tabla 11. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en hígado de elasmobranquios comerciales.

Hormona	Recuperación	Precisión
Estradiol	-	-
Testosterona	51	18.49
Progesterona	22	18.51
Corticosterona	49	30.65
Estrona	-	-
Androstenediona	49	16.98
17-Hidroxyprogesterona	49	30.65
Cortisol	61	23.85
Cortisona	61	23.85

El análisis de gónadas permitió la detección de E2, T, P4, A4, 17-OHP y E. Las concentraciones de dichas hormonas oscilaron entre 6.86-118.38 ng/mL (media 26.12 ± 8.91 ng/mL S.E.; n=12), con diferencias según sexo y estado de madurez de ambas especies. Las recuperaciones y la precisión de las hormonas extraídas se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Porcentajes de recuperación y precisión (% desviación estándar relativa) de las hormonas analizadas en gónadas de elasmobranquios comerciales.

Hormona	Recuperación	Precisión
Estradiol	22	22.4
Testosterona	36	19.43
Progesterona	18	46.39
Corticosterona	38	18.73
Estrona	21	18.32
Androstenediona	35	25.73
17-Hidroxyprogesterona	38	18.73
Cortisol	60	30.83
Cortisona	60	30.83

Perfiles hormonales de M. lunulatus

El análisis de hormonas esteroides en los tejidos de *M. lunulatus* se realizó a partir de las mediciones en cuatro hembras (una juvenil, dos maduras y una hembra preñada) y dos machos maduros. Los conductos reproductivos fueron evidentes en todos los especímenes. La hembra preñada evidenció una gestación temprana al detectarse cápsulas (también conocidas como *velas*) en los úteros. Los dos machos contaban con semen en sus gonopterigios, lo que sugiere que estos ejemplares mantendrían actividad reproductiva cercana al momento de su captura (Compagno et al. 2005).

La hembra juvenil de *M. lunulatus* evidenció picos hormonales de E2 (105.30 ng/mL), P4 (6.96 ng/mL), E1 (3.062 ng/mL), 17-OHP (2.32 ng/mL) y F (55.48 ng/mL) en suero sanguíneo. En piel se observaron picos de T (4.58 ng/mL), CORT (113.97 ng/mL), 17-OHP (15.73 ng/mL) y F (16.15 ng/mL), mientras que solamente las hormonas E2 (1.16 ng/mL) y CORT (2.065 ng/mL) fueron detectadas en el músculo. En el caso del hígado, los picos observados correspondieron a CORT (20.09 ng/mL), F (12.99 ng/mL) y E (4.58 ng/mL).

Las diferencias en los picos hormonales entre matrices biológicas podrían indicar un tiempo diferente de permanencia en cada matriz. Esto implicaría “ventanas de tiempo” distintas según el tejido y la fisiología de las especies. En este sentido, los niveles observados en suero e hígado podrían estar relacionados con la actividad sexual en el momento de la recolección de la muestra (Prohaska et al, 2013), mientras que otros tejidos podrían tener la firma de esteroides de eventos sexuales recientes. En los juveniles, la presencia de esteroides podría estar relacionada con el desarrollo sexual para la maduración, particularmente a través de la acción de hormonas como E2, P4 y T (Awruh 2013).

Las hembras maduras no preñadas evidenciaron picos de T (29.74-282.06 ng/mL), P4 (3.82 - 4.40 ng/mL) y E1 (148.04 - 192.43 ng/mL) en suero sanguíneo. En piel y músculo también se detectaron diferentes concentraciones de E2 (1.99 - 86.86 ng/mL), T (11.56 - 48.31 ng/mL), CORT (51.63 - 168.61 ng/mL) y 17-OHP (15.13 - 16.80 ng/mL). En el hígado, los picos hormonales se relacionaron con glucocorticoides como CORT (30.39 - 40.12 ng/mL) y F (9.28-16.32 ng/mL). En esta etapa de madurez, el proceso reproductivo para la gestación podría estar relacionado con altos niveles de esteroides reproductivos observados en suero, piel y músculo; lo que se relaciona con la vitelogénesis y el desarrollo de conductos reproductivos (Tsang y Callard 1987; Tricas et al. 2000; Mull et al. 2010). De manera similar, la presencia de CORT en el hígado podría indicar un papel en el apareamiento y el almacenamiento de esperma (Di Prisco 1966; Snelson et al. 1997; Manire et al. 2007). Los niveles de F en el hígado son consistentes con las observaciones realizadas por Lyons y Wynne-Edwards (2019), quienes sugieren que este esteroide favorece la ovulación de hembras maduras al observarse niveles elevados en individuos post-ovulatorios y en fases iniciales de la gestación (Lyons and Wynne -Edwards 2019). En este sentido, las diferencias con las hembras preñadas recaerían en la ausencia de otros esteroides como el A4, al no ser detectado en estos individuos.

En el suero sanguíneo de hembras gestantes, fue posible detectar picos de T (374.45 ng/mL), P4 (17.22 ng/mL), CORT (5.92 ng/mL), E1 (87.11 ng/mL), A4 (7.52 ng/mL) y F (55.65 ng/mL). Las matrices biológicas como músculo y piel mostraron picos de E2 (35.61-39.91 ng/mL; Fig. 26), CORT (297.33 ng/mL) y F (11.28-18.91 ng/mL). El análisis de las gónadas evidenció picos en tres esteroides, incluidos E2 (32.11 ng/mL), T (19.60 ng/mL) y A4 (11.23 ng/mL). Según otros estudios en elasmobranchios placentarios, se observa un aumento de P4 y F en suero durante el embarazo, ya que este esteroide favorece la implantación de embriones en el útero y F participa en la regulación de la energía y el estrés (Manire et al. 1999; Mullet et al. 2010).

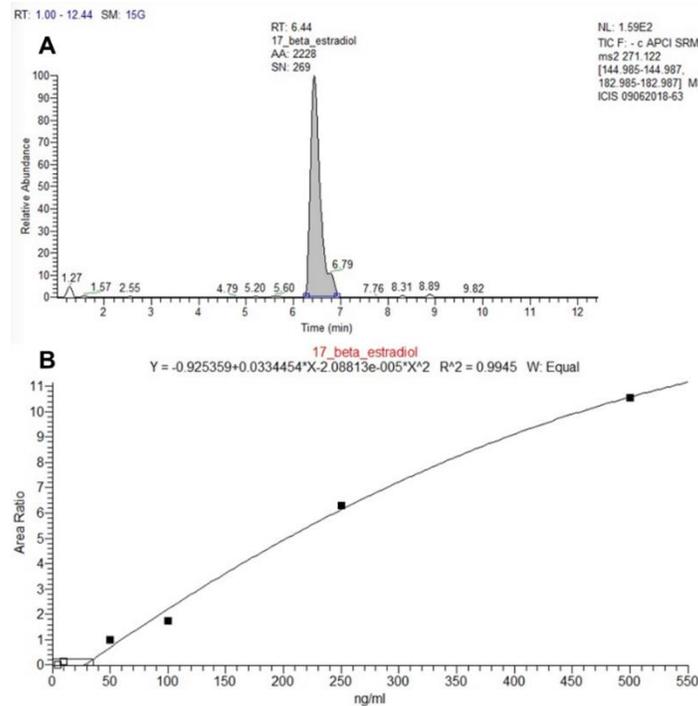


Figura 26. Pico de E2 observado en piel de la hembra preñada de *M. lunulatus* (A); curva de calibración de la hormona E2 (B).

Es posible que los picos observados de E2 y CORT en la piel reflejen la vitelogénesis previa a la gestación de *M. lunulatus* al cuantificarse niveles elevados de T y P4 en suero, pero sin detecciones de E2 en la sangre. No obstante, otros esteroides como A4, 17-OHP y F estaban presentes en varios tejidos como suero, músculo y piel; lo que podría ser de utilidad para la detección de la gestación. De manera similar, la hormona A4 podría funcionar como un indicador de esta etapa, al no ser detectada en hembras no gestantes.

Los machos maduros de *M. lunulatus* mostraron picos de P4 (9.49 ng/mL), E1 (0.77 ng/mL), 17-OHP (26.35 ng/mL), y especialmente T (742.67 ng/mL) y F (407.98 ng /mL) en suero sanguíneo. Esto es similar a los niveles observados en las gónadas con respecto a T (40.48 ng/mL), P4 (118.38 ng/mL) y 17-OHP (27.19 ng/mL); aunque los niveles de A4 (15.82 ng/mL) y E (10.26 ng/mL) también fueron detectados en los testículos. En el caso del hígado, se observaron picos de T (9.85-14.17 ng/mL), CORT (36.64-46.90 ng/mL) y F (9.18-22.69 ng/mL). La piel y el músculo evidenciaron niveles de E2 (34.21 ng/mL), T (10.33 ng/mL), CORT (100.77-112.46 ng/mL), A4 (4.06 ng/mL), 17-OHP (14.11-16.03 ng/mL), F (1.08 ng/mL) y E (26.43 ng/mL). En individuos maduros, los niveles altos de E2, A4 y 17-OHP en el músculo y la piel indicarían actividad reproductiva junto con los niveles de T, P4, 17-OHP y F en la sangre (Awruch 2013). Sin embargo, esta afirmación se confirmaría mediante un aumento en el número de individuos y pruebas estadísticas para la identificación de diferencias entre individuos adultos y juveniles (Tabla 13).

Perfiles hormonales de H. dipterurus

En el caso de la raya *H. dipterurus*, se analizaron un total de 12 hembras (11 juveniles; una posparto) y nueve machos (cuatro juveniles; cinco adultos). El suero en machos juveniles evidenció picos en las concentraciones de E2 (40.11 ng/mL) y A4 (3.31 ng/mL), mientras que la piel y el músculo mostraron concentraciones de E2 (0.87-2.48 ng/mL), T (9.83-9.95 ng/mL), CORT (1.02-109.49 ng/mL), 17-OHP (0.22-22.39 ng/mL) y F (2.14-11.61 ng/mL; Tabla 14).

En los machos juveniles no hubo detecciones de P4, E1 y E; aunque es importante recalcar que no fue posible realizar los análisis en gónadas e hígado. Es probable que las hormonas detectadas se relacionen con el desarrollo sexual de estos individuos, en los que T podría actuar como agente anabólico (Sulikowski et al. 2005; Lyons y Wynne-Edwards 2019) y E2 podría propiciar el inicio de la espermatogénesis en estos batoideos (Tricas et al. 2000; Sulikowski et al. 2004).

Tabla 13. Panel hormonal de los individuos analizados de *Mustelus lunulatus* vía QueChERS y LC-MS/MS capturados en Punta Lobos, BCS, con información sobre su sexo (M=Macho; H= Hembra), estadio reproductivo, tejido (S=Suero; P= Piel; M= Músculo; H=Hígado; G= Gónada), y concentración de hormonas en ng/mL (E1= estrona; E2=estradiol; A4= androstenediona; T= testosterona; P4= progesterona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol; CORT= corticosterona; E= cortisona). Guion indica que el análisis no fue realizado en la matriz e individuo correspondiente. Valores en paréntesis indican detecciones por debajo del límite de cuantificación, *debajo del límite de detección.

Código	Sexo	Estadio	Tejido	E1	E2	A4	T	P4	17-OHP	F	CORT	E
Mlu180427-1	H	Preñada (fase inicial)	S	87.119	< 0.74	7.529	379.452	17.227	< 0.73	55.658	5.927	< 0.83
Mlu180427-1	H	Preñada (fase inicial)	P	-	35.616	3.29	< 0.53	ND	8.03	11.281	207.33	< 0.83
Mlu180427-1	H	Preñada (fase inicial)	M	-	39.915	< 0.37	< 0.53	ND	< 0.73	18.918	-	8.981
Mlu180427-1	H	Preñada (fase inicial)	G	< 1.23	32.111	11.237	19.604	ND	< 0.73	< 1.1	ND	< 0.83
Mlu180427-2	H	Inmadura	S	(3.062)	105.309	< 0.37	< 0.53	6.966	(2.323)	55.488	< 1.31	< 0.83
Mlu180427-2	H	Inmadura	P	< 1.23	< 0.74	< 0.37	4.581	0	15.731	16.154	113.976	< 0.83
Mlu180427-2	H	Inmadura	M	< 1.23	(1.167)	< 0.37	< 0.53	0	< 0.73	< 1.1	(2.065)	< 0.83
Mlu180428-1	H	Madura	S	160.409	< 0.74	< 0.37	124.876	4.408	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Mlu180428-1	H	Madura	P	< 1.23	86.862	< 0.37	< 0.53	0	16.804	< 1.1	168.619	< 0.83
Mlu180428-2	M	Maduro	S	0.776*	< 0.74	< 0.37	742.679	9.494	26.356	407.98	< 1.31	< 0.83
Mlu180428-2	M	Maduro	P	< 1.23	34.212	< 0.37	< 0.53	0	14.113	< 1.1	112.468	< 0.83
Mlu180430-1	H	Madura	S	148.043	< 0.74	< 0.37	29.745	4.394	< 0.73	< 1.1	16.837	< 0.83
Mlu180430-1	H	Madura	P	< 1.23	(1.993)	< 0.37	48.341	6.01	15.133	< 1.1	51.63	< 0.83
Mlu180430-1	H	Madura	M	< 1.23	31.49	< 0.37	11.568	0	(1.69)	< 1.1	0.861*	< 0.83
Mlu180430-2	M	Maduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	0	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Mlu180430-2	M	Maduro	P	< 1.23	< 0.74	4.065	< 0.53	0	16.032	(1.084)	100.779	26.43
Mlu180430-2	M	Maduro	M	< 1.23	< 0.74	7.417	10.335	0	8.822	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Mlu180430-2	M	Maduro	H	< 1.23	< 0.74	11.027	9.85	0	< 0.73	9.185	36.648	< 0.83
Mlu180430-2	M	Maduro	G	< 1.23	< 0.74	15.825	40.486	118.383	27.197	< 1.1	< 1.31	10.263
Mlu180430-3	H	Madura	S	192.427	< 0.74	6.935	282.062	3.824	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83

En machos maduros se observaron diferencias preliminares probablemente relacionadas con la presencia o ausencia de semen. En el suero sanguíneo de los machos con semen fue posible detectar T (1.38-26.42 ng/mL), CORT (8.85-24.64 ng/mL) y F (1.58-2.48 ng/mL); así como picos de CORT (0.75-80.64 ng/mL), A4 (4.17-7.063 ng/mL) y 17-OHP (1.93-18.73 ng/mL) tanto en piel como en músculo. En hígado se detectaron niveles de T (7.75-10.88 ng/mL). Dichas concentraciones no se observaron en los machos maduros sin semen, los cuales, presentaron niveles de E1 (0.52 ng/mL) en suero; y presencia de T (0.00-1.66 ng/mL), CORT (44.31-97.80 ng/mL), 17-OHP (0.00-16.11 ng/mL) y F (0.00-3.93 ng/mL) en la piel. Es probable que los niveles de A4 y CORT puedan estar relacionados con los reservorios de esperma como se observa en otros elasmobranquios (Garnier et al. 1999), lo que podría ser útil para identificar las temporadas de apareamiento mediante el uso de piel y músculo, aunque un aumento en el tamaño de la muestra es necesario para confirmar esta afirmación.

La mayoría de las hembras juveniles de *H. dipterurus* no presentaron hormonas reproductivas en suero. Solo tres individuos mostraron niveles de P4 (7.69 ng/mL-8.35 ng/mL), CORT (6.38-16.22 ng/mL) y F (0.3-2.07 ng/mL). Esto fue consistente en otros tejidos como piel y músculo donde seis individuos mostraron picos en E2 (0.87-147,38 ng/mL), T (0.00-9.95 ng/mL), P4 (0.00-4.60 ng/mL), CORT (0.83-109.49 ng/mL), E1 (0.00-3.95 ng/mL), 17-OHP (0.00-22.39 ng/mL) y E (0.00-8.41 ng/mL); con un individuo mostrando picos de T (10.86 ng/mL), A4 (11.62 ng/mL), 17-OHP (9.06 ng/mL) y E (6.86 ng/mL) en el ovario. Estos niveles podrían estar relacionados con el desarrollo sexual durante el crecimiento por parte de los agentes anabólicos de estos esteroides (Sulikowski et al. 2005; Lyons y Wynne-Edwards 2019). La hembra posparto de *H. dipterurus* mostró picos de E2 (8.30 ng/mL) y E1 (0.24 ng/mL) en suero sanguíneo, con detecciones de T (2.30 ng/mL), CORT (40.42 ng/mL), A4 (7.79 ng/ml), y F (0.52 ng/ml) en la piel. Los niveles de E2 podrían estar relacionados con el inicio de un nuevo ciclo reproductivo y la vitelogénesis (Ho, 1987; Prisco et al. 2008). Sin embargo, no hay suficientes datos para sugerir más información, ya que solo se analizó un espécimen. Adicionalmente, futuros análisis mediante LC-MS deberían considerar la inclusión de otros esteroides vinculados al final del ciclo reproductivo como la DHT, la cual, puede jugar un papel relevante en la retroalimentación negativa de la síntesis de GnRH (Tricas et al 2000, Tabla 14).

CONCLUSIONES

Los resultados de las pruebas permitieron obtener valores aceptables de detección (0.37-1.31 ng/mL) y cuantificación (1.25-4.17 ng/mL) de nueve hormonas esteroides vía extracción en fase sólida. Esto permitió el cumplimiento de otro objetivo particular relevante, que fue obtener un panel con mayor capacidad en comparación con 90% de los estudios realizados a la fecha (Becerril-García et al. 2020a). Dichos perfiles hormonales obtenidos incluyeron las mediciones de las hormonas E2, T, P4, CORT, E1, A4, y 17-OHP. Los valores de recuperación y precisión de hormonas variaron según la matriz analizada, incluyendo resultados en piel (22-99%; 4.9-22.3), músculo (28-57%; 15.8-22.3), hígado (22-61%; 18.5-30.7), y gónadas (18-60%; 18.7-45.4).

La información proporcionada en este anexo incluye las primeras detecciones de hormonas esteroides en piel de elasmobranchios, y sugieren su viabilidad como una matriz útil para el monitoreo de hormonas esteroides en otras poblaciones. Los resultados preliminares evidenciaron la capacidad de optimizar los valores obtenidos en todos los tejidos analizados, principalmente en términos de eficiencia de extracción y precisión. Adicionalmente, resulta ideal considerar el análisis de materia a utilizar por submuestra, ya que es posible que la optimización permita la obtención de resultados a partir de los 50 mg de piel. A pesar de los resultados obtenidos, algunos de los extractos hormonales vía QuEChERS presentaron precipitados cristalinos con el potencial de interferir el análisis LC-MS/MS, por lo cual, es recomendable solventar los problemas de filtrado o probar otro método de extracción.

Las biopsias de tiburón blanco y otras especies protegidas usualmente proporcionan segmentos de músculo y piel. La cantidad de masa por biopsia depende de la punta de muestreo, la habilidad durante la toma de biopsias y el grosor de la piel del tiburón en el segmento corporal invadido. Al comparar los resultados hormonales entre las biopsias de músculo y piel, se observó un mejor rendimiento de la piel en cuestión de cantidad de hormonas analizadas, precisión y recuperación. De esta manera, la piel fue seleccionada como matriz biológica candidata para la optimización del método a partir de técnicas que disminuyeran la presencia de sedimentos en los extractos previos al análisis LC-MS/MS (Anexo II).

Tabla 14. Perfiles hormonales de los individuos analizados de *Hypanus dipterurus* vía QueChERS y LC-MS/MS capturados en Bahía de La Paz, BCS, con información sobre su sexo (M=Macho; H= Hembra), estadio reproductivo, tejido (S=Suero; P= Piel; M= Músculo; H=Hígado; ; G= Gónada), y concentración de hormonas en ng/mL (E1= estrona; E2=estradiol; A4= androstenediona; T= testosterona; P4= progesterona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol; CORT= corticosterona; E= cortisona). El guion indica que el análisis no fue realizado en la matriz e individuo correspondiente. Valores en paréntesis indican detecciones por debajo del límite de cuantificación. NE= no encontrado, *debajo del límite de detección.

Código	Sexo	Estadio	Tejido	E1	E2	A4	T	P4	17-OHP	F	CORT	E
Hdi180417-2	F	Postparto	S	0.241*	8.032	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180417-2	F	Postparto	P	< 1.23	< 0.74	7.791	2.306	< 0.40	< 0.73	0.522	40.425	< 0.83
Hdi180419-1	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	7.694	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180419-1	F	Inmaduro	P	(3.956)	147.386	< 0.37	4.784	4.6	15.597	< 1.1	69.483	< 0.83
Hdi180419-1	F	Inmaduro	M	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	8.418
Hdi180419-1	F	Inmaduro	G	< 1.23	< 0.74	11.629	10.868	< 0.40	9.061	< 1.1	< 1.31	6.869
Hdi180419-8	M	Inmaduro	P	< 1.23	(2.48)	< 0.37	< 0.53	< 0.40	17.468	< 1.1	109.494	< 0.83
Hdi180427-1	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180427-2	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	9.975	< 0.83
Hdi180427-3	M	Maduro (semen)	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	(1.389)	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180427-3	M	Maduro (semen)	P	< 1.23	< 0.74	4.177	< 0.53	< 0.40	18.738	< 1.1	68.322	8.064
Hdi180427-4	M	Inmaduro	P	< 1.23	(0.87)	< 0.37	9.957	< 0.40	< 0.73	24.35	37.93	< 0.83
Hdi180427-5	M	Maduro (semen)	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	14.329	< 0.40	< 0.73	(1.587)	8.853	(1.435)
Hdi180427-5	M	Maduro (semen)	P	< 1.23	< 0.74	6.73	< 0.53	< 0.40	16.351	11.456	80.649	22.032
Hdi180427-5	M	Maduro (semen)	M	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	11.474	10.412	< 1.31	< 0.83
Hdi180427-5	M	Maduro (semen)	H	< 1.23	< 0.74	12.918	10.886	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	7.511
Hdi180427-5	M	Maduro (semen)	G	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180427-6	M	Maduro (no semen)	P	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	44.31	< 0.83
Hdi180427-7	M	Maduro (no semen)	S	0.52*	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180427-7	M	Maduro (no semen)	P	< 1.23	< 0.74	< 0.37	(1.661)	< 0.40	16.114	3.935	97.802	< 0.83
Hdi180428-1	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180428-1	F	Inmaduro	P	< 1.23	< 0.74	4.542	8.906	< 0.40	16.821	4.564	37.507	< 0.83
Hdi180428-2	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180428-2	F	Inmaduro	P	< 1.23	< 0.74	3.391	< 0.53	< 0.40	14.605	13.298	37.874	< 0.83
Hdi180428-2	F	Inmaduro	M	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	0.436*	(2.627)	0.833*	< 0.83
Hdi180429-1	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	(3.384)	< 0.83
Hdi180429-1	F	Inmaduro	P	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	13.168	< 1.1	55.231	< 0.83
Hdi180429-2	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83

Hdi180429-3	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	8.352	< 0.73	< 1.1	16.228	< 0.83
Hdi180429-4	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	(2.072)	< 1.31	< 0.83
Hdi180429-4	F	Inmaduro	P	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	18.935	(2.821)	23.774	< 0.83
Hdi180429-5	M	Maduro (semen)	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	26.428	< 0.40	< 0.73	(2.48)	24.643	< 0.83
Hdi180429-5	M	Maduro (semen)	P	< 1.23	< 0.74	7.063	0.117*	< 0.40	15.041	18.033	69.207	< 0.83
Hdi180429-5	M	Maduro (semen)	M	< 1.23	< 0.74	< 0.37	7.758	< 0.40	(1.931)	< 1.1	0.759*	< 0.83
Hdi180429-6	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	6.388	< 0.83
Hdi180429-6	F	Inmaduro	M	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	(2.445)	(1.493)	0.697*	< 0.83
Hdi180430-1	M	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	0.366*	8.281	< 0.83
Hdi180430-1	M	Inmaduro	P	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	22.399	(2.289)	75.491	< 0.83
Hdi180430-1	M	Inmaduro	M	< 1.23	(1.183)	< 0.37	9.837	< 0.40	0.229*	< 1.1	(1.885)	< 0.83
Hdi180430-2	M	Inmaduro	S	< 1.23	40.117	3.319	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180430-2	M	Inmaduro	P	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	14.37	11.61	61.994	< 0.83
Hdi180430-2	M	Inmaduro	M	< 1.23	(1.298)	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	(2.147)	1.026*	< 0.83
Hdi180430-3	F	Inmaduro	S	< 1.23	< 0.74	< 0.37	< 0.53	< 0.40	< 0.73	< 1.1	< 1.31	< 0.83
Hdi180430-3	F	Inmaduro	P	< 1.23	< 0.74	< 0.37	4.413	< 0.40	< 0.73	8.907	49.882	< 0.83

ANEXO II. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO. Pruebas de extracción en fase líquida y LC-MS/MS en piel de *H. dipterurus* y *M. lunulatus*

Introducción

Las pruebas de extracción vía fase sólida demostraron un rendimiento aceptable en cuanto a la precisión y recuperación de hormonas esteroides según el control de calidad utilizado (Anexo I). No obstante, estas extracciones del kit QuEChERS evidenciaron precipitados en las preparaciones finales, los cuales, se relacionaron con las sales propias del kit utilizado. El daño que estas sales pueden infligir en el LC-MS/MS propició la realización de pruebas de extracción con un método de extracción líquido-líquido (sin presencia de sales) modificado de Wittmaack et al. (2022) para el análisis poco invasivo de especies protegidas como *C. carcharias*.

Aunado a los resultados del Anexo I, la viabilidad de la piel como matriz biológica se puso de nuevo a prueba mediante la extracción líquido-líquido. Los objetivos particulares de estas pruebas fueron realizar un estudio de validación de la matriz biológica incluyendo límite de cuantificación y límite de detección, así como los propios valores de precisión y recuperación de hormonas esteroides.

Adicionalmente, se realizó la comparación de los perfiles hormonales obtenidos según la cantidad de materia utilizada por biopsia. Dichas comparaciones se realizaron de manera cualitativa al determinar la calidad de los datos obtenidos según el límite de detección y cuantificación observado en biopsias de 50 vs 150 mg de piel en la especie *H. dipterurus*. Finalmente, los resultados motivaron el análisis de biopsias de piel (50 mg) que proporcionaron información sobre las concentraciones en individuos analizados de *H. dipterurus* y *M. lunulatus*. Para comparar estos valores, se utilizó el valor de referencia de suero sanguíneo reportado en el Anexo I.

Objetivo general

Optimizar la extracción y análisis LC-MS/MS de hormonas esteroides en piel de elasmobranquios mediante extracción líquido-líquido

Objetivos particulares

- Conocer el límite de detección y cuantificación de hormonas esteroides vía extracción líquido-líquido y determinar su viabilidad para el análisis LC-MS/MS.
- Conocer los porcentajes de extracción y valores de precisión para cada hormona analizada.
- Comparar perfiles hormonales obtenidos en biopsias de piel de 50 y 150 mg.
- Obtener perfiles hormonales (> 3 esteroides) a partir de 50 mg de piel de *H. dipterurus* y *M. lunulatus*
- Comparar las concentraciones hormonales en suero sanguíneo de individuos de *H. dipterurus* y *M. lunulatus*

Materiales y Método

La obtención y procesamiento de las biopsias de ambas especies se detallan en el Anexo I. El método de extracción utilizado, así como las pautas de control de calidad y lo referente al análisis LC-MS/MS, se reporta en la sección de Materiales y Método de la presente tesis. Las pruebas de extracción en 50 y 150 mg de piel se realizaron únicamente en la raya diamante *H. dipterurus* debido a que fue la única especie con suficiente materia disponible para esta comparación. De esta manera, se obtuvieron dos submuestras de cada biopsia con una masa de 50 y 150 mg, respectivamente. La intención fue comparar los perfiles hormonales de ambas opciones y evaluar la más viable para el uso de piel como matriz biológica.

Resultados

Los límites de detección y cuantificación se reportan en la Tabla 4 (Materiales y Método, capítulo IV). Los valores de precisión expresados en términos de desviación estándar relativa, así como el porcentaje de recuperación según la hormona analizada se muestran en la Tabla 15. La precisión tuvo un rango de 11.73-20.70; el valor máximo corresponde a la precisión en el análisis de F y representó el único valor que no superó el control de calidad.

Las detecciones de F fueron aceptables, sin embargo, el error en su precisión debe ser considerado durante el análisis de su cuantificación (Fig. 27). En general, los valores de recuperación según la hormona fueron de 64-98% (Fig. 28).

Tabla 15. Porcentaje de recuperación de hormonas esteroides extraídas de 50 mg de piel de *Hypanus dipterus* con valores de precisión expresados en términos de desviación estándar relativa.

HORMONA (abreviación)	PRECISION	RECUPERACIÓN
Estrona (E1)	19.50	64%
Estradiol (E2)	13.10	97%
Androstenediona (A4)	16.66	93%
Testosterona (T)	14.36	97%
Progesterona (P4)	12.99	71%
Hidroxyprogesterona (17-OHP)	11.73	98%
Cortisol (F)	20.70	96%

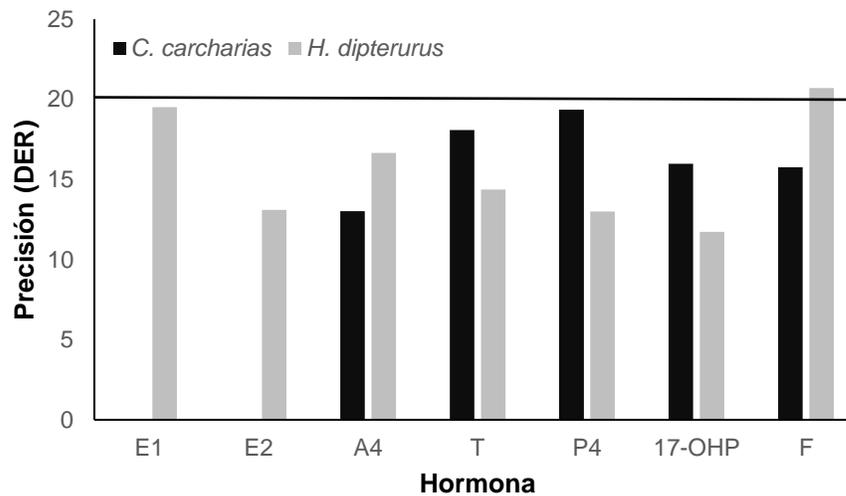


Figura 27. Valores de precisión en términos de desviación estándar relativa (DER) en la medición de siete hormonas esteroides de piel *Hypanus dipterus* y *Carcharodon carcharias* para fines de comparación.

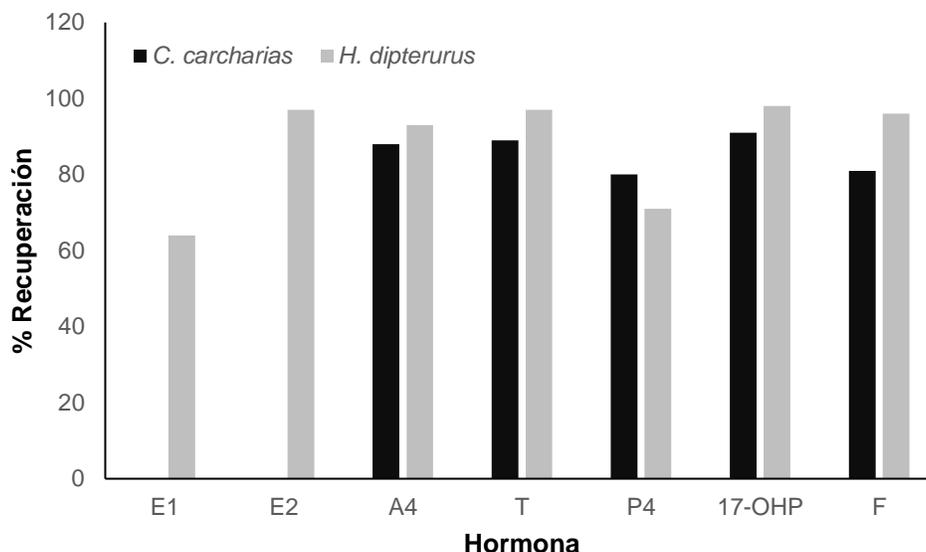


Figura 28. Porcentaje de recuperación de siete hormonas esteroides extraídas de 50 mg de piel de *Hypanus dipterus* y *Carcharodon carcharias* para fines de comparación.

Hormonas en H. dipterus: Prueba 50 vs 150 mg y concentraciones observadas

En cada segmento (50 vs 150 mg) se obtuvo un panel de 180 mediciones relacionadas con siete hormonas esteroides de 11 hembras y nueve machos de *H. dipterus* (Tabla 16). En el caso de las muestras de 50 mg, el 94% de las mediciones (n=170) no encontró picos hormonales de las hormonas analizadas. Las únicas detecciones correspondieron a picos de F observados en 10 individuos, de los cuales, solo una detección se mostró por debajo del límite de cuantificación. Los picos de F se encontraron en machos maduros (Mín-Max: 9.3-29.6 ng/mL, n=4) e inmaduros (Mín-Max: 9.3-29.6 ng/mL, n=2), así como en hembras maduras (0.4-1.6 ng/mL, n=2) e inmaduras (1.7-3.2 ng/mL, n=2). De las 10 detecciones encontradas, solo dos de ellas estuvieron por debajo del límite de cuantificación mientras que las restantes se encontraron por encima de dicho límite (Tabla 16).

Los segmentos de 150 mg de piel evidenciaron la ausencia de picos hormonales en el 93% de las mediciones (n=168). Además de los picos de F, se observó un pico de E1 (por debajo del límite de cuantificación) y dos picos evidentes de T. El estrógeno E1 solo se observó en una hembra madura (1.9 ng/mL), mientras que los picos de T solo se observaron en la piel dos machos maduros (15.2-31.4 ng/mL). De manera similar a lo observado en los segmentos de 50 mg, los picos de F se encontraron en machos maduros (Mín-Max: 2.6-3.7 ng/mL, n=2) e

inmaduros (Mín-Max: 4.1-7.2 ng/mL, n=2), así como en hembras maduras (0.02-7.2 ng/mL, n=4) y una inmadura con valores por debajo del límite de detección. De las 12 detecciones realizadas, siete de ellas no superaron el límite de cuantificación (Tabla 17).

Las detecciones en biopsias de 50 mg de piel de *H. dipterus* correspondieron a cortisol, mientras que los paneles de 150 mg permitieron detecciones adicionales de T4 y E1, aunque esta última se encontró por debajo del límite de cuantificación (Fig. 29). Es posible que los niveles de cortisol observados estén relacionados con la captura de los individuos, pues fueron sacrificados al ser desembarcados en playa. Es posible que dichos niveles de F incluyan niveles previos observados en los individuos, ya que es factible que estos individuos se encontraran estresados por factores ajenos a la pesca, tales como agentes de contaminación ambiental y cambio climático.

La alta proporción de detecciones por debajo del límite de cuantificación (> 50%) en los paneles de 150 mg, fue uno de los principales motivos para definir el uso de biopsias de 50 mg. Estos segmentos presentaron mediciones más robustas y confiables, aunque en menor diversidad de esteroides. Debido a que el control de calidad fue prioritario durante el estudio, se prefirió el uso de 50 mg. De esta manera, las inferencias biológicas en *H. dipterus*, *M. lunulatus* y *C. carcharias* se realizaron a partir de dicha cantidad.

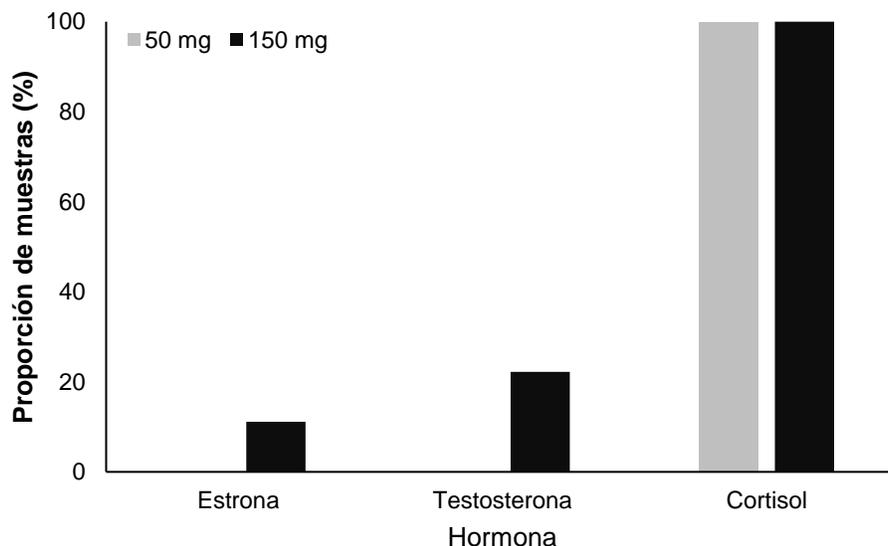


Figura 29. Proporción de muestras en las que se detectaron picos de hormonas esteroides extraídas de 50 (n=10) y 150 mg de piel (n=9) de *H. dipterus*.

Hormonas en piel de M. lunulatus

El panel de perfiles hormonales para *M. lunulatus* incluyó seis detecciones mayores al límite de cuantificación en las hormonas E2, T, y F en cinco de los seis individuos analizados (Tabla 15). En el 89 % (n=48) de las mediciones no se encontraron picos hormonales, principalmente en las hormonas E1, A4, P4, y 17-OHP. Los picos de E2 y F solo se observaron en hembras (Tabla 17). La cuantificación de E2 se realizó en un individuo inmaduro (16.03 ng/mL), uno maduro (35.89 ng/mL) y una hembra preñada (9.99 ng/mL). Los dos picos de F detectados se observaron en dos hembras inmaduras con 16.22-30.98 ng/mL. El único pico de T se encontró en un macho maduro en concentraciones de 11.69 ng/mL (Tabla 18).

Comparación con suero sanguíneo

Se calculó el coeficiente de correlación entre las concentraciones observadas en piel (50 mg) y suero sanguíneo de los individuos analizados de *H. dipterurus* y *M. lunulatus*. A pesar de que la presencia de picos hormonales coincidió en algunos individuos (Tabla 18), esta prueba preliminar mostró que la relación estadística entre tejidos fue nula o inexistente. Esta prueba se realizó al comparar las 162 mediciones obtenidas con respecto a su concentración ($r= 0.102$), incluyendo a aquellas hormonas no encontradas en el tejido ($r= -0.223$), y de manera binaria al número de detecciones ($r= -0.016$). No se realizaron pruebas posteriores a reserva de aumentar el número de muestra. No obstante, esto no significa que no exista relación biológica entre los tejidos, ya que las hormonas detectadas fueron transportadas eventualmente por la sangre. En este sentido, resulta necesario procurar esfuerzos para describir el transporte y la presencia de hormonas esteroides entre tejidos.

Tabla 16. Perfiles hormonales obtenidos vía LC-MS/MS a partir de extracción líquido-líquido en piel (50 y 150 mg) de *Hypanus dipterurus* (n=20). Se incluye información sobre sexo (M=Macho; H= Hembra), ancho de disco (AD, cm), estadio reproductivo, y concentración de hormonas en ng/mL (E2=estradiol; T= testosterona; P4= progesterona; CORT= corticosterona; E1= estrona; A4= androstenediona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol). Valores entre paréntesis indican detecciones por debajo del límite de cuantificación. NE= No encontrada; *debajo del límite de detección.

Código	Sexo	AD	Estadio	E1	E2	A4	T	P4	17-OHP	F
50 mg										
Hdi180427-7	M	53.2	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	29.6307515
Hdi180427-5	M	54	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	21.89807
Hdi180429-5	M	48.9	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	9.25639625
Hdi180419-16	M	45.2	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	9.77901241
Hdi180419-2	H	46.7	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180430-2	M	43.7	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180430-1	M	41.1	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180419-9	M	40.7	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	8.96772776
Hdi180419-7	M	40.3	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180427-6	M	41.8	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	4.070893
Hdi180419-3	H	56.1	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	(1.657756)
Hdi180428-2	H	47.1	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180419-1	H	60.9	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180429-6	H	47.6	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180427-1	H	62.4	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.46750179*
Hdi180427-2	H	41:3	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180430-3	H	56.8	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180429-3	H	46.3	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	(1.7559)
Hdi180419-12	H	47.9	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	(3.2742352)
Hdi180419-6	H	48.4	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
150 mg										
Hdi180427-7	M	53.2	Maduro	NE	NE	NE	15.2646421	NE	NE	(2.60983506)
Hdi180427-5	M	54	Maduro	NE	NE	NE	31.497481	NE	NE	NE
Hdi180429-5	M	48.9	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	(3.72513373)
Hdi180419-16	M	45.2	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180419-2	H	46.7	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	(1.81087702)
Hdi180430-2	M	43.7	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180430-1	M	41.1	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

Hdi180419-9	M	40.7	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	7.25494559
Hdi180419-7	M	40.3	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	4.1602302
Hdi180427-6	M	41.8	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180419-3	H	56.1	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	4.69374955
Hdi180428-2	H	47.1	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.02871484*
Hdi180419-1	H	60.9	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180429-6	H	47.6	Maduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180427-1	H	62.4	Maduro	(1.939)	NE	NE	NE	NE	NE	(3.68197783)
Hdi180427-2	H	41.3	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180430-3	H	56.8	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180429-3	H	46.3	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180419-12	H	47.9	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Hdi180419-6	H	48.4	Inmaduro	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0.13258963*

Tabla 17. Comparación de perfiles hormonales obtenidos entre muestras de 50 y 150 mg que detectaron picos hormonales en *H. dipterurus*. Sexo (M=Macho; H=Hembra), estadio reproductivo, masa (mg), y concentración de hormonas en ng/mL (T= testosterona, E1= estrona, F=cortisol). Valores entre paréntesis indican detecciones por debajo del límite de cuantificación. NE= No encontrada; *debajo del límite de detección.

Código	Sexo	Estadio	Masa (mg)	E1	T	F
Hdi180427-7	M	Maduro	50	NE	NE	29.63
			150	NE	15.26	(2.60)
Hdi180427-5	M	Maduro	50	NE	NE	21.8
			150	NE	31.4	NE
Hdi180429-5	M	Maduro	50	NE	NE	9.2
			150	NE	NE	(3.7)
Hdi180419-9	M	Inmaduro	50	NE	NE	8.9
			150	NE	NE	7.2
Hdi180419-3	H	Maduro	50	NE	NE	(1.6)
			150	NE	NE	4.69
Hdi180427-1	H	Maduro	50	NE	NE	0.46*
			150	(1.9)	NE	(3.6)

Tabla 18. Perfiles hormonales de los individuos analizados de *Mustelus lunulatus* (n=6) vía extracción líquido-líquido y LC-MS/MS capturados en Punta Lobos, BCS, con información sobre su sexo (M=Macho; H= Hembra), longitud total (LT, cm), estadio reproductivo, matriz biológica analizada, y concentración de hormonas

en ng/mL (E2=estradiol; T= testosterona; P4= progesterona; CORT= corticosterona; E1= estrona; A4= androstenediona; 17-OHP= 17-hidroxiprogesterona; F= cortisol; E= cortisona). Valor entre paréntesis indica detección por debajo del límite de cuantificación. NE= No encontrada; *debajo del límite de detección.

Código	Sexo	LT	Estadio	Matriz	E1	E2	A4	T	P4	17-OHP	F
Mlu180427-1	H	141	Preñada	Piel	NE	9.99770208	NE	NE	NE	NE	NE
				Suero	87.119	NE	7.529	379.452	17.227	NE	55.658
Mlu180427-2	H	85.5	Inmaduro	Piel	NE	NE	NE	NE	NE	NE	16.2209161
				Suero	(3.062)	105.309	NE	NE	6.966	2.323	55.488
Mlu180428-1	H	110.1	Maduro	Piel	NE	35.8995955	NE	NE	NE	NE	NE
				Suero	160.409	NE	NE	124.876	4.408	NE	NE
Mlu180428-2	M	130.3	Maduro	Piel	NE	NE	NE	11.6913852	NE	NE	NE
				Suero	0.776*	NE	NE	742.679	9.494	26.356	407.98
Mlu180430-1	H	101.1	Inmaduro	Piel	NE	16.0329614	NE	NE	NE	NE	30.9807473
				Suero	148.043	NE	NE	29.745	4.394	NE	NE
Mlu180430-3	H	109	Maduro	Piel	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
				Suero	192.427	NE	6.935	282.062	3.824	NE	NE

Conclusiones

En los segmentos de 150 mg, más de la mitad de las detecciones no sobrepasaron el límite de cuantificación. Las biopsias de 50 mg mostraron fallas similares solamente en el 20% de las detecciones. Es probable que nuevas optimizaciones permitan mejorar la sensibilidad ante otras hormonas, con la finalidad de calibrar el método hacia un tamaño ideal para la obtención de perfiles que superen el control de calidad de referencia. Los análisis realizados no encontraron relación entre las concentraciones en sangre y piel de los individuos. Esto permite sugerir que a la piel tiene el potencial para funcionar como matriz biológica para el análisis de concentraciones hormonales en elasmobranquios. A reserva de más estudios, se propone que la piel representa una ventana de tiempo con información de eventos fisiológicos intensos sucedidos con horas o días de anticipación. No obstante, se requiere contemplar el papel de la piel como órgano endocrino accesorio, lo que permitirá complementar información relacionada con este tejido.

LITERATURA CITADA

- Akçakaya HR, Bennett EL, Brooks TM, Grace MK, Heath A, Hedges S... Young RP (2018) Quantifying species recovery and conservation success to develop an IUCN Green List of Species. *Conservation Biology*, 32(5), 1128-1138.
- Aguirre-Muñoz A, Ezcurra E, Enkerlin HE, Soberon MJ, Salas FLM, Santos de Prado K... Aguirre BI (2005) La construcción social de la conservación y el desarrollo sustentable de Isla Guadalupe. *Isla Guadalupe, restauración y conservación. SEMARNAT-INE, CICESE, GECI, SEMAR, México*, 239-253.
- Aldana-Moreno A, Hoyos-Padilla EM, González-Armas R, Galván-Magaña F, Hearn A, Klimley AP... Ketchum JT (2019) Residency and diel movement patterns of the endangered scalloped hammerhead *Sphyrna lewini* in the Revillagigedo National Park. *Journal of Fish Biology*. <https://doi.org/10.1111/jfb.14239>.
- Alderete-Macal MJ, Caraveo-Patiño J, Hoyos-Padilla EM (2020) Ontogenetic differences in muscle fatty acid profile of white sharks *Carcharodon carcharias* off Guadalupe Island, México. *Revista de biología marina y oceanografía*, 55(1), 37-46.
- Anderson B, Belcher C, Slack J, Gelsleichter J (2018) Evaluation of the use of portable ultrasonography to determine pregnancy status and fecundity in bonnethead shark *Sphyrna tiburo*. *J Fish Biol* 93(6):1163-1170 <https://doi.org/10.1111/jfb.13831>.
- Aquino-Baleyto, M., Leos-Barajas, V., Adam, T., Hoyos-Padilla, M., Santana-Morales, O., Galván-Magaña, F., ... & Villalobos, H. (2021). Diving deeper into the underlying white shark behaviors at Guadalupe Island, Mexico. *Ecology and evolution*, 11(21), 14932.
- Arreguín-Sánchez F y Arcos-Huitrón E (2011) La pesca en México: estado de la explotación y uso de los ecosistemas. *Hidrobiológica*, 21(3), 431-462.

- Awruch CA, Frusher SD, Pankhurst NW, Stevens JD (2008b) Invasivo assessment of reproductive characteristics for management and conservation of sharks. *Mar Ecol Prog Ser* 355:277-285 <https://doi.org/10.3354/meps07227>
- Awruch CA, Pankhurst NW, Frusher SD, Stevens JD (2008a) Endocrine and morphological correlates of reproduction in the draughtboard shark *Cephaloscyllium laticeps* (Elasmobranchii: Scyliorhinidae). *J Exp Zool Part A* 309(4):184-197 <https://doi.org/10.1002/jez.445>
- Awruch CA, Pankhurst NW, Frusher SD, Stevens JD (2009) Reproductive seasonality and embryo development in the draughtboard shark *Cephaloscyllium laticeps*. *Mar Freshwater Res* 60(12):1265-1272 <https://doi.org/10.1071/MF09030>
- Awruch CA (2013) Reproductive endocrinology in chondrichthyans: the present and the future. *Gen Comp Endocr* 192: 60-70 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.021>
- Awruch CA, Jones SM, Asorey MG, Barnett A (2014) Invasivo assessment of the reproductive status of broadnose sevengill sharks (*Notorynchus cepedianus*) to determine the significance of habitat use in coastal areas. *Conserv Physiol* 2(1):cou013 <https://doi.org/10.1093/conphys/cou013>
- Barnett LA, Earley RL, Ebert DA, Cailliet GM (2009) Maturity, fecundity, and reproductive cycle of the spotted ratfish, *Hydrolagus colliei*. *Mar Biol* 156(3):301-316 <https://doi.org/10.1007/s00227-008-1084-y>
- Bautista-Romero, J., Reyes-Bonilla, H., Lluch-Cota, D.B. & Lluch-Cota, S.E. (1994) Aspectos generales sobre la fauna marina. In: Ortega-Rubio A. & Castellanos-Vera, A. (Eds.), *La Isla Socorro, Reserva de la Biosfera Archipiélago de Revillagigedo, México*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, pp. 247–264.
- Bevacqua, L., Reinerio, F. R., Becerril-García, E. E., Elorriaga-Verplancken, F. R., Juaristi-Videgaray, D., Micarelli, P., ... & Sperone, E. (2021). Trace elements and

isotopes analyses on historical samples of white sharks from the Mediterranean Sea. *The European Zoological Journal*, 88(1), 132-141.

Becerril-García, E. E., Petatan-Ramirez, D., Ortiz-Aguirre, I., & Ayala-Bocos, A. (2018). First record of the Pacific seahorse *Hippocampus ingens* in Guadalupe Island, Mexico. *Journal of Fish Biology*, 92(4), 1207-1210.

Becerril-García, E. E., Gutiérrez-Ortiz, M. A., Preciado-González, P. A., & Ayala-Bocos, A. (2019a). Presence of *Remora remora* on *Mobula birostris* in Revillagigedo National Park, Mexico. *Marine and Freshwater Research*, 71(3), 414-417.

Becerril-García, E. E., Hoyos-Padilla, E. M., Petatán-Ramírez, D., & Galván-Magaña, F. (2019b). Southernmost record of the white shark *Carcharodon carcharias* (Chondrichthyes: Lamnidae) in the Mexican Pacific. *Latin american journal of aquatic research*, 47(1), 190-193.

Becerril-García, E. E., Hoyos-Padilla, E. M., Micarelli, P., Galván-Magaña, F., & Sperone, E. (2019c). The surface behaviour of white sharks during ecotourism: A baseline for monitoring this threatened species around Guadalupe Island, Mexico. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(5), 773-782.

Becerril-García, E. E., Rosales-Nanduca, H., Paniagua-Mendoza, A., Robles-Hernández, R., & Elorriaga-Verplancken, F. R. (2019d). Records of Whalesuckers (*Remora australis*) on Short-Beaked Common Dolphins (*Delphinus delphis*) in the Gulf of California, Mexico. *Aquatic Mammals*, 45(3), 299-302.

Becerril-García, E. E., Arellano-Martínez, M., Bernot-Simon, D., Hoyos-Padilla, E. M., Galván-Magaña, F., & Godard-Codding, C. (2020a). Steroid hormones and chondrichthyan reproduction: physiological functions, scientific research, and implications for conservation. *PeerJ*, 8, e9686.

Becerril-García, E. E., Bernot-Simon, D., Arellano-Martínez, M., Galván-Magaña, F., Santana-Morales, O., & Hoyos-Padilla, E. M. (2020b). Evidence of interactions

- between white sharks and large squids in Guadalupe Island, Mexico. *Scientific reports*, 10(1), 1-6.
- Becerril-García, E. E., Hoyos-Padilla, E. M., Henning, B., & Salinas-De León, P. (2020c). Sharks, rays, and chimaeras of the Revillagigedo National Park: An update of new and confirmed records. *Journal of Fish Biology*, 97(4), 1228-1232.
- Becerril-García, E. E., Hoyos-Padilla, E. M., Micarelli, P., Galván-Magaña, F., & Sperone, E. (2020d). Behavioural responses of white sharks to specific baits during cage diving ecotourism. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
- Becerril-García, E. E., Hoyos-Padilla, E. M., Santana-Morales, O., Gutiérrez-Ortiz, M. A., Ayala-Bocos, A., & Galván-Magaña, F. (2020e). An estimate of the number of white sharks *Carcharodon carcharias* interacting with ecotourism in Guadalupe Island. *Journal of Fish Biology*, 97(6), 1861-1864.
- Becerril-García, E. E., Martínez-Rincón, R. O., Galván-Magaña, F., Santana-Morales, O., & Hoyos-Padilla, E. M. (2020f). Statistical modelling reveals spatial, temporal, and environmental preferences for white sharks at an oceanic aggregation site. *Marine Ecology Progress Series*, 655, 171-183.
- Becerril-García, E. E., Salomón-Aguilar, C. A., Serrano-Gómez, F. J., Jiménez-Pérez A. A., & Hoyos-Padilla M. (2020g). Tiburones y rayas: riqueza de especies, investigación y aprovechamiento en la Bahía de La Paz. En: Riosmena, R. R., López Vivas, J. M., Gómez-Gallardo-Unzueta, E. A., Cruz Piñón, G., Romo-Piñera, A. K., (Eds.). *La Bahía de La Paz: Biodiversidad, procesos ecológicos y sociales*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, México.
- Becerril-García, E. E., Pancaldi, F., Cruz-Villacorta, A. A., Rivera-Camacho, A. R., Aguilar-Cruz, C. A., Whitehead, D. A., ... & Galván-Magaña, F. (2021). General descriptions of the dermis structure of a juvenile whale shark *Rhincodon typus* from the Gulf of California. *Journal of Fish Biology*, 99(4), 1524-1528.

- Becerril-García, E. E., Arauz, R., Arellano-Martínez, M., Bonfil, R., Ayala-Bocos, A., Castillo-Géniz, J. L., ... & Godard-Coding, C. A. (2022). Research priorities for the conservation of chondrichthyans in Latin America. *Biological Conservation*, 269, 109535.
- Bessudo, S., Soler, G. A., Klimley, A. P., Ketchum, J. T., Hearn, A., & Arauz, R. (2011). Residency of the scalloped hammerhead shark (*Sphyrna lewini*) at Malpelo Island and evidence of migration to other islands in the Eastern Tropical Pacific. *Environmental Biology of Fishes*, 91(2), 165-176.
- Bhawani SA, Sulaiman O, Hashim R, Ibrahim MN (2010) Thin-layer chromatographic analysis of steroids: A review. *Trop J Pharm Res* 9(3) <https://doi.org/10.4314/tjpr.v9i3.56293>
- Boggs AS, Schock TB, Schwacke LH, Galligan TM, Morey JS, McFee WE, Kucklick JR (2017) Rapid and reliable steroid hormone profiling in *Tursiops truncatus* blubber using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Anal Bioanal Chem* 409(21): 5019-5029.
- Bonfil R, Meýer M, Scholl MC, Johnson R, O'Brien S, Oosthuizen H, ... Paterson M. (2005). Transoceanic migration, spatial dynamics, and population linkages of white sharks. *Science*, 310(5745), 100-103.
- Bonfil R, O'Brien S. (2015). Strongly directional and differential swimming behavior of an adult female white shark, *Carcharodon carcharias* (Chondrichthyes: Lamnidae) from Guadalupe Island, Mexico. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1), 267-273.
- Boustany AM *et al* (2002) Expanded niche for white sharks. *Nature* 415, 35–36. <https://doi.org/10.1038/415035b>
- Bouyoucos IA, Weideli OC, Planes S, Simpfendorfer CA, Rummer JL (2018) Dead tired: evaluating the physiological status and survival of neonatal reef sharks under stress. *Conservation physiology*, 6(1), coy053.

- Bruce BD y Bradford RW (2012) Habitat use and spatial dynamics of juvenile white sharks, *Carcharodon carcharias*, in eastern Australia. *Global perspectives on the biology and life history of the white shark*, 225-254.
- Brunnschweiler JM, Ward-Paige CA (2014) Shark fishing and tourism. *Oryx*, 48(4), 486-487.
- Bubley WJ, Sulikowski JA, Koester DM, Tsang PC (2013) Using a multi-parameter approach to reassess maturity of spiny dogfish, *Squalus acanthias*, following increased fishing pressure in the Western North Atlantic. *Fish Res* 147:202-212 <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.06.004>
- Burgess GH, Bruce BD, Cailliet GM, Goldman KJ, Grubbs RD, Lowe CG... O'Sullivan JB (2014) A re-evaluation of the size of the white shark (*Carcharodon carcharias*) population off California, USA. *PLoS One*, 9(6), e98078.
- Cailliet GM, Natanson LJ, Welden BA, Ebert DA (1985) Preliminary studies on the age and growth of the white shark, *Carcharodon carcharias*, using vertebral bands. *Memoirs of the Southern California Academy of Sciences*, 9(4), 49-60.
- Callard G, Mak P, DuBois W, Cuevas ME (1989) Regulation of spermatogenesis: the shark testis model. *J Ex Zool* 252(S2): 23-34.
- Camilleri J, Vulliet E (2015) Determination of steroid hormones in sediments based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (modified-QuEChERS) extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical Methods*, 7(22), 9577-9586.
- Cárdenas-Hinojosa, G., Hoyos-Padilla, M., & Rojas-Bracho, L. (2015). Occurrence of Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*) at Guadalupe Island, Mexico, from 2006 to 2009. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 10(1), 38-47.
- Carrier JC, Pratt Jr HL, Martin LK (1994) Group reproductive behaviors in free-living nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum*. *Copeia*, 646-656.
- Carrier JC, Pratt HL, Castro JI (2004) Reproductive biology of elasmobranchs. *Biology of sharks and their relatives*, 10, 269-286.

- Castañeda-Beltrán, E. (1988). Prospección de la fauna ictiológica de Isla Clarión. *México. Biol. Mar. (Secr. de Marina, Méx.)*, 4(3), 97-136.
- Castrejón, M., & Charles, A. (2013). Improving fisheries co-management through ecosystem-based spatial management: the Galapagos Marine Reserve. *Marine Policy*, 38, 235-245.
- Castro JI, Sato K, Bodine AB (2016) A novel mode of embryonic nutrition in the tiger shark, *Galeocerdo cuvier*. *Mar Bio Res* 12(2):200-205 <https://doi.org/10.1080/17451000.2015.1099677>
- Castro-Aguirre, J.L. & Balart, E.F. (2002) La ictiofauna de las Islas Revillagigedo y sus relaciones zoogeográficas, con comentarios acerca de su origen y evolución. In: Lozano-Vilano, M.L. (Ed.), Libro jubilar en honor del Dr. Salvador Contreras Balderas. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, pp. 153–170.
- Cerutti-Pereyra, F., Yáñez, A. B., Ebert, D. A., Arnés-Urgellés, C., Salinas-de-León, P., Darwin, C., & Ayora, P. (2018). New record and range extension of the Deepsea Skate, *Bathyraja abyssicola* (Chondrichthyes: Arhynchobatidae), in the Galapagos Islands. *Journal of the Ocean Science Foundation*, 30, 85-89.
- Chapman DD, Shivji MS, Louis E, Sommer J, Fletcher H, Prodöhl PA (2007) Virgin birth in a hammerhead shark. *Biology Letters*, 3(4), 425-427.
- Cisneros-Montemayor, A. M., Becerril-García, E. E., Berdeja-Zavala, O., & Ayala-Bocos, A. (2020). Shark ecotourism in Mexico: Scientific research, conservation, and contribution to a Blue Economy. *Conservation of Mexican Shark, Academic Press*. [https://doi.org/10.1016/bs.amb, 3](https://doi.org/10.1016/bs.amb.3).
- Clua E, Buray N, Legendre P, Mourier J, Planes S (2011) Business partner or simple catch? The economic value of the sicklefin lemon shark in French Polynesia. *Marine and Freshwater Research*, 62(6), 764-770.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca CONAPESCA (2020) Anuario estadístico de Acuacultura y Pesca. Mazatán, Sinaloa, 287 pp.

- Compagno, L. J. V. (1973). Interrelationships of living elasmobranchii. *Zool. J. Linne. Soc*, 53, 15.
- Compagno, L. J. V. (2001). Sharks of the world, An Annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. *FAO species catalogue for fishery purposes*, No1, Volume 2.
- Compagno L, Dando M, Fowler S (2005) *Sharks of the World*. Harper Collins, London.
- Cortés, J., & Blum, S. (2008). Life to 450 m depth at Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 189-206.
- Del Moral-Flores, L. F., Negrete, J. M. G., & Camacho, A. F. G. (2016). Peces del archipiélago de las islas Revillagigedo: una actualización sistemática y biogeográfica. *Biocyt: Biología, Ciencia y Tecnología*, 9(33), 596-619.
- Demski LS y Northcutt RG (1996) The brain and cranial nerves of the white shark: an evolutionary perspective. In *Great White Sharks* (pp. 121-130). Academic Press.
- Diamandis EP (1988) Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: principles and applications. *Clin Biochem* 21(2):139-150
[https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(88\)80104-8](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(88)80104-8)
- Diario Oficial de la Federación DOF (2005) DECRETO por el que se declara área natural protegida, con la categoría de reserva de la biosfera, la zona marina y terrestre que incluye a la Isla Guadalupe, de jurisdicción federal, así como a las demás superficies emergidas que se encuentran dentro de la misma, localizada en el Océano Pacífico, frente a la costa de la Península de Baja California, con una superficie total de 476,971-20-15.79 hectáreas.
- Diario Oficial de la Federación DOF (2006) Norma Oficial Mexicana NOM-029-PESC-2006, Pesca responsable de tiburones y rayas. Especificaciones para su aprovechamiento.
- Diario Oficial de la Federación DOF (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y

fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.

Diario Oficial de la Federación DOF (2014) ACUERDO por el que se establece veda permanente para la pesca de tiburón blanco (*Carcharodon carcharias*) en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos.

Diario Oficial de la Federación DOF (2018) ACUERDO por el que se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera.

Dillon EM, Bagla A, Plioplys KD, McCauley DJ, Lafferty KD, & Dea, A. O. (2022). Dermal denticle shedding rates vary between two captive shark species. *Marine Ecology Progress Series*, 682, 153-167.

Dines S, Gennari E (2020) First observations of white sharks (*Carcharodon carcharias*) attacking a live humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Marine and Freshwater Research*, 71(9), 1205-1210.

Di Prisco CL, Vellano C, Chieffi G (1967) Steroid hormones in the plasma of the elasmobranch *Torpedo marmorata* at various stages of the sexual cycle. *Gen Comp Endocr* 8(2):325-331 [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(67\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0016-6480(67)90080-9)

Diotel N, Do-Rego JL, Anglade I, Vaillant C, Pellegrini E, Vaudry H, Kah O (2011) The brain of teleost fish, a source, and a target of sexual steroids. *Front Neurosci* 5: 137 <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00137>

Dodd JM, Goddard CK (1961) Some effects of oestradiol benzoate on the reproductive ducts of the female dogfish *Scyliorhinus caniculus*. *Proc Zool Soc Lond* 137(3):325-331 <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1961.tb05907.x>

Domeier, M. L. (2012). A new life-history hypothesis for white sharks, *Carcharodon carcharias*, in the Northeastern Pacific. *Global perspectives on the biology and life history of the white shark*, 199-224.

Dulvy NK, Pacoureau N, Rigby CL, Pollom RA, Jabado RW, Ebert DA, Finucci B, Pollock CM, Cheok J, Derrick DH, Herman KB, Sherman CS, VanderWright WJ, Lawson JM, Walls RHL, Carlson JK, Charvet P, Bineesh KK, Fernando D, Ralph

- GM, Matsushiba JH, Hilton-Taylor C, Fordham SV, Simpfendorfer CA (2021) Overfishing drives over one-third of all sharks and rays toward a global extinction crisis. *Current Biology* 10.1016/j.cub.2021.08.062
- Ehret DJ, MacFadden BJ, Salas-Gismondi R (2009) Caught in the act: trophic interactions between a 4-million-year-old white shark (*Carcharodon*) and mysticete whale from Peru. *Palaios*, 24(5), 329-333.
- Elisio M, Awruch CA, Massa AM, Macchi GJ, Somoza GM (2019) Effects of temperature on the reproductive physiology of female elasmobranchs: The case of the narrownose smooth-hound shark (*Mustelus schmitti*). *Gen Comp Endocr* 284:113242 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113242>
- Ellis, R. & McCosker, J. E. *Great White Shark* (Stanford University Press, Stanford, 1991).
- Evans, K., Morrice, M., Hindell, M., & Thiele, D. (2002). Three mass strandings of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in southern Australian waters. *Marine Mammal Science*, 18(3), 622-643.
- Fallows C, Gallagher AJ, Hammerschlag N (2013) White sharks (*Carcharodon carcharias*) scavenging on whales and its potential role in further shaping the ecology of an apex predator. *PloS one*, 8(4), e60797.
- Fasano S, d'Antonio M, Pierantoni R, Chieffi G (1992) Plasma and follicular tissue steroid levels in the elasmobranch fish, *Torpedo marmorata*. *Gen Comp Endocr* 85(2):327-333 [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(92\)90017-e](https://doi.org/10.1016/0016-6480(92)90017-e)
- Feldheim KA, Chapman DD, Sweet D, Fitzpatrick S, Prodöhl PA, Shivji MS, Snowden B (2010) Shark virgin birth produces multiple, viable offspring. *Journal of Heredity*, 101(3), 374-377.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E., & Niem, V. H. (1995). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro Oriental. Volumen II. Vertebrados-Parte 1. Rome, Italy, FAO., 563 pp.

- Fourrière, M., Reyes-Bonilla, H., Ayala-Bocos, A., Ketchum, J. A., & Chávez-Comparan, J. C. (2016). Checklist and analysis of completeness of the reef fish fauna of the Revillagigedo Archipelago, Mexico. *Zootaxa*, 4150(4), 436-466.
- Francis, M. P. (1996). Observations on a pregnant white shark with a review of reproductive biology. *Great white sharks: the biology of Carcharodon carcharias*, 157, 172.
- Francis, M. P., Duffy, C. A., Bonfil, R., & Manning, M. J. (2012). Vertical Habitat Use by White Sharks, *Carcharodon carcharias*, in New Zealand and in Oceanic and Tropical Waters of the Southwest Pacific Ocean. *Global Perspectives on the Biology and Life History of the White Shark*, 319.
- Froese, R. & D. Pauly. Editors. (2019). FishBase. World Wide Web electronic publication. Available at <https://www.fishbase.org> pages (last accessed 31 Mar 2020).
- Fujinami Y, Semba Y (2020) Non-Letal assessment of reproductive stage for female blue sharks *Prionace glauca* using sex steroid hormones. *J Fish Biol* <https://doi.org/10.1111/jfb.14312>
- Gallagher, A. J., & Hammerschlag, N. (2011). Global shark currency: the distribution, frequency, and economic value of shark ecotourism. *Current Issues in Tourism*, 14(8), 797-812.
- Gallagher, A. J., Kyne, P. M., & Hammerschlag, N. (2012). Ecological risk assessment and its application to elasmobranch conservation and management. *Journal of Fish Biology*, 80(5), 1727-1748.
- Galván-Magaña F. *et al.* Shark predation on cephalopods in the Mexican and Ecuadorian Pacific Ocean. *Deep-Sea Res. PT. II* **95**, 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.04.002> (2013).
- Galván-Magaña, F., Castillo-Geniz, J. L., Hoyos-Padilla, M., Ketchum, J., Klimley, A. P., Ramírez-Amaro, S., ... & Tovar-Ávila, J. (2019). Shark ecology, the role of

the apex predator and current conservation status. *Advances in marine biology*, 83, 61-114.

Garnier DH, Sourdain P, Jégou B (1999) Seasonal variations in sex steroids and male sexual characteristics in *Scyliorhinus canicula*. *Gen Comp Endocr* 116(2):281-290 <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7369>

GBIF: The Global Biodiversity Information Facility. (2020). *Diplobatis ommata*. Available at <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> (last accessed 27 Mar 2020).

Gelsleichter J, Rasmussen LEL, Manire CA, Tyminski J, Chang B, Lombardi-Carlson L (2002) Serum steroid concentrations and development of reproductive organs during puberty in male bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*. *Fish Physiol Biochem* 26(4):389-401 <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000009292.70958.65>

Gelsleichter J, Walsh CJ, Szabo NJ, Rasmussen LE (2006) Organochlorine concentrations, reproductive physiology, and immune function in unique populations of freshwater Atlantic stingrays (*Dasyatis sabina*) from Florida's St. Johns River. *Chemosphere* 63(9):1506-1522 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.011>

Gelsleichter J, Evans AN (2012) Hormonal regulation of elasmobranch physiology. In: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR (eds) *Biology of Sharks and Their Relatives*, 2nd edn. CRC Press, pp 313–348.

Giddens, J., Goodell, W., Friedlander, A., Salinas-de-León, P., Shepard, C., Henning, B., ... & Turchik, A. (2019). Patterns in bathyal demersal biodiversity and community composition around archipelagos in the Tropical Eastern Pacific. *Frontiers in Marine Science*.

Gilly, W. F., Markaida, U., Baxter, C. H., Block, B. A., Boustany, A., Zeidberg, L., ... & Salinas, C. (2006). Vertical and horizontal migrations by the jumbo squid *Dosidicus gigas* revealed by electronic tagging. *Marine Ecology Progress Series*, 324, 1-17.

- Goldsmith SJ (1975) Radioimmunoassay: Review of basic principles. *Semin Nucl Med* 5(2):125-152 [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(75\)80028-6](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(75)80028-6)
- Gordon, I. (1993). Pre-copulatory behaviour of captive sandtiger sharks, *Carcharias taurus*. In *The reproduction and development of sharks, skates, rays and ratfishes* (pp. 159-164). Springer, Dordrecht.
- Gottfried H, Chieffi G (1967) The seminal steroids of the dogfish *Scylliorhinus stellaris*. *J Endocrinol* 37(1):99-100 <https://doi.org/10.1677/joe.0.0370099>
- Guida L, Awruch C, Walker TI, Reina RD (2017) Prenatal stress from trawl capture affects mothers and neonates: a case study using the southern fiddler ray (*Trygonorrhina dumerilii*). *Sci Rep* 7:46300 <https://doi.org/10.1038/srep46300>.
- Hamlett WC (2011) Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids, and chimaeras, vol 3. CRC Press.
- Hammerschlag N, Sulikowski J (2011) Killing for conservation: the need for alternatives to Lethal sampling of apex predatory sharks. *Endanger Species Res* 14(2):135-140 <https://doi.org/10.3354/esr00354>
- Hayden M, Bhawal R, Escobedo J, Harmon C, O'Hara T, Klein D, San-Francisco S, Zabet-Moghaddam M, Godard-Codding CA (2017) Nano-LC-MS/MS analysis of steroids from gray whale blubber. *Rapid Comm Mass Spectrom* 31: 1088-1094 DOI: 10.1002/rcm.7884.
- Henningsen AD, Murru FL, Rasmussen LEL, Whitaker BR, Violetta GC (2008) Serum levels of reproductive steroid hormones in captive sand tiger sharks, *Carcharias taurus* (Rafinesque), and comments on their relation to sexual conflicts. *Fish Physiol Biochem* 34(4):437 <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9202-9>
- Heupel MR, Whittier JM, Bennett MB (1999) Plasma steroid hormone profiles and reproductive biology of the epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum*. *J Exp Zool* 284(5):586-594 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19991001\)284:5<586::AID-JEZ14>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19991001)284:5<586::AID-JEZ14>3.0.CO;2-B)

- Hoffmayer ER, Sulikowski JA, Hendon JM, Parsons GR (2010) Plasma steroid concentrations of adult male Atlantic sharpnose sharks, *Rhizoprionodon terraenovae*, in the northern Gulf of Mexico, with notes on potential long term shifts in reproductive timing. *Environ Biol Fishes* 88(1):1-7
<https://doi.org/10.1007/s10641-010-9603-3>
- Hoyos-Padilla M, Papastamatiou YP, O'Sullivan J, Lowe CG (2013) Observation of an attack by a cookiecutter shark (*Isistius brasiliensis*) on a white shark (*Carcharodon carcharias*). *Pacific Science*, 67(1), 129-134.
- Hoyos-Padilla EM, Klimley AP, Galván-Magaña F, Antoniou A (2016) Contrasts in the movements and habitat use of juvenile and adult white sharks (*Carcharodon carcharias*) at Guadalupe Island, Mexico. *Animal Biotelemetry*, 4(1), 1-14.
- Hull PM (2017) Emergence of modern marine ecosystems. *Current Biology*, 27(11), R466-R469.
- Huveneers C, Apps K, Becerril-García EE, Bruce B, Butcher PA, Carlisle AB, Chapple TK, Christiansen HM, Cliff G, Curtis TH, Daly-Engel TS, Dewar H, Dicken ML, Domeier ML, Duffy CAJ, Ford R, Francis MP, French GCA, Galván-Magaña F, García-Rodríguez E, Gennari E, Graham B, Hayden B, Hoyos-Padilla EM, Hussey NE, Jewell OJD, Jorgensen SJ, Kock AA, Lowe CG, Lyons K, Meyer L, Oelofse G, Oñate-González EC, Oosthuizen E, O'Sullivan JB, Ramm K, Skomal G, Sloan S, Smale MJ, Sosa-Nishizaki O, Sperone E, Tamburin E, Towner AV, Wcisel MA, Weng KC, Werry JM (2018) Future research directions on the “Elusive” White Shark. *Front Mar Sci* 5:455
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00455>
- Idler DR (2012) Steroids in nonmammalian vertebrates. Academic Press, New York.
- Iki A, Anderson WG, Deck CA, Ogihara MH, Ikeba K, Kataoka H, Hyodo S (2020) Measurement of 1 α hydroxycorticosterone in the Japanese banded houndshark, *Triakis scyllium*, following exposure to a series of stressors. *Gen Comp Endocr* 292: 113440.

INAPESCA (2021) Tiburones Mexicanos de importancia pesquera en la CITES. Parte II. Ciudad de México, México.

IUCN (2020) The IUCN Red List of Threatened Species. Available at <https://www.iucnredlist.org> (last accessed 01 Apr 2020).

James, K. C., Ebert, D. A., Long, D. J., & Didier, D. A. (2009). A new species of chimaera, *Hydrolagus melanophasma* sp. nov. (Chondrichthyes: Chimaeriformes: Chimaeridae), from the eastern North Pacific. *Zootaxa*, 2218(1), 59-68.

Jaime-Rivera M, Caraveo-Patiño J, Hoyos-Padilla EM, Galván-Magaña F (2014) Feeding and migration habits of white shark *Carcharodon carcharias* (Lamniformes: Lamnidae) from Isla Guadalupe inferred by analysis of stable isotopes $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$. *Rev. Biol. Trop*, 62(2), 637-647. <https://doi.org/10.15517/RBT.V62I2.7767>.

Johnson RH, Nelson DR (1978) Copulation and possible olfaction-mediated pair formation in two species of carcharhinid sharks. *Copeia*, 1978(3), 539-542.

Jorgensen SJ, Arnoldi NS, Estess EE, Chapple TK, Rückert M, Anderson SD, Block BA (2012) Eating or meeting? Cluster analysis reveals intricacies of white shark (*Carcharodon carcharias*) migration and offshore behavior. *PloS one*, 7(10), e47819.

Kajiura SM, Sebastian AP, Tricas TC (2000) Dermal bite wounds as indicators of reproductive seasonality and behaviour in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Environmental Biology of Fishes*, 58(1), 23-31.

Katsu Y, Kohno S, Narita H, Urushitani H, Yamane K, Hara A, Clauss TM, Walsh MT, Miyagawa S, Guillette Jr LJ, Iguchi T. (2010). Cloning and functional characterization of Chondrichthyes, cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame* and whale shark, *Rhincodon typus* estrogen receptors. *Gen Comp Endocr* 168(3): 496-504.

- Klimley AP (1987) The determinants of sexual segregation in the scalloped hammerhead shark, *Sphyrna lewini*. *Environmental Biology of Fishes*, 18(1), 27-40.
- Kim SL, Tinker MT, Estes JA, Koch PL (2012) Ontogenetic and among-individual variation in foraging strategies of northeast Pacific white sharks based on stable isotope analysis.
- Kneebone J, Ferguson DE, Sulikowski JA, Tsang PC (2007) Endocrinological investigation into the reproductive cycles of two sympatric skate species, *Malacoraja senta* and *Amblyraja radiata*, in the western Gulf of Maine. In: Ebert DA, Sulikowski JA (eds) *Biology of Skates*. Dordrecht, Springer, pp 151-159.
- Kock A, O’Riain MJ, Mauff K, Meyer M, Kotze D, Griffiths C (2013) Residency, habitat use and sexual segregation of white sharks, *Carcharodon carcharias* in False Bay, South Africa. *PloS one*, 8(1), e55048.
- Koob TJ, Tsang P, Callard IP (1986) Plasma estradiol, testosterone, and progesterone levels during the ovulatory cycle of the skate (*Raja erinacea*). *Biol Reprod* 35(2):267-275 <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.2.267>
- Koob TJ, Laffan JJ, Callard IP (1984) Effects of Retaxin and Insulin on Reproductive Tract Size and Early Fetal Loss in *Squalus acanthias*. *Biol Reprod* 31(2): 231-238.
- Lara-Lizardi, F., Hoyos-Padilla, M., Ketchum, J. T., & Galván-Magaña, F. (2018). Range expansion of the whitenose shark, *Nasolamia velox*, and migratory movements to the oceanic Revillagigedo Archipelago (west Mexico). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(4), 949-953.
- Last, P., Naylor, G., Séret, B., White, W., de Carvalho, M., & Stehmann, M. (Eds.). (2016). *Rays of the World*. CSIRO publishing.
- Lester, S. E., Halpern, B. S., Grorud-Colvert, K., Lubchenco, J., Ruttenberg, B. I., Gaines, S. D., ... & Warner, R. R. (2009). Biological effects within no-take marine reserves: a global synthesis. *Marine Ecology Progress Series*, 384, 33-46.

- Long DJ, Jones RE (1996) White shark predation and scavenging on cetaceans in the eastern North Pacific Ocean. *Great white sharks: the biology of Carcharodon carcharias*, 293-307.
- Lyons K, Wynne-Edwards KE (2019) Steroid concentrations in maternal serum and uterine histotroph in round stingrays (*Urobatis halleri*). *Gen Comp Endocr* 274:8-16 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.12.009>
- MacKeracher T, Diedrich A, Simpfendorfer CA (2019) Sharks, rays and marine protected areas: A critical evaluation of current perspectives. *Fish Fish* 20(2):255-267 <https://doi.org/10.1111/faf.12337>
- Maestro M, Pérez-Cayeiro ML, Chica-Ruiz JA, Reyes H (2019) Marine protected areas in the 21st century: Current situation and trends. *Ocean Coast Manage* 171:28-36 <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2019.01.008>
- Malpica-Cruz, L., Abadía-Cardoso, A., Aquino-Baleyto, M., Beas-Luna, R., Becerril-García, E. E., Castillo-Géniz, J. L., ... & Zepeda-Domínguez, J. A. (2021). Empowering fishers for Great White Shark stewardship: Reply to Madigan et al. 2021. *Conservation Letters*, 14(4).
- Manire CA, Rasmussen LEL, Hess DL, Hueter RE (1995) Serum steroid hormones and the reproductive cycle of the female bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*. *Gen Comp Endocr* 97(3):366-376 <https://doi.org/10.1006/gcen.1995.1036>
- Manire CA, Rasmussen LEL (1997) Serum concentrations of steroid hormones in the mature male bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*. *Gen Comp Endocr* 107(3):414-420 <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6937>
- Manire CA, Rasmussen LEL, Gross TS (1999) Serum steroid hormones including 11-ketotestosterone, 11-ketoandrostenedione, and dihydroprogesterone in juvenile and adult bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*. *J Exp Zool* 284(5):595-603 [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19991001\)284:5<595::aid-jez15>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19991001)284:5<595::aid-jez15>3.0.co;2-6)

- Manire CA, Rasmussen LEL, Gelsleichter J, Hess DL (2004) Maternal serum and yolk hormone concentrations in the Placentario bonnethead shark, *Sphyrna tiburo*. *Gen Comp Endocr* 136(2):241-247
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.12.018>
- Manire CA, Rasmussen LEL, Maruska KP, Tricas TC (2007) Sex, seasonal, and stress-related variations in elasmobranch corticosterone concentrations. *Comp Biochem Phys A* 148(4):926-935 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.09.017>
- Maruska KP, Gelsleichter J (2011) Hormones and reproduction in chondrichthyan fishes. In: Norris D, Lopez KH (eds) *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Academic Press, pp 209-237
- Matsumoto R, Matsumoto Y, Ueda K, Suzuki M, Asahina K, Sato K (2019) Sexual maturation in a male whale shark (*Rhincodon typus*) based on observations made over 20 years of captivity. *Fish Bull* 117 <https://doi.org/10.2108/zs150040>
- Medellín-Ortiz, A., Cadena-Cárdenas, L., & Santana-Morales, O. (2016). Environmental effects on the jumbo squid fishery along Baja California's west coast. *Fisheries science*, 82(6), 851-861.
- Meléndez E. y C.J. Villavicencio-Garayazar, 1998. Cuatro tiburones y una raya en la costa noroccidental de México. *Revista de Biología Tropical*, 46: 465-467.
- Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM (2015) *Williams Textbook of Endocrinology*. Elsevier Health Sciences <https://doi.org/10.1016/C2013-0-15980-6>
- Miller, D. J., & Lea, R. N. (1976). *Guide to the coastal marine fishes of California* (Vol. 4065). University of California, Agriculture and Natural Resources. Ocean Biographic Information System (OBIS). (2020). Available at <https://obis.org/> (last accessed 01 Apr 2020).
- Mohan, J. A., Jones, E. R., Hendon, J. M., Falterman, B., Boswell, K. M., Hoffmayer, E. R., & Wells, R. D. (2020). Capture stress and post-release mortality of blacktip

sharks in recreational charter fisheries of the Gulf of Mexico. *Conservation Physiology*, 8(1), coaa041.

Mull CG, Lowe CG, Young KA (2008) Photoperiod and water temperature regulation of seasonal reproduction in male round stingrays (*Urobatis halleri*). *Comp Biochem Phys A* 151(4):717-725 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.08.029>

Mull CG, Lowe CG, Young KA (2010) Seasonal reproduction of female round stingrays (*Urobatis halleri*): steroid hormone profiles and assessing reproductive state. *Gen Comp Endocr* 166(2):379-387 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.12.009>.

Munaretto JS, Ferronato G, Ribeiro LC, Martins ML, Adaime MB, Zanella R (2013) Development of a multiresidue method for the determination of endocrine disruptors in fish fillet using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta*, 116, 827-834.

Musyl, M. K., & Gilman, E. L. (2019). Meta-analysis of post-release fishing mortality in apex predatory pelagic sharks and white marlin. *Fish and Fisheries*, 20(3), 466-500.

Mylniczenko ND, Sumigama S, Wyffels JT, Wheaton CJ, Guttridge TL, DiRocco S, Penfold LM (2019) Ultrasonographic and hormonal characterization of reproductive health and disease in wild, semiwild, and aquarium-housed southern stingrays (*Hypnus americanus*). *Am J Vet Res* 80(10): 931-942. <https://doi.org/10.2460/ajvr.80.10.931>

NOAA Fisheries. 2022. <https://www.fisheries.noaa.gov>

Nau MR, O'Brien JK, Schmitt TL, Nollens HH, Robeck TR (2018) Diagnostic assessment of reproductive status in white-spotted bamboo sharks (*Chiloscyllium plagiosum*). *Anim Reprod Sci* 197:48-57 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.005>

Nelson JS, Grande TC, Wilson MV (2016) *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, New Jersey.

- Northcutt RG (1978) Brain organization in the cartilaginous fishes. *Sensory biology of sharks, skates, and rays*, 117-193.
- Nozu R, Murakumo K, Matsumoto R, Nakamura M, Ueda K, Sato K (2015) Gonadal morphology, histology, and endocrinological characteristics of immature female whale sharks, *Rhincodon typus*. *Zool Sci* 32(5):455-458 <https://doi.org/10.2108/zs150040>.
- Nozu R, Murakumo K, Matsumoto R, Matsumoto Y, Yano N, Nakamura M, Yanagisawa M, Ueda K, Sato K (2017) High-resolution monitoring from birth to sexual maturity of a male reef manta ray, *Mobula alfredi*, held in captivity for 7 years: changes in external morphology, behavior, and steroid hormones levels. *BMC Zool* 2(1):14 <https://doi.org/10.1186/s40850-017-0023-0>
- Nozu R, Murakumo K, Yano N, Furuyama R, Matsumoto R, Yanagisawa M, Sato K (2018) Changes in sex steroid hormone levels reflect the reproductive status of captive female zebra sharks (*Stegostoma fasciatum*). *Gen Comp Endocr* 265:174-179 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.03.006>.
- Oliveira, FADS, Pereira ENC, Gobbi JM, Soto-Blanco B, Melo MM (2018) Multiresidue method for detection of pesticides in beef meat using liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection (LC-MS) after QuEChERS extraction. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(1), 94-109.
- Pancaldi, F., Páez-Osuna, F., Soto-Jiménez, M. F., Whitehead, D. A., González-Armas, R., Vázquez-Haikin, A., ... & Galván-Magaña, F. (2021). Concentrations of Silver, Chrome, Manganese and Nickel in Two Stranded Whale Sharks (*Rhincodon typus*) from the Gulf of California. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107(5), 827-832.
- Papastamatiou, Y. P., Verbeck, D., Hutchinson, M., Bracken-Grissom, H. D., & Chapman, D. (2020). An encounter between a pelagic shark and giant cephalopod. *Journal of Fish Biology*, 97(2), 588-589.

- Parsons GR, Hoffmayer ER, Hendon JM, Bet-Sayad WV, Rocha MJ, Arukwe A, Kapoor BG (2008) A review of shark reproductive ecology: life history and evolutionary implications. *Fish reproduction*, 435-469.
- Pratt HL, Carrier JC (2001) A review of elasmobranch reproductive behavior with a case study on the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Environmental Biology of Fishes*, 60(1), 157-188.
- Pelletier G (2010) Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. In: Dierssen M (ed) Progress in Brain Research, vol 181. Elsevier, pp 193-207 [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81011-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81011-4)
- Petatán-Ramírez, D., Whitehead, D. A., Guerrero-Izquierdo, T., Ojeda-Ruiz, M. A., & Becerril-García, E. E. (2020). Habitat suitability of *Rhincodon typus* in three localities of the Gulf of California: Environmental drivers of seasonal aggregations. *Journal of Fish Biology*, 97(4), 1177-1186.
- Pethybridge HR, Parrish CC, Bruce BD, Young JW, Nichols PD (2014) Lipid, fatty acid and energy density profiles of white sharks: insights into the feeding ecology and ecophysiology of a complex top predator. *PLoS One*, 9(5), e97877.
- Prisco M, Valiante S, Maddalena Di Fiore M, Raucci F, Del Giudice G, Romano M, Laforgia V, Limatola E, Andreuccetti (2008) Effect of 17 β -estradiol and progesterone on vitellogenesis in the spotted ray *Torpedo marmorata* Risso 1810 (Elasmobranchii: Torpediniformes): studies on females and on estrogen-treated males. *Gen Comp Endocr* (2):125-132 <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.04.011>
- Prohaska BK, Tsang PC, Driggers III WB, Hoffmayer ER, Sulikowski JA (2013a) Development of a non-Lethal and minimally invasive protocol to study elasmobranch reproduction. *Mar Coast Fish* 5(1):181-188 <https://doi.org/10.1080/19425120.2013.788590>
- Prohaska BK, Tsang PC, Driggers III WB, Hoffmayer ER, Wheeler CR, Brown AC, Sulikowski JA (2013b) Assessing reproductive status in elasmobranch fishes

using steroid hormones extracted from skeletal muscle tissue. *Conserv Physiol* 1(1):cot028 <https://doi.org/10.1093/conphys/cot028>

Prohaska BK, Tsang PCW, Driggers III WB, Hoffmayer ER, Wheeler CR, Sulikowski JA (2018) Effects of delayed phlebotomy on plasma steroid hormone concentrations in two elasmobranch species. *J Appl Ichthyol* 34(4):861-866 <https://doi.org/10.1111/jai.13700>

Ramírez-Amaro SR, Cartamil D, Galvan-Magaña F, Gonzalez-Barba G, Graham JB, Carrera-Fernandez M, ... y Rochin-Alamillo A (2013) The artisanal elasmobranch fishery of the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico, management implications. *Scientia Marina*, 77(3), 473-487.

Rangel BS, Hammerschlag N, Sulikowski JA, Moreira RG (2021a). Physiological markers suggest energetic and nutritional adjustments in male sharks linked to reproduction. *Oecologia*, 196(4), 989-1004.

Rangel BS, Moreira RG, Niella YV, Sulikowski JA, Hammerschlag N (2021b) Metabolic and nutritional condition of juvenile tiger sharks exposed to regional differences in coastal urbanization. *Science of the Total Environment*, 780, 146548.

Rasmussen LEL, Murru FL (1992) Long-term studies of serum concentrations of reproductively related steroid hormones in individual captive carcharhinids. *Mar Freshwater Res* 43(1):273-281 <https://doi.org/10.1071/MF9920273>

Rasmussen LE, Gruber SH (1993) Serum concentrations of reproductively-related circulating steroid hormones in the free-ranging lemon shark, *Negaprion brevirostris*. In: Wourms JP, Demski LS (eds) *The Reproduction and Development of Sharks, Skates, Rays and Ratfishes*. Dordrecht, Springer, pp 167-174. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-3450-9>

Rasmussen LEL, Hess DL, Luer CA (1999) Alterations in serum steroid concentrations in the clearnose skate, *Raja eglanteria*: correlations with season and reproductive status. *J Exp Zool* 284(5):575-585 [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19991001\)284:5<575::aid-jez13>3.3.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19991001)284:5<575::aid-jez13>3.3.co;2-9)

- Reichert, A. N., Lundsten, L., & Ebert, D. A. (2016). First North Pacific records of the pointy nosed blue chimaera, *Hydrolagus cf. trolli* (Chondrichthyes: Chimaeriformes: Chimaeridae). *Marine Biodiversity Records*, 9(1), 90.
- Rigby CL, Barreto R, Carlson J, Fernando D, Fordham S, Francis MP, Herman K, Jabado RW, Jones GCA, Liu KM, Lowe CG, Marshall A, Pacoureaux N, Romanov E, Sherley RB, Winker H (2022) *Carcharodon carcharias* (amended version of 2019 assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species 2022*: e.T3855A212629880. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2022-1.RLTS.T3855A212629880.en>. Accessed on 06 August 2022.
- Ritter EK, Amin RW (2019) Mating scars among sharks: evidence of coercive mating?. *acta ethologica*, 22(1), 9-16.
- Robbins RL (2007) Environmental variables affecting the sexual segregation of great white sharks *Carcharodon carcharias* at the Neptune Islands South Australia. *Journal of fish biology*, 70(5), 1350-1364.
- Rodríguez-Barreto, D., Jerez, S., Cejas, J. R., Martín, M. V., Acosta, N. G., Bolaños, A., & Lorenzo, A. (2012). Comparative study of lipid and fatty acid composition in different tissues of wild and cultured female broodstock of greater amberjack (*Seriola dumerili*). *Aquaculture*, 360, 1-9.
- Roe, H. S. J. (1969). The food and feeding habits of the sperm whales (*Physeter catodon* L.) taken off the west coast of Iceland. *ICES Journal of Marine Science*, 33(1), 93-102.
- Ruiz-Cooley, R. I., Markaida, U., Gendron, D., & Aguíñiga, S. (2006). Stable isotopes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) beaks to estimate its trophic position: comparison between stomach contents and stable isotopes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 86(2), 437-445.
- Ruiz-Jarabo I, Barragán-Méndez C, Jerez-Cepa I, Fernández-Castro M, Sobrino I, Mancera JM, Aerts J (2019) Plasma 1 α -hydroxycorticosterone as biomarker for acute stress in catsharks (*Scyliorhinus canicula*). *Frontiers in Physiology*, 10, 1217.

- Shen Q, Zhu X, Zhao Q, Li S, Wang Y, Xue J, Wang P (2021) QuEChERS and 96-well plate solid phase extraction for determination of vancomycin and norvancomycin in fish meat by UPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, 342, 128326.
- Saidi B, Bradai MN, Bouain A, Guelorget O, Capapé C. (2005). Capture of a pregnant female white shark, *Carcharodon carcharias* (Lamnidae) in the Gulf of Gabes (southern Tunisia, central Mediterranean) with comments on oophagy in sharks. *Cybium*, 29(3), 303-307.
- Santana-Morales O, Abadía-Cardoso A, Hoyos-Padilla M, Naylor GJ, Corrigan S, Malpica-Cruz L... Castillo-Géniz JL (2020) The smallest known free-living white shark *Carcharodon carcharias* (Lamniformes: Lamnidae): ecological and management implications. *Copeia*, 108(1), 39-46.
- Santana-Morales O, Hoyos-Padilla EM, Medellín-Ortíz A, Sepulveda C, Beas-Luna R, Aquino-Baleyto M... Castillo-Géniz JL (2021a) How much is too much? A carrying capacity study of white shark cage diving in Guadalupe Island, Mexico. *Marine Policy*, 131, 104588.
- Santana-Morales O, Zertuche-Chanes R, Hoyos-Padilla EM, Sepúlveda C, Becerril-García EE, Gallo-Reynoso JP... Beas-Luna R (2021b) An exploration of the population characteristics and behaviours of the white shark in Guadalupe Island, Mexico (2014–2019): Observational data from cage diving vessels. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*.
- Saito H, Sakai M, Wakabayashi T. (2014). Characteristics of the lipid and fatty acid compositions of the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*: The trophic relationship between the squid and its prey. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(3), 360-366.
- Sato K, Nakamura M, Tomita T, Toda M, Miyamoto K, Nozu R (2016) How great white sharks nourish their embryos to a large size: evidence of lipid histotrophy in lamnoid shark reproduction. *Biology open*, 5(9), 1211-1215.
- SEMARNAT, 2020. Programa de Acción para la Conservación de la Especie: Tiburón Blanco (*Carcharodon carcharias*).

- Sheldon JD, Allender MC, George RH, Bulman F, Abney K (2018) Reproductive hormone patterns in male and female cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) in an aquarium setting and correlation to ultrasonographic staging. *J Zoo Wildlife Med* 49(3):638-647 <https://doi.org/10.1638/2017-0247.1>
- Simpfendorfer, C. A., & Kyne, P. M. (2009). Limited potential to recover from overfishing raises concerns for deep-sea sharks, rays and chimaeras. *Environmental Conservation*, 36(2), 97-103.
- Simpson TH, Wright RS, Gottfried H (1963) Steroids in the semen of dogfish (*Squalus acanthias*). *J Endocrinol* 26(4):489-498 <https://doi.org/10.1677/joe.0.0260489>
- Simpson TH, Wright RS, Hunt SV (1964) Steroid biosynthesis in the testis of dogfish (*Squalus acanthias*). *J Endocrinol* 31(1):29-38 <https://doi.org/10.1677/joe.0.0310011>
- Skomal G y Bernal D (2010) Physiological responses to stress in sharks. In *Sharks and their relatives II* (pp. 475-506). CRC Press.
- Skomal GB, Hoyos-Padilla EM, Kukulya A, Stokey R (2015) Subsurface observations of white shark *Carcharodon carcharias* predatory behaviour using an autonomous underwater vehicle. *Journal of fish biology*, 87(6), 1293-1312.
- Smale, MJ y Cliff G (2010) Cephalopods in the diets of four shark species (*Galeocerdo cuvier*, *Sphyrna lewini*, *S. zygaena* and *S. mokarran*) from KwaZulu-Natal, South Africa. *Afr. J. Mar. Sci.* 20(1), 241-253. <https://doi.org/10.2989/025776198784126610>.
- Smale, M. J. & Cliff, G. White sharks and cephalopod prey. In *Global Perspectives on the Biology and Life History of the white shark* (ed Domeier, M. L.) (CRC Press, Boca Ratón, 2012)
- Smith, H. M., Preston, M. J., & Jones, R. E. (1989). Oviductal, not oviducal. *The Anatomical Record*, 223(4), 446-447.
- Smith, A. (1996). Cephalopod sucker design and the physical limits to negative pressure. *The Journal of experimental biology*, 199(4), 949-958.

- Snelson Jr FF, Rasmussen LEL, Johnson MR, Hess DL (1997) Serum concentrations of steroid hormones during reproduction in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Gen Comp Endocr* 108(1):67-79
<https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6949>
- Soldo A, Bradai MN, Walls RHL (2016) *Carcharodon carcharias*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016: e.T3855A16527829. Accessed on 06 August 2022.
- Sosa-Nishizaki, O., Morales-Bojórquez, E., Nasby-Lucas, N., Oñate-González, E., & Domeier, M. L. (2012). Problems with photo identification as a method of estimating abundance of white sharks, *Carcharodon carcharias*. *Global Perspectives on the Biology and Life History of the White Shark*, (CRC Press), 393-404.
- Spaet JLY (2021) *Carcharodon carcharias* (Green Status assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2021: e.T3855A385520221. Accessed on 06 August 2022.
- Strong WR, Murphy RC, Bruce BD, Nelson DR (1992) Movements and associated observations of bait-attracted white sharks, *Carcharodon carcharias*: a preliminary report. *Marine and Freshwater Research*, 43(1), 13-20.
- Strong WR, Bruce BD, Nelson DR, Murphy RD (1996) Population dynamics of white sharks in Spencer Gulf, South Australia.
- Sueiro MC, Awruch CA, Irigoyen AJ, Argemi F, Palacios MG (2019) Seasonality of immunological and health-state parameters of wild broadnose sevengill shark, *Notorynchus cepedianus*. *Physiol Biochem Zool* 92(1):24-36
<https://doi.org/10.1086/700573>.
- Sulikowski JA, Driggers WB, Ingram GW, Kneebone J, Ferguson DE, Tsang PC (2007) Profiling plasma steroid hormones: a Invasivo approach for the study of skate reproductive biology and its potential use in conservation management. In: Ebert DA, Sulikowski JA (eds) *Biology of Skates*. Dordrecht, Springer, pp 179-186
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9703-4_13

- Sulikowski JA, Kneebone J, Elzey S, Jurek J, Howell WH, Tsang PCW (2006) Using the composite variables of reproductive morphology, histology and steroid hormones to determine age and size at sexual maturity for the thorny skate *Amblyraja radiata* in the western Gulf of Maine. *J Fish Biol* 69(5):1449-1465 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01207>.
- Sulikowski JA, Tsang PCW, Howell WH (2004) An annual cycle of steroid hormone concentrations and gonad development in the winter skate, *Leucoraja ocellata*, from the western Gulf of Maine. *Mar Biol* 144(5):845-853 <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1264-8>
- Sulikowski JA, Tsang PC, Howell WH (2005) Age and size at sexual maturity for the winter skate, *Leucoraja ocellata*, in the western Gulf of Maine based on morphological, histological and steroid hormone analyses. *Environ Biol Fishes* 72(4):429-441 <https://doi.org/10.1007/s10641-004-2866-9>
- Sulikowski JA, Wheeler CR, Gallagher AJ, Prohaska BK, Langan JA, Hammerschlag N (2016) Seasonal and life-stage variation in the reproductive ecology of a marine apex predator, the tiger shark *Galeocerdo cuvier*, at a protected female-dominated site. *Aquat Biol* 24(3):175-184 <https://doi.org/10.3354/ab00648>
- Sulikowski JA, Williams LJ, Domeier ML (2012) The use of a non-lethal technique to assess the reproductive biology of the white shark, *Carcharodon carcharias*. In: Domeier (ed) *Global Perspectives on the Biology and Life History of the white shark*. CRC Press, Boca Raton, pp 467-476
- Sumpter JP, Dodd JM (1979) The annual reproductive cycle of the female lesser spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula* L., and its endocrine control. *J Fish Biol* 15(6):687-695 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1979.tb03678.x>
- Tena-Sempere M (2006) KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology*, 83(5-6), 275-281.
- Tomita T, Nozu R, Nakamura M, Matsuzaki S, Miyamoto K, Sato K (2017) Live-bearing without placenta: Physical estimation indicates the high oxygen-supplying ability of white shark uterus to the embryo. *Scientific reports*, 7(1), 1-7.

- Tomita T, Nakamura M, Nozu R, Ogawa N, Toda M, Sato K (2022) Mode of uterine milk secretion in the white shark. *The Anatomical Record*.
- Tosti L, Danovaro R, Dell'Anno A, Olivotto I, Bompadre S, Clò S, Carnevali O (2006) Vitellogenesis in the deep-sea shark *Centroscymnus coelolepis*. *Chem Ecol* 22(4):335-345 <https://doi.org/10.1080/02757540600812016>
- Towner AV, Watson RGA, Kock AA, Papastamatiou Y, Sturup M, Gennari E, Smale M J (2022) Fear at the top: killer whale predation drives white shark absence at South Africa's largest aggregation site. *African Journal of Marine Science*, 44(2), 139-152.
- Tricas TC, Maruska KP, Rasmussen LEL (2000) Annual cycles of steroid hormone production, gonad development, and reproductive behavior in the Atlantic stingray. *Gen Comp Endocr* 118(2):209-225 <https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7466>
- Tsang PC, Callard IP (1987) Morphological and endocrine correlates of the reproductive cycle of the placental dogfish, *Squalus acanthias*. *Gen Comp Endocr* 66(2):182-189 [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90266-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90266-8)
- Turchik, A. J., Berkenpas, E. J., Henning, B. S., & Shepard, C. M. (2015, October). The Deep Ocean Dropcam: a highly deployable benthic survey tool. In *OCEANS 2015-MTS/IEEE Washington* (pp. 1-8). IEEE.
- United Nations Population Fund (UNFPA). 2022. <https://www.unfpa.org/>
- Vashist SK, Luong JH (2018) Handbook of immunoassay technologies: approaches, performances, and applications. Academic Press
- Vianna GMS, Meekan MG, Pannell D, Marsh S, Meeuwig JJ (2010) WANTED DEAD OR ALIVE? The relative value of reef sharks as a fishery and an ecotourism asset in Palau. *Australian Institute of Marine Science: Perth, Western Australia, Australia*.

- Vianna GM, Meekan MG, Pannell DJ, Marsh SP, Meeuwig JJ (2012) Socio-economic value and community benefits from shark-diving tourism in Palau: a sustainable use of reef shark populations. *Biological Conservation*, 145(1), 267-277.
- Waltrick D, Jones SM, Simpfendorfer CA, Awruch CA (2014) Endocrine control of embryonic diapause in the Australian sharpnose shark *Rhizoprionodon taylori*. PLoS One 9(7): e101234 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101234>
- Watanabe, H., Kubodera, T., Ichii, T., & Kawahara, S. (2004). Feeding habits of neon flying squid *Ommastrephes bartramii* in the transitional region of the central North Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 266, 173-184.
- Weber, D. N., Janech, M. G., Burnett, L. E., Sancho, G., & Frazier, B. S. (2021). Insights into the origin and magnitude of capture and handling-related stress in a coastal elasmobranch *Carcharhinus limbatus*. *ICES Journal of Marine Science*, 78(3), 910-921.
- Weigmann S (2016) Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *J Fish Biol* 88(3), 837-1037 <https://doi.org/10.1111/jfb.12874>
- Whitehead, D. A., Becerril-García, E. E., Petatán-Ramírez, D., Vázquez-Haikin, A., González-Armas, R., & Galván-Magaña, F. (2019). Whale shark *Rhincodon typus* strandings in the Gulf of California, Mexico. *Journal of fish biology*, 94(1), 165-167.
- Whitehead, D., Galván-Magaña, F., Soto-López, K., Juaristi-Videgaray, D., Cervantes-Gutiérrez, F., & Becerril-García, E. E. (2019). First description of a deceased juvenile whale shark *Rhincodon typus* in La Paz Bay, Mexico with comments on morphometry and age estimates. *Latin american journal of aquatic research*, 47(3), 575-579.
- Williams LJ, Campbell MD, Tsang PC, Sulikowski JA (2013) Using estradiol and progesterone concentrations to assess individual variability in the reproductive cyclicity of captive female little skates, *Leucoraja erinacea*, from the western Gulf

of Maine. Fish Physiol Biochem 39(5):1089-1099
<https://doi.org/10.1007/s10695-012-9766-2>

Wourms, J. P. (1977). Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *American Zoologist*, 17(2), 379-410.

Wudy SA, Schuler G, Sánchez-Guijo A, Hartmann MF (2018) The art of measuring steroids: principles and practice of current hormonal steroid analysis. *J Steroid Biochem* 179:88-103 <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.003>

Wyffels JT, George R, Adams L, Adams C, Clauss T, Newton A, Hyatt MW, Yach C, Penfold LM (2019) Testosterone and semen seasonality for the sand tiger shark *Carcharias taurus*. *Biol Reprod* 102(4):876-887
<https://doi.org/10.1093/biolre/ioz221>

Zeidberg, L. D. & Robinson, B. H. Invasive range expansion by the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*, in the eastern North Pacific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 12948–12950. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702043104> (2007).