



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**DIFERENCIAS DE GLUCÓGENO Y ESTRÉS OXIDATIVO EN MÚSCULO DE
Mobula birostris ASOCIADO AL TURISMO EN EL ARCHIPIÉLAGO DE
REVILLAGIGEDO**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA
MVZ CAROLINA HERNÁNDEZ NAVARRO

LA PAZ, B.C.S., MÉXICO, 2020

DEDICATORIA

A mi mamá Yolanda y mi hermano Alvaro por siempre creer en mí y mis ideas locas, por darme todo y apoyarme cuando nadie más lo hizo. Si no fuera por ustedes no estaría aquí cumpliendo mis sueños. A ustedes les debo todo.

A Jorge Jiménez, por acompañarme en esta aventura sin saber lo que nos deparaba el futuro, realizar viajes drásticos y dejar todo por mí. Me enseñaste lo que es el amor verdadero y la amistad infinita.

Al Dr. Mauricio Hoyos por creer en mi proyecto, aunque no se hubiera probado en elasmobranquios, por apoyarme y darme la oportunidad de demostrar mis ideas y mi capacidad de trabajo, por compartir mi amor por los animales marinos y ayudarme a difundir el bienestar de los elasmobranquios.

To Christine, Ramón, and Michelle (Ocean Blue Tree) because without your support this project would not have been complete, for inspiring me and being in many ways, an example to follow, you are an incredible people with huge hearts.

Al Dr. Fernando, Dr. Renato, Dr. Valdivia y Dr. Felipe, por apoyarme en este proyecto y proporcionarme las facilidades para que se pueda lograr, retar mi mente y darme confianza cuando dudaba de mí. Por creer en mi idea y aunque es un tema nuevo, iniciar a mi lado esta línea de investigación. Discutir los temas a tal grado de emocionarme por compartir ideas nuevas y ser gran aprendiz de todo su conocimiento. Son el mejor comité.

A todas esas personas que se dudaron de mí y jamás creyeron que lo lograría, que pensaban que la veterinaria no estudiaba elasmobranquios y que estaba loca... muchas gracias por hacerme perseverante.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada durante el periodo enero 2019 a diciembre 2020. Al Centro Interdisciplinario de Ciencias

Marinas (CICIMAR-IPN) por el apoyo académico y administrativo en la realización de este estudio.

A la ONG Pelagios Kakunjá por todo el apoyo de campo y logístico para obtener las muestras.

A Ocean Blue Tree por el apoyo económico y logístico, este estudio se realizó gracias a ustedes. A la embarcación Quino El Guardián por su apoyo para la segunda toma de muestras.

Al organismo gubernamental que me apoyaron con la expedición de permisos y nos facilitaron el trabajo en campo Comisión de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), especialmente al director del Parque Nacional de Revillagigedo, Ocean. Javier Alejandro González Leija.

A la Dra. Irán de la Universidad Nacional Autónoma de Baja California Sur (UABCS), por proporcionar las facilidades y material de equipo para transportar las muestras de manera segura y manteniendo la cadena fría.

Al laboratorio Especialidades en Diagnostico (DIVET), por facilitar las instalaciones, equipos de laboratorio y material de trabajo para procesar las muestras de manera eficaz, por instruirme en temas químicos y bioquímicos y a todo su personal por brindarme capacitación y apoyo siempre que lo necesité.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. Lista de tablas..... | 6 |
| 2. Lista de figuras..... | 7 |
| 3. Glosario..... | 10 |
| 4. RESUMEN..... | 11 |
| 5. ABSTRACT..... | 12 |
| 6. INTRODUCCIÓN..... | 13 |
| 7. ANTECEDENTES..... | 14 |
| 8. JUSTIFICACIÓN..... | 23 |
| 9. HIPOTESIS..... | 24 |
| 10. OBJETIVO GENERAL..... | 24 |
| 10.1 Objetivos específicos..... | 25 |
| 11. MÉTODO..... | 25 |
| 11.1 Periodo de muestreo..... | 26 |
| 11.2 Muestreo..... | 27 |
| 11.3 Registro de embarcaciones y buzos | 27 |
| 11.4 Toma de biopsia muscular de manta gigante..... | 28 |
| 11.5 Almacenamiento..... | 29 |
| 11.6 Laboratorio..... | 29 |
| 11.7 Extracción de compuestos celulares..... | 30 |
| 11.8 Estrés oxidativo..... | 31 |
| 11.8.1 Preparación de reactivos..... | 31 |
| 11.8.2 Curva estándar..... | 32 |
| 11.8.3 Realización de análisis..... | 33 |
| 11.9 Glucógeno | 34 |
| 11.9.1 Preparación de reactivos..... | 35 |
| 11.9.2 Curva estándar..... | 35 |
| 11.9.3 Realización de análisis..... | 36 |
| 11.10 Análisis estadístico para estrés oxidativo y glucógeno..... | 37 |
| 12. RESULTADOS..... | 38 |
| 12.1 Resultados de campo..... | 38 |
| 12.1.1 Primer muestreo..... | 38 |
| 12.1.2 Segundo muestreo..... | 39 |
| 12.1.3 Registro CONANP 2019..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 12.2 Toma de biopsia muscular de manta gigante..... | 41 |
| 12.3 Extracción de compuestos celulares en micromuestras..... | 41 |
| 12.4 Estrés oxidativo..... | 42 |
| 12.4.1 Análisis y comparación de variables..... | 43 |
| 12.5 Glucógeno..... | 47 |
| 12.5.1 Análisis y comparación de variables..... | 48 |
| 13. DISCUSIÓN..... | 51 |
| 13.1 Toma de biopsia muscular de manta gigantes..... | 51 |
| 13.2 Extracción de compuestos celulares en micromuestras..... | 53 |
| 13.3 Estrés oxidativo..... | 54 |
| 13.3.1 Sexo: Machos y hembras..... | 58 |
| 13.3.2 Tallas: inmaduros y maduros..... | 58 |
| 13.3.3 Morfotipos: chevrón y negro..... | 59 |
| 13.4 Glucógeno | 59 |
| 13.4.1 Sexo, tallas y morfotipos..... | 60 |
| 13.5 Estrés: multifactorial..... | 61 |
| 13.5.1 Filogenia..... | 61 |
| 13.5.2 Alimento..... | 62 |
| 13.5.3 Ambiente..... | 63 |
| 14. CONCLUSIONES..... | 64 |
| 15. RECOMENDACIONES..... | 65 |
| 16. BIBLIOGRAFIA..... | 65 |
| 17. ANEXOS..... | 70 |

Lista de tablas

Tabla 1. Calendario muestra, diferenciando los periodos de temporada alta (verde) en donde se permiten las actividades turísticas y temporada baja (rojo) en donde se prohíbe la entrada a las embarcaciones turísticas al Parque Nacional de Revillagigedo

Tabla 2. Preparación de patrones para la curva estándar de catalasa

Tabla 3. Registro de las embarcaciones en el periodo con mayor intensidad de turismo. Se registra el nombre de las embarcaciones presentes en el Parque Nacional de Revillagigedo con cuantas lanchas de transporte cuentan y aproximadamente cuantos turistas transporta cada lancha. X = sin información; NA = No aplica.

Tabla 4. Mantas gigantes muestreadas y registradas en el periodo con mayor intensidad de turismo. *Sexo = M: Macho, H: Hembra

Tabla 5. Registro de las embarcaciones en el periodo con menor intensidad de turismo. Se registra el nombre de las embarcaciones presentes en el Parque Nacional de Revillagigedo, número de lanchas y cupo máximo.

Tabla 6. Mantas gigantes muestreadas y registradas en el periodo con menor intensidad de turismo. *Sexo = M: Macho, H: Hembra

Lista de figuras

Figura 1. Número de visitas de turistas registrados al año en el Parque Nacional de Revillagigedo; temporadas 2013 a 2019 (CONANP, 2017).

Figura 2. Ubicación del Parque Nacional Revillagigedo en donde se amplían las cuatro islas.

Figura 3. Isla de San Benedicto, sitios de buceo en donde se realizaron la toma de biopsias, 1. El Boiler y 2. El Cañón.

Figura 4. Toma de biopsia en El Boiler, San Benedicto.

Figura 5. Sonicador empleado para extraer compuestos celulares, CVX 130 PB, Vibracell®

Figura 6. Curva estándar de las absorbancias obtenidas proporcionadas por el kit Cayman Chemical. Representación gráfica de la señal que se mide en función de la concentración de la catalasa, todos los datos de campo, para ser válidos, deben entrar dentro del valor mínimo y máximo de esta curva.

Figura 7. Placa de trabajo de catalasa, se presenta la reacción química del colorante Purpald de las curvas estándar y las muestras leídas en el espectrofotómetro.

Figura 8. Curva estándar de las absorbancias obtenidas por el kit Cayman Chemical por medio de la modificación del procedimiento. Representación gráfica de la señal que se mide en función de la concentración de la hidrólisis del glucógeno. Todos los datos de campo, para ser válidos, deben entrar dentro del valor mínimo y máximo de esta curva.

Figura 9. Analizador automático de lectura fotométrica A15 de BioSystems®, capaz de leer absorbancias de hasta 3 μ L de muestra.

Figura 10. Muestra 5. Tinción HE (10X). Se observa disgregación del endomisio, no se presentan las estrías transversales y en algunas zonas se ve vacuolización. Los núcleos se

observan disminuidos de tamaño y amorfos, en algunas fibras musculares no se presentan núcleos.

Figura 11. Muestra 3. Tinción HE (10X). Se observan las fibras musculares completas y en cohesión, el tejido conectivo del perimysio y del endomysio, dentro de la fibra muscular se observan los núcleos basófilos en la periferia de las células.

Figura 12. Laminilla 7. Material mucoso y proteináceo (10X), muestra de la correcta sonicación y disgregación total del tejido muscular.

Figura 13. Laminilla 13. Material mucoso y proteináceo (40X), muestra de la correcta sonicación y disgregación total del tejido muscular.

Figura 14. Comparación de las unidades de catalasa por mg de tejido entre los periodos con diferente intensidad de turismo. A pesar de que se aplicaron pruebas no paramétricas se realizó una aproximación a la normalidad (z) debido a que uno de los grupos testigo cuenta con menos de 10 datos.

Figura 15. Unidades de catalasa por miligramo de tejido entre los sexos (H= hembras/ M= machos) y a su vez, entre los diferentes periodos de turismo.

Figura 16. Correlación lineal de las unidades de catalasa por miligramo de tejido entre los diferentes periodos de turismo por tallas (ancho de disco en metros). Se obtiene el valor R^2 y en caso de tener una correlación positiva o negativa, para evitar la casualidad se obtiene el valor p .

Figura 17. Unidades de catalasa por miligramo de tejido entre los morfotipos.

Figura 18. Unidades de catalasa por miligramo de tejido entre los morfotipos chevrón y negra, y a su vez, entre los diferentes periodos de turismo.

Figura 19. Nanogramos de glucógeno hidrolizado por mg de tejido entre los periodos con diferente intensidad de turismo. A pesar de que se aplicaron pruebas no paramétricas se

realiza una aproximación a la normalidad (z) debido a que uno de los grupos testigo cuenta con menos de 10 datos.

Figura 20. Nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido entre los sexos (H= hembras/ M= machos) y a su vez, entre los diferentes periodos de turismo.

Figura 21. Nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido entre los diferentes periodos de turismo por tallas (ancho de disco en metros). Se obtiene el valor R^2 y en caso de tener una correlación positiva o negativa, para evitar la casualidad se obtiene el valor p.

Figura 22. Nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido entre los morfotipos chevrón y negra, y a su vez, entre los diferentes periodos de turismo.

Figura 23. Fases del Síndrome General de Adaptación, aplicado a los resultados obtenidos con la respuesta al estrés oxidativo muscular de las mantas gigantes con respecto a los periodos con diferente intensidad de turismo. La línea media delgada representa el nivel de homeostasis, la línea gruesa negra representa los cambios fisiológicos durante un evento completo del SGA y la línea roja sugiere la respuesta fisiológica de la CAT.

Figura 24. En el primer recuadro se muestra la temporada baja del Parque Nacional de Revillagigedo en donde existe la presencia de huracanes y las mantas gigantes no tienen contacto con los turistas. El segundo recuadro representa el inicio de turismo (noviembre) en donde aumenta la presencia de buzos y las mantas gigantes presentan un aumento de catalasa como respuesta al estrés oxidativo. En el tercer recuadro, el periodo con mayor turismo, las mantas entran en un proceso de acostumbramiento a los buzos disminuyendo sus niveles de CAT muscular.

Glosario

Alostasis: Reacciones adaptativas del cuerpo que mantienen la homeostasis en respuesta a factores estresantes.

Apoptosis: Muerte celular programada. Método que el cuerpo usa para deshacerse de células innecesarias o anormales.

Caspasa: Proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos. Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras.

Endomisio: Tejido conjuntivo constituido fundamentalmente por fibras reticulares, que se disponen rodeando a cada una de las fibras musculares del músculo estriado.

Estaciones de limpieza: Sitios arrecifales en donde viven peces limpiadores que se ocupan de la limpieza de otros organismos eliminando parásitos, piel muerta, bacterias y mucosidad de la piel y de las branquias, el proceso de limpieza es un ejemplo de simbiosis.

Hipometabolismo: Metabolismo disminuido, ya sea por inanición o problemas tiroideos.

Homeostasis: Conjunto coordinado de procesos fisiológicos encargados de mantener la constancia del medio interno, regulando las influencias del ambiente y las correspondientes respuestas del organismo.

Perimisio: Cubierta conectiva que individualiza los haces musculares que forman el músculo.

RESUMEN

En el Archipiélago de Revillagigedo se ha registrado un incremento en el turismo de buceo que podría resultar en una condición estresante para las mantas gigantes (*Mobula birostris*). El objetivo de esta investigación fué determinar la presencia del estrés oxidativo y la concentración de glucógeno muscular de las mantas gigantes durante periodos con diferente intensidad de turismo en las Islas Revillagigedo. Se realizaron dos muestreos en el año 2019, obteniendo un total de 21 biopsias de músculo de diferentes mantas. La presencia del estrés oxidativo se evaluó mediante la actividad de catalasa (CAT) y el glucógeno se determinó a través del kit modificado *Glycogen assay*. Los resultados para el estrés oxidativo fueron: 1) un mayor nivel de actividad CAT en el periodo con menor intensidad de turismo (2819.67 ± 1015.03 U CAT/mg tejido) en comparación con mayor turismo (1382.33 ± 700.59 U CAT/mg tejido). Sugiriendo el Síndrome General de Adaptación, llevándose a cabo la etapa de reacción de alarma en donde se registran mayores unidades de CAT en el músculo de las mantas gigantes al inicio de la temporada de turismo. La etapa de resistencia es donde disminuyen las unidades de CAT debido a una adaptación al agente estresor a pesar del aumento del turismo. Por lo tanto, se infiere que las mantas gigantes están respondiendo adecuadamente al estrés oxidativo debido al aumento de turismo e incluso, que el aumento de las unidades de CAT detectado se encuentre dentro del rango de tolerancia del organismo. Y, 2) diferencias estadísticas de machos ($p = 0.0005$) entre los periodos de diferente intensidad de turismo; y morfotipos chevrón y negra ($p = 0.0313$). Con base en observaciones de cortejo en octubre, las diferencias de CAT entre los machos pueden deberse a que, se aproximen las fechas de reproducción en noviembre (registro de aumento en unidades de CAT) y esta actividad resulte estresante o implique una mayor actividad física. 3) El causante de las diferencias de CAT entre los morfotipos, negro y chevrón, es desconocido. Con respecto al glucógeno, no se detectaron diferencias estadísticas entre los periodos de turismo ($p = 0.1230$), así como entre los grupos estudiados, pudiendo inferir que este polisacárido, en las mantas gigantes, es un metabolito incapaz de reflejar estados de estrés. A pesar del factor antropogénico, el estrés tiene un origen multifactorial el cual puede verse afectado, principalmente, por la filogenia, la alimentación y el ambiente.

ABSTRACT

In the Revillagigedo Archipelago, there has been an increase in dive tourism that could result in a stressful condition for giant mantas (*Mobula birostris*). The objective of this research was to determine the presence of oxidative stress and muscle glycogen concentration of giant mantas during periods with different intensity of tourism in the Revillagigedo Islands. Two samplings were carried out in 2019, obtaining a total of 21 muscle biopsies from different mantas. The presence of oxidative stress was evaluated by catalase activity (CAT) and glycogen was determined using the modified Glycogen assay kit. The results for oxidative stress were: 1) a higher level of CAT activity in the period with lower intensity of tourism (2819.67 ± 1015.03 U CAT / mg tissue) compared to higher tourism (1382.33 ± 700.59 U CAT / mg tissue). Suggesting the General Adaptation Syndrome, carrying out the alarm reaction stage where, higher CAT units are registered in the muscle of the giant mantas at the beginning of tourism. The resistance stage where CAT units decrease due to an adaptation to the stressor despite the increase in tourism. Therefore, it is inferred that the giant mantas are responding adequately to oxidative stress due to the increase in tourism and even, the increase in the CAT units detected is within the tolerance range of the organism. And, 2) there are statistical differences between males ($p = 0.0005$) in periods with different intensity of tourism, and morphotypes ($p = 0.0313$) chevron and black. The differences in CAT between males may be since, observing courtship in October, the breeding dates are approaching in November (record of increase in CAT units) and this activity can be stressful or involve greater physical activity. 3) The cause of the CAT differences between the morphotypes, black and chevron, is unknown. Regarding glycogen, no statistical differences were detected between the tourism periods ($p = 0.1230$), as well as between the groups studied, being able to infer that this polysaccharide, in giant mantas, is a metabolite incapable of reflecting stress states. Despite the anthropogenic factor, stress has a multifactorial origin which can be affected mainly by phylogeny, food, and the environment.

INTRODUCCIÓN

El Archipiélago de Revillagigedo, ubicado 400 km al sur de Cabo San Lucas, Baja California Sur, México, está formado por un grupo de islas de origen volcánico: Clarión, Socorro, San Benedicto y Roca Partida (CONANP, 2017). Son las islas más remotas del territorio mexicano y es catalogado como uno de los lugares mundialmente reconocidos por su amplia diversidad de fauna marina y sitios de buceo para investigadores y turistas (CONANP, 2017; Ruiz, Sánchez, Stewart, & Aburto, 2018).

Aunque el turismo de buceo es una actividad de poco impacto en comparación con la pesca u otras actividades de recreación marina, debe ser monitoreado, ya que en los últimos años el número de turistas en el archipiélago se ha duplicado (Fig. 1) (Ruiz et al., 2018).

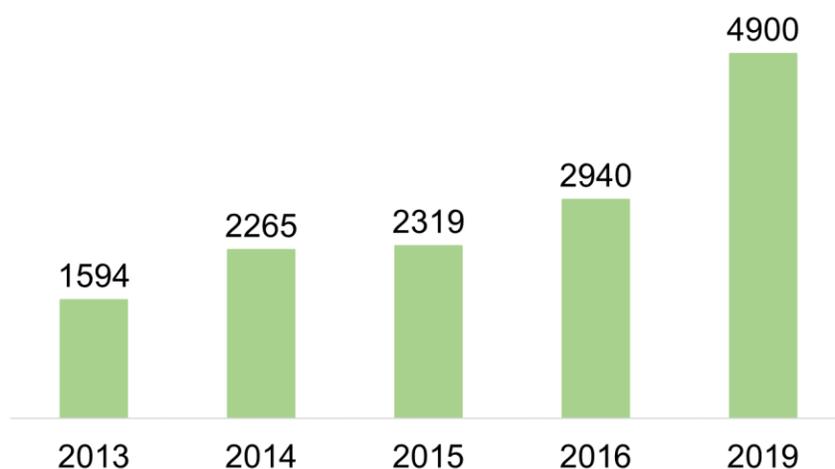


Fig. 1. Número de visitas de turistas registrados al año en el Parque Nacional de Revillagigedo; temporadas 2013 a 2019 (CONANP, 2017)

En el Archipiélago de Revillagigedo, la manta gigante (*Mobula birostris*) y otras especies marinas son aprovechadas con fines turísticos y se ha demostrado que esta actividad podría afectar a la fauna marina en sitios donde el turismo de aventura no es controlado adecuadamente (Hammerschlag, Gallagher, Wester, Luo, & Ault, 2012).

Todos los vertebrados inician un estado de estrés cuando se presenta un evento amenazante, en donde se activan sistemas fisiológicos para mantener la homeostasis del organismo (Semeniuk, Bourgeon, Smith, & Rothley, 2009). Los organismos que entran en

contacto con eventos de conflicto físico y psicológico, aceleran procesos fisiopatológicos y dan como resultado una mayor incidencia de morbilidad y mortalidad (McEwen, 1998). Por lo tanto, la presencia de estrés es un indicador del bienestar animal (Odeón & Romera, 2017). El estrés se define como el efecto sobre un individuo que sobrepasa sus sistemas de control y aumenta su vulnerabilidad (Broom, 2004; Odeón & Romera, 2017). Los efectos directos de un agente estresante en un organismo suelen ser metabólicos y pueden alterar componentes celulares funcionales como enzimas y membranas, afectando funciones como la respiración, circulación, respuesta inmune, osmorregulación y la regulación hormonal (McEwen, 1998; Pankhurst, 2011).

Existen diferencias individuales importantes en la forma en que los organismos responden a eventos de estrés, y dependen de dos factores principales: primero, la forma en la que el individuo percibe e interpreta la situación, y segundo, la condición del estado de salud individual (McEwen, 1998). No todos los factores estresantes dan como resultado perfiles idénticos de respuestas conductuales y fisiológicas. Estas diferencias parecen estar también relacionadas con la constitución genética, así como con las experiencias a temprana edad (Johnson, Kamilaris, Chrousos, & Gold, 1992).

Una forma de medir el estrés en un organismo es utilizando marcadores fisiológicos, los cuales son herramientas confiables para evaluar el efecto de cambios ambientales drásticos, incluidos los impuestos por el turismo (Semeniuk et al., 2009).

ANTECEDENTES

Existe una gran cantidad de artículos referentes a la evaluación de estrés en elasmobranchios por medio de distintas variables que han permitido generar diferentes bioindicadores (Pankhurst, 2011; Renshaw, Kutek, Grant, & Anoopkumar-Dukie, 2012; Wendelaar, 1997). Las respuestas al estrés deben ser detectables y sostenidas. Por ejemplo, en peces de vida libre será el indicio de un desafío o cambio ambiental drástico, como factores antropogénicos o cambios climáticos extremos o impredecibles. Por otro lado, los eventos naturales anuales, como el cambio de las estaciones acompañadas de cambios en los factores fisicoquímicos, no ejercen una respuesta de estrés debido a la liberación de melatonina (Pankhurst, 2011).

Skomal (2007) ha revisado ampliamente la necesidad de evaluar el alcance del trauma físico y las respuestas fisiológicas y bioquímicas alteradas para medir niveles de estrés. Renshaw *et al.* (2012) realizaron una revisión bibliográfica de diferentes bioindicadores para determinar niveles de supervivencia de elasmobranchios, los cuales son indicadores de estrés. Entre ellos se mencionan los más importantes y otros relacionados con este grupo y otras especies marinas.

1. Marcadores celulares:

Existen varios marcadores que pueden usarse para determinar el estrés celular por medio de la señalización apoptótica cuando se encuentran en:

- A. Una etapa temprana, que involucra la liberación mitocondrial de citocromo C para iniciar la activación de las caspasas utilizadas para escindir proteínas celulares y se acompaña de la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF), la cual representa una ruta no dependiente de caspasa hacia la fragmentación del ADN y la condensación de cromatina.
- B. En una etapa intermedia, cuando la activación de la caspasa 9 es evidente y se puede detectar el factor de actividad de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1).
- C. Durante la etapa tardía, la caspasa 3 se une a Apaf-1 y se inicia la fase de ejecución de la apoptosis.

Renshaw *et al.* (2012) mencionan que las enzimas que normalmente se encuentran dentro de la célula, como la lactato deshidrogenasa, la creatina quinasa o aspartato aminotransferasa, se usan como marcadores de necrosis porque pueden detectarse en el plasma cuando la membrana celular está dañada o cuando ocurre una ruptura, y por lo tanto son buenos bioindicadores de eventos estresores.

2. Química sanguínea y hematología

Cliff y Thurman (1984) informaron que la captura y el transporte de tiburones oscuros (*Carcharhinus obscurus*) estuvo acompañado por una elevación en:

- A. Creatina quinasa, lo que indica la alteración celular y potencial necrosis
- B. Niveles elevados de lactato en sangre, lo que indica una mayor dependencia del metabolismo anaeróbico.
- C. Una pérdida de la homeostasis electrolítica evidenciada por el aumento de los niveles plasmáticos de K, Ca y Mg. Estas medidas volvieron a la línea base

después de 24 h. Más recientemente, el análisis de regresión logística de los tiburones que sobrevivieron a la captura y liberación reveló que las dos variables específicas, lactato y Mg elevados, podrían usarse para predecir la supervivencia con precisión.

Por otro lado, Hoffmayer y Parsons (2001) investigaron los efectos secundarios del estrés provocado por la captura en el tiburón cazón de ley (*Rhizoprionodon terraenovae*), midiendo cambios en varios parámetros hematológicos. Estos autores no encontraron cambios significativos en sus resultados sobre glucosa, lactato, pH y osmolalidad en los tiempos y condiciones de estudio. Sin embargo, la metodología utilizada les permitió obtener muestras de sangre iniciales que pueden considerarse las mejores estimaciones de los niveles normales en animales de vida libre sin estrés, datos útiles al hacer comparaciones con otras especies de tiburones.

Lo anterior contradice lo que encontraron Marshall y Bennett (2010), quienes compararon niveles de electrolitos en plasma (Na, Mg, Ca y K), metabolitos (glucosa y lactato), hematocrito sanguíneo y proteína de choque térmico (Hsp70) en 11 especies de tiburones capturados con palangre, llegando a la conclusión de que las propiedades sanguíneas de los tiburones capturados con palangre parecen ser indicadores útiles de la variación interespecífica en la respuesta al estrés secundario a la captura, y pueden resultar útiles en el futuro para predecir la supervivencia de los tiburones.

Lambert *et al.* (2018) examinaron el cuerpo cetónico β -hidroxibutirato en plasma en rayas sureñas de espina (*Hypanus sabinus*) mediante la modificación de concentraciones de oxígeno en ambientes controlados por 48 h, probando la hipótesis de que los cuerpos cetónicos desempeñan un papel importante como fuente de energía en la respuesta al estrés. La osmolalidad plasmática, la concentración de urea, el óxido de trimetilamina-N y un conjunto de iones también se midieron para caracterizar las desviaciones de la homeostasis. En conclusión, el lactato sanguíneo y la acidosis aumentaron significativamente durante el evento estresante y volvieron a los niveles basales en 48 h. Los valores de glucosa se vieron significativamente afectados, con los valores más altos observados a las 48 h. El cuerpo cetónico β -hidroxibutirato plasmático no se vio afectado por el agente de estrés, sugiriendo que los cuerpos cetónicos pueden no ser una fuente importante de combustible utilizada durante el estrés agudo.

Renshaw *et al.* (2012) mencionan que el perfil de los cambios en la composición química de la sangre y el plasma pueden usarse para identificar el estrés y determinar cuándo el organismo regresa a la homeostasis, pero puede no ser confiable como el único medio para predecir la supervivencia porque las especies de tiburones difieren mucho en su capacidad para soportar grandes cambios en el equilibrio ácido-base y la desregulación electrolítica.

3. Respuesta leucocitaria

Van Rijn y Reina (2010) tomaron recuentos diferenciales de leucocitos de pejelagarto bordeado (*Cephaloscyllium laticeps*) estresados en laboratorio. Calcularon la proporción de granulocitos (heterófilos y neutrófilos) a linfocitos para utilizarlos como un nuevo indicador fisiológico del estrés en tiburones. En este trabajo se determinó que debido al estrés inducido simulando diferentes artes de pesca se provoca linfopenia (disminución de linfocitos) y granulocitosis (aumento de granulocitos), confirmándolo como una medida útil del inicio relativamente rápido del estrés en estos animales.

4. Equilibrio ácido-base y electrolitos

Cliff y Thurman (1984) confirman que debido al desequilibrio ácido-base que ejerce el estrés de la pesca, el aumento en la pCO_2 durante la hiperactividad es el resultado de un aumento en la producción de CO_2 por las células musculares, la cual puede verse acentuada por una interrupción de la ventilación y la circulación sanguínea, lo que inhibe la descarga de CO_2 en las branquias. Estos factores también darían como resultado una caída en pO_2 durante el evento estresante.

Frick *et al.* (2010) compararon diferentes duraciones de eventos de estrés en dos especies de tiburones: captura con redes de enmalle y palangre durante 360 min y se monitoreó la condición a través de muestras repetidas de sangre durante 72 h post período de recuperación. Estos autores definieron que los cambios en los metabolitos y electrolitos plasmáticos de los tiburones Port Jackson (*Heterodontus portusjacksoni*), en respuesta al tratamiento experimental, fueron pequeños y no se observó mortalidad, lo que sugiere que los tiburones de esta especie son resistentes al estrés. En contraste, los tiburones gomosos (*Mustelus antarcticus*) reaccionaron de manera muy sensible al estrés de captura, con un equilibrio ácido-base y electrolitos severamente interrumpido, y la mortalidad inmediata y

tardía fue sustancial (hasta 70%) después de la captura de la red de enmalle, por lo que se definieron como menos resistentes al estrés.

5. Endocrinología

Manire *et al.* (2007) realizaron un estudio en donde probaron si la corticosterona variaba en respuesta al estrés de captura agudo y crónico, y a lo largo del ciclo reproductivo de varios elasmobranquios. Los autores encontraron que la corticosterona sérica aumentó después de la captura y nuevamente 24 h después. Los resultados indican que la corticosterona tiene un papel limitado en el estrés agudo y crónico asociado con la captura y se podría ver enmascarado por la hormona 1 α -hidroxicorticosterona (1 α -OHB).

Evans *et al.* (2010) demostraron que un inmunoensayo modificado para la corticosterona podría validarse para la cuantificación de 1 α -OHB, lo que podría proporcionar una vía importante para la evaluación de la respuesta al estrés de elasmobranquios. La presencia de la hormona 1 α -hidroxicorticosterona (1 α -OHB), como el principal corticosteroide plasmático, se ha confirmado en varias especies de elasmobranquios (Pankhurst, 2011).

Brinn *et al.* (2012) realizaron un estudio en donde cuantificaron cambios relacionados con el estrés en muestras de corticosterona, sangre y agua analizadas durante un experimento de transporte que probó dos aditivos en el agua: tetraciclina y el probiótico Efinol. Concluyeron que hubo un aumento significativo y gradual de los niveles de corticosterona en las rayas negras (*Potamotrygon hystrix*) durante el tiempo de transporte, en combinación con trastornos osmorreguladores que sugieren un papel relacionado con el estrés de este corticosteroide.

La medición de los niveles de catecolaminas se utiliza para determinar si los animales están estresados en un periodo corto, desde minutos hasta horas (Beitinger, 1990). Es difícil usar estas medidas únicamente, porque los niveles de catecolaminas aumentan con el ejercicio tanto en teleósteos como en elasmobranquios (Renshaw *et al.*, 2012). Las mediciones de catecolaminas proporcionan un indicador pronóstico conservador de supervivencia para estas especies (Wendelaar, 1997). La compilación de los niveles de catecolaminas conocidos para cada especie de tiburón que sobrevive al estrés de captura podría proporcionar valores que se pueden utilizar junto con una gama más amplia de medidas para predecir la supervivencia (Renshaw *et al.*, 2012). Hight *et al.* (2007) analizaron los

niveles de catecolaminas en plasma para evaluar los niveles de estrés en tiburones capturados con palangre, caña y carrete, y sin estrés, encontrando diferencias significativamente más altas en concentraciones de adrenalina y noradrenalina entre las diferentes especies y los diferentes artes de pesca en comparación con los que no estuvieron sujetos a eventos estresantes.

6. Estrés oxidativo

El metabolismo celular aerobio trabaja a base de oxígeno y sus productos generan especies reactivas de oxígeno (ROS) (Oxígeno singulete $^1\text{O}_2$, ion superóxido O_2^- , radical hidroxilo OH^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radicales alcoxi RO^- y peroxi ROO^- , radical hidroperoxilo ROOH^-) y sus variantes (óxido nítrico NO^- , dióxido nítrico NO_2^- , peroxinitrito ONOO^- , radical tiilo RS^- , ácido hipocloroso HOCl^-) que, en grandes cantidades y no controladas, pueden dañar las estructuras celulares, agotar la energía y causar apoptosis temprana (muerte celular programada) (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). Para contrarrestar el efecto nocivo de ROS, los organismos dependen de antioxidantes en forma de enzimas producidas endógenamente y moléculas de bajo peso molecular, y antioxidantes exógenos derivados de alimentos (Semeniuk *et al.*, 2009). El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del sistema biológico para desintoxicar los reactivos o reparar el daño resultante (Semeniuk *et al.*, 2009). El estrés oxidativo puede ocurrir en momentos de estrés ambiental y / o alta demanda de energía, y estos procesos están asociados con la aparición y el aumento de la gravedad de muchas enfermedades (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). La Catalasa (CAT) es una enzima antioxidante endógena ubicua que está presente en la mayoría de las células aerobias, se presenta en la detoxificación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una ROS (Johansson & Håkan Borg, 1988).

Un aumento en el consumo de O_2 durante el ejercicio mejora la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo tanto López-Cruz *et al.* (2010) analizaron muestras musculares de *Isurus oxyrinchus*, *Carcharhinus falciformis* y *Sphyrna zygaena* en donde estudiaron, entre varios antioxidantes, niveles de catalasa debido a la intensidad de nado de cada especie, sin encontrar diferencias significativas de este antioxidante.

Filho *et al.*, (1993) sugirieron que el nivel de antioxidantes en los elasmobranquios es más bajo que el de los teleósteos y refleja el nivel de consumo de oxígeno. Este patrón fue

confirmado por López-Cruz *et al.* (2010), quienes trabajaron con tres especies de tiburones: mako de aleta corta (*Isurus oxyrinchus*), tiburón sedoso (*Carcharhinus falciformis*) y tiburón martillo liso (*Sphyrna zygaena*). Demostraron que el nivel de antioxidantes contra el estrés oxidativo estuvo directamente relacionado con el nivel de actividad de nado, en donde, los tiburones más activos (tiburón mako de aleta corta (*Isurus oxyrinchus*) y el tiburón sedoso (*Carcharhinus falciformis*), presentaban un nivel significativamente más alto de defensa antioxidante que el tiburón martillo liso (*Sphyrna zygaena*) menos activo. Sin embargo, Vélez-Alavez *et al.* (2015), determinaron el sistema antioxidante en el músculo de tres especies de elasmobranquios (*Isurus oxyrinchus*, *Prionace glauca*, *Mustelus henlei*) y tres de teleósteos (*Totoaba macdonaldi*, *Kajikia audax* y *Coryphaena hippurus*). Este trabajo demostró que la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST) fue mayor en los elasmobranquios, en comparación con los teleósteos, lo que demuestra que los niveles de antioxidantes pueden variar dependiendo de la especie y su nivel de actividad.

Semeniuk *et al.* (2009) analizaron estrés en un grupo de rayas sureñas (*Dasyatis americana*), por el efecto del turismo de cambios hematológicos indicativos de los costos fisiológicos de los organismos. Estos autores midieron la capacidad total de antioxidantes y el estado oxidativo total, encontrando que las rayas expuestas al turismo exhibieron una concentración significativamente mayor de especies oxidativas totales y también una capacidad antioxidante total significativamente menor.

Renshaw *et al.* (2012) mencionan que la actividad del antioxidante superóxido dismutasa (SOD) se puede analizar en varias muestras biológicas (eritrocitos y lisados celulares, homogeneizados de tejidos, plasma y suero), utilizando kits de análisis disponibles comercialmente para determinar si se ha producido una elevación de SOD en respuesta al estrés oxidativo, y para evaluar el perfil de defensas antioxidantes. De igual manera, estudiaron el óxido nítrico (NO), el cual es un radical libre de corta duración que actúa como una molécula de señalización. Si el oxígeno está presente, es sintetizado por un grupo de enzimas de la sintetasa del óxido nítrico (NOS), usando arginina o tetrahidrobiopterina como sustratos. El anión nitroxilo (NO⁻) se ha sugerido como el causante de la mayor parte del daño tisular que ocurre durante la fase de re-oxigenación, que sigue a la limitación de oxígeno y que ocurre como resultado de los efectos tóxicos del aumento de la formación de peroxinitrato, esto puede evaluarse midiendo los niveles de nitrotirosina en los tejidos. La

acción nitrito reductasa de la hemoglobina, neuroglobina y/o mioglobina pueden ser importantes en el músculo de los elasmobranquios, ya que el oxígeno se limita durante el agotamiento asociado con la captura (Renshaw et al., 2012).

En algunos elasmobranquios se han evidenciado niveles más altos de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa, después de la captura. Dado que los niveles de los sistemas de defensa antioxidante difieren entre especies y dado que las especies de elasmobranquios responden de manera diferente a un estrés de captura similar, al medir la peroxidación lipídica, se tendría en cuenta la suma total de la oxidación inducida por la captura-estrés (Bouyoucos, Suski, Mandelman, & Brooks, 2017; Cliff & Thurman, 1984; Hight et al., 2007; Hoffmayer & Parsons, 2001). Los marcadores de defensa contra el estrés oxidativo después de un estrés potencialmente dañino pueden proporcionar información no solo sobre la capacidad de los peces para resistir un estrés oxidativo futuro, sino también sobre el grado en que estas defensas se han agotado (Renshaw et al., 2012).

7. Glucógeno

Cuando en un organismo se presenta un evento de estrés crónico, se inician efectos metabólicos, los cuales incluyen hiperglucemia, agotamiento de las reservas de glucógeno en los tejidos y catabolismo de la proteína muscular (Marshall, 1990; Wendelaar, 1997). Las hormonas asociadas al estrés causan el aumento inicial de los niveles de glucosa en sangre al movilizar las reservas de glucógeno hepático y muscular a través de la glucogenólisis, liberando nueva glucosa (Wendelaar, 1997). El organismo altera mecanismos fisiológicos que consumen energía y la fuente de energía principal de todos los vertebrados es la glucosa (Marshall, 1990).

Actualmente no existe registro de artículos científicos que hayan trabajado con glucógeno en elasmobranquios. Por lo tanto, los ejemplos aquí escritos son de teleósteos y otras especies, coincidiendo en sus resultados sin importar la especie.

El glucógeno es un polisacárido que funciona como una fuente de reserva inmediata de glucosa disponible para las células musculares. Esta no puede ser liberada en sangre ya que este tejido carece de la enzima glucosa-6-fosfatasa, por lo tanto, toda la glucosa

liberada en el músculo se emplea en energía para el mismo tejido (Bashamohideen & Parvatheswararao, 1972; deRoos & deRoos, 1972).

Durante eventos que generan estrés constante, ciertas hormonas ejercen efectos de movilización de glucosa y, por lo tanto, aumentan los suministros de glucosa transportados por la sangre a través de la activación de la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepática y muscular junto con una inhibición de la glucólisis (Cicik & Engin, 2005; Mcveigh & Tarrant, 1982; Reid, Bernier, & Perry, 1998). Cliff y Thurman (1984) mencionan que un aumento en la glucosa en sangre se reconoce como una respuesta al estrés en un amplio espectro de animales, incluidos los elasmobranquios. Estos autores citan a Scott (1921) quien descubrió que al extraer cazón dientón (*Mustelus canis*) del agua durante 80 segundos aumentó el nivel de azúcar en su sangre. Se cree que este aumento fue inducido por la secreción de catecolaminas (ya sea adrenalina o noradrenalina) en la sangre. También cita a Bennet (1978), quien determina que el glucógeno muscular se agota rápidamente durante la actividad intensa y parece ser la principal fuente de ácido láctico formado durante el metabolismo anaeróbico en los vertebrados inferiores. Como sugiere Wardle (1978), la elevación de la glucosa en sangre puede formar parte de un proceso restaurador en el que ésta se moviliza desde las reservas de glucógeno del hígado. Este entra en las células musculares, suministrando materia prima y energía para la reconstrucción del glucógeno muscular. Los niveles de glucosa en la sangre también pueden ser elevados por los corticosteroides liberados en la sangre después de eventos estresantes.

Bashamohideen y Parvatheswararao (1972) demostraron que en cambios osmóticos extremos de agua dulce a concentraciones altas de agua salada en la tilapia mozambica (*Tilapia mossambica*), se presenta una disminución en el glucógeno hepático y muscular de un 30% a 50% en comparación con el grupo control. Estos resultados los atribuyen a que el organismo entra en un evento estresante y por lo tanto inicia un proceso de glucogenólisis hepática y muscular para compensar los niveles de glucosa en sangre. De igual manera, Mcveigh y Tarrant (1982) expusieron toros frisonos (*Bos taurus*) juveniles a estados de estrés por 6 h, y determinaron una disminución del glucógeno muscular del 45% en comparación con el grupo control.

Lowe *et al.* (2002) trabajaron con un suplemento nutricional alto en magnesio (Mg) en corderos estabulados en comparación con corderos de pastoreo, para investigar el efecto sobre el crecimiento, las medidas de estrés previas al sacrificio y el glucógeno muscular.

Los autores determinaron tasas de crecimiento; noradrenalina, adrenalina y cortisol urinarios; pH final del músculo y el glucógeno residual muscular. Los resultados no presentaron diferencias significativas, lo cual indica que, si la nutrición es adecuada y los niveles de estrés son bajos, no tendrán efectos negativos fisiológicos en los animales.

Cicik y Engin (2005) demostraron que a concentraciones elevadas de cadmio (Cd) se alteró significativamente el metabolismo de carbohidratos provenientes de reservas de glucógeno de carpa común (*Cyprinus carpio*). Las reservas de glucógeno en los tejidos musculares y hepáticos expuestos a Cd disminuyeron significativamente en este estudio en comparación con las reservas de glucógeno medidas en los grupos de control, concluyendo que el Cd estimula las actividades de las enzimas que trabajan en la glucogenólisis. Otros autores que igual trabajaron con sustancias tóxicas como agentes estresantes fueron Radhaiah y Jayantha Rao (1990), quienes trabajaron con concentración de glucógeno en tejido muscular con diferentes dosis de piretroides, encontrando que la tilapia disminuye el consumo de oxígeno y por lo tanto, para compensar la falta de energía inicia la glucólisis acelerada y glucogenólisis disminuida.

Condiciones físicas que alteran la repuesta a estímulos estresantes

1. Sexo

Manire *et al.* (2007) observaron concentraciones séricas de corticosteroides más altas en los machos en comparación con las hembras de tiburones martillo cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) expuestos a eventos estresantes. Estas variaciones se atribuyeron principalmente a los eventos reproductivos y demostraron que probablemente tiene funciones fisiológicas asociadas con glucocorticoides a lo largo del ciclo reproductivo o que estos eventos reproductivos ejercen un papel estresante sobre los organismos.

JUSTIFICACIÓN

La manta gigante (*Mobula birostris*) tiene un alto valor en el comercio internacional y existen pesquerías incidentales y dirigidas para utilizarlas como fuente de alimento y medicina tradicional entre otros. Las mantas gigantes están clasificadas como una especie vulnerable por la UICN a nivel mundial y en México la pesca fue prohibida en 2007 por la "NOM-029 -

PESCA RESPONSABLE DE TIBURONES Y RAYAS, ESPECIFICACIONES PARA SU APROVECHAMIENTO”, por lo que es ilegal capturarlas en aguas mexicanas.

Esta especie es carismática y sus sitios de agregación son fáciles de predecir, convirtiéndola en un atractivo turístico en diversos sitios del mundo, entre ellos el Archipiélago de Revillagigedo. El turismo de buceo involucra a esta especie en una industria en crecimiento ya que se ha demostrado que el turismo sostenible aumenta significativamente el valor económico de dichas especies en comparación con los beneficios a corto plazo de la pesca, sin embargo, es una actividad en incremento no controlada por falta de información. No se conoce el impacto fisiológico en las mantas gigantes debido al incremento en el número de buzos asociados a su observación, lo cual podría estarles provocando estrés. De esta forma, es importante medir la respuesta fisiológica en una región que no sólo es impactada en los términos antropogénicos mencionados, sino que al mismo tiempo representa una gran importancia biológica para la especie, en términos de residencia/descanso (Castro-Aguirre y Balart, 2002; Stewart *et al.*, 2016; Becerril-García *et al.*, 2020), reproducción (cortejo) (obs.pers. Hoyos-Padilla M.) y alimentación (Stewart *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, los resultados de este trabajo servirán para apoyar en las recomendaciones para el manejo y conservación de esta especie en el Parque Nacional de Revillagigedo.

HIPÓTESIS

El archipiélago de Revillagigedo ha presentado un incremento en la presencia de turismo de buceo en los últimos 8 años, pudiendo estar generando condiciones estresantes en las mantas gigantes, lo cual se manifestará en forma de estrés oxidativo y disminución de la concentración de glucógeno en músculo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de estrés, agudo y crónico, en las mantas gigantes en periodos con diferente intensidad de turismo de buceo en el Parque Nacional de Revillagigedo.

Objetivos específicos

1. Desarrollar una técnica para la toma de biopsias musculares de las mantas gigantes que permita el análisis de glucógeno y estrés oxidativo.
2. Adaptar una técnica para la extracción de compuestos celulares en micromuestras.
3. Determinar el estrés agudo de las mantas gigantes durante los periodos con diferente intensidad de turismo por medio de la lectura del antioxidante catalasa muscular.
4. Determinar el estrés crónico de las mantas gigantes durante los periodos con diferente intensidad de turismo por medio de la lectura del glucógeno muscular.
5. Relacionar las concentraciones de glucógeno y presencia de estrés oxidativo muscular en los periodos con diferente intensidad de turismo entre sexos, tallas y morfotipos.

MÉTODO

Área de estudio

Las muestras se obtuvieron del Parque Nacional de Revillagigedo (Fig. 2), Colima, México. Se muestreó en la Isla San Benedicto, en los sitios de buceo en donde se tienen registros de mayores avistamientos de mantas gigantes debido a que se encuentran las estaciones de limpieza (Ruiz, et al., 2018): “El Boiler” al noroeste, ubicado a 19°19'36"N, 110°48'36"W y “El Cañón” al sur, ubicado a 19°17'58"N, 110°48'30"W (Fig. 3).

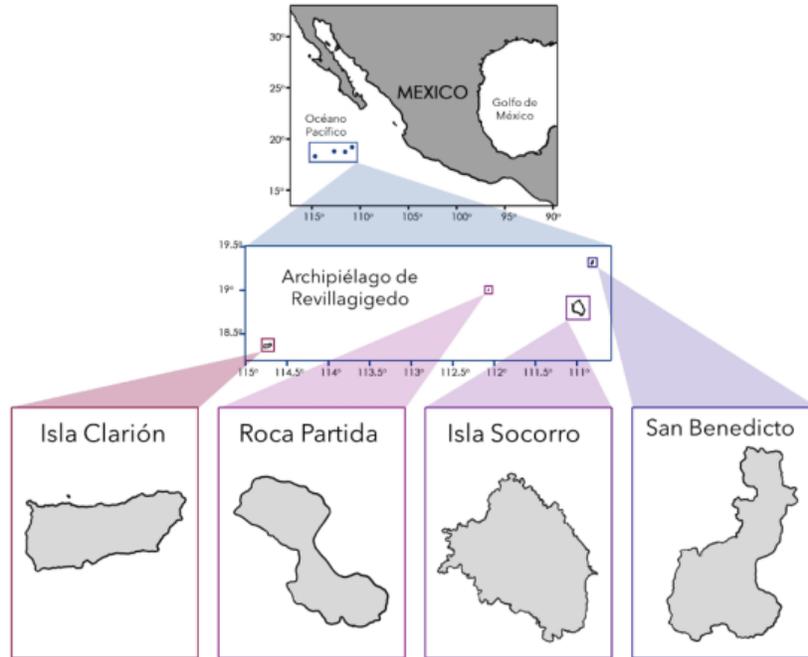


Fig. 2. Ubicación del Parque Nacional Revillagigedo en donde se amplían las cuatro islas. (CONANP, 2017)



Fig. 3. Isla San Benedicto, sitios de buceo en donde se realizó la toma de biopsias, 1. El Boiler y 2. El Cañón

Periodo de muestreo

La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) divide el año en dos temporadas (Tabla 1); temporada alta que abarca los meses de noviembre a junio y temporada baja que consta de los meses de julio a octubre. La temporada baja se refiere a que se prohíbe la entrada a embarcaciones turísticas debido a la temporada de huracanes.

Durante el año 2019 se realizaron dos muestreos, el primero se realizó del 17 al 30 de marzo y el segundo del 2 al 11 de noviembre.

Se realizaron los muestreos en estas fechas debido a que en marzo es la más alta recurrencia de turismo de buceo en el Parque Nacional de Revillagigedo (CONANP, 2017). El segundo viaje se realizó después de la temporada baja, cuando los buzos inician la llegada a los sitios de buceo.

Tabla 1. Calendario muestra, diferenciando los periodos de temporada alta (azul) en donde se permiten las actividades turísticas y temporada baja (rojo) en donde se prohíbe la entrada a las embarcaciones turísticas al Parque Nacional de Revillagigedo

| 2019 | | | |
|------------|---------|-----------|-----------|
| Enero | Febrero | Marzo | Abril |
| Mayo | Junio | Julio | Agosto |
| Septiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre |

Muestreos

Se utilizó una lancha cerca de la zona de buceo para recibir las muestras debido a que deben permanecer congeladas lo más rápido posible, por ello se utilizó un tanque de nitrógeno líquido con capacidad de 3 litros.

Registro de embarcaciones y buzos

Se registró la cantidad de embarcaciones y buzos que visitan el Parque Nacional en las fechas de muestreo. Se obtuvieron los datos de las embarcaciones en la totalidad del año 2019, otorgados por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), Parque Nacional de Revillagigedo.

Identificación de las mantas gigantes

Una vez en la inmersión se identificaron individualmente los organismos por medio de fotos y videos con cámaras sumergibles, en donde se registraron los patrones de pigmentación en la parte ventral de cada manta gigante para conocer si son organismos recurrentes en las islas, comparándolas con la guía de foto identificación (Preciado, 2018). Se estimó el tamaño de los organismos por medio de dos punteros láser sumergibles y una cámara GoPro. Se tomó video de la parte ventral del individuo y se tomó video del cuerpo con las

aletas pectorales distendidas y los dos haces de luz láser en su vientre. La distancia entre los dos punteros es de 20 cm y una vez obtenido el video, se saca una imagen donde se observen los dos puntos y por medio del programa AxioVision® se realiza una extrapolación y se marca la distancia total de punta a punta de las aletas pectorales lo cual da la amplitud del disco. En los organismos que no se pudo realizar este registro se obtuvieron las tallas por medio de comparaciones con respecto a personas u objetos con dimensiones conocidas. Se identificó el sexo de los organismos por presencia de gonopterigios en machos y ausencia en hembras.

Toma de biopsia muscular de manta gigante

La mejor muestra biológica indicativa del estrés fisiológico, como se demuestra en los antecedentes, es la sangre (eg. Hoffmayer y Parsons, 2001; Semeniuk *et al.*, 2009), en donde se pueden medir metabolitos directos, pero por cuestiones de factibilidad, logística y conservación de la especie, esta muestra no se puede obtener en mantas gigantes en vida libre, por lo que es importante buscar otras alternativas de evaluación.

Con base en la bibliografía consultada, los bioindicadores que pueden servir para la determinación de estrés en músculo son: como indicador de estrés agudo, el estrés oxidativo (Powers *et al.*, 2005; Powers y Jackson, 2008; López-Cruz *et al.* 2010; Vélez-Alavez *et al.*, 2013, 2015) y, como indicador de estrés crónico, la concentración de glucógeno (E. Black, Robertson, Hanslip, & Chiu, 1960; Driedzic & Hochachka, 1976; Mcveigh & Tarrant, 1982; Yunis, 1970).

Una vez con el registro individual y el registro de talla, se procedió a tomar las muestras del músculo esquelético de las aletas ventro-laterales de los animales, obtenidas por medio de buceo autónomo (scuba), utilizando arpones hawaianas con una punta especial llamada RB (sistema de biopsia de Reeb & Best) (Jaime-Rivera *et al.*, 2013). Este dardo tiene un tope en un extremo para detener la penetración a 4.6 cm de profundidad y a 0.02 cm de espesor. De acuerdo con Rivera *et al.* (2013) la tasa de éxito para la obtención de músculo mediante estas puntas es de 95%.

Las biopsias fueron obtenidas de la zona ventral de las aletas pectorales (Fig. 4) y se procedió a subirlas a la superficie en menos de 5 minutos ya que las reacciones del estrés oxidativo se metabolizan en este lapso (Botker, Helligso, Kimose, & Thomassen, 1994). Se

obtuvo aproximadamente 2.4 cm de tejido muscular de cada organismo, el cual se almacenó en crioviales de 4 mL identificados. Se congelaron inmediatamente en un contenedor de nitrógeno líquido de -196°C para su posterior análisis (Martín & García, 2012).



Fig. 4. Toma de biopsia en "El Boiler", San Benedicto.

Almacenamiento

Las 21 muestras obtenidas se almacenaron en tanque de nitrógeno líquido de 3 L durante los muestreos y una vez en tierra se almacenaron en un ultracongelador a -72°C .

Laboratorio

Para el traslado de las muestras al laboratorio de análisis se almacenaron en una hielera con hielo seco para mantener la temperatura de -70°C . Una vez en el laboratorio se almacenaron las muestras en nitrógeno líquido hasta su análisis.

Se midió el grosor de las tres capas del tejido de cada muestra (dermis, hipodermis, músculo) con un calibrador vernier.

La muestra se dividió en cuatro partes con una hoja de bisturí:

1. Dermis e hipodermis.

2. Músculo para análisis de histopatología (aprox. 300 mg) → se le añadió formol para fijar la muestra y procesarla.
3. Músculo para análisis de glucógeno y catalasa (aprox. 100 – 200 mg) → se le añadió 2 ml de Buffer de Lisis para la sonicación del tejido.
4. Músculo sobrante.

Extracción de compuestos celulares en micromuestras

A partir de este estudio se establece una nueva técnica para la extracción de los compuestos celulares a través de métodos enzimáticos con micromuestras, con el fin de poder leer glucosa a través de analizadores automáticos.

La extracción de estos metabolitos se realizó en las 21 muestras con un peso promedio de 129.45 ± 23.11 mg, las cuales fueron almacenadas en un buffer de lisis (TRIS 1M pH8, NaCl 5M, EDTA 0.5M pH8, SDS 10% y agua destilada).

Extracción:

1. Pesar 100 mg de tejido muscular.
2. Agregar 2 ml de Buffer de lisis.
3. Sonicar (Fig. 5) con una amplitud de onda del 40 % directo el tejido del criovial; 10 segundos de sonicación por 10 segundos de descanso durante 5 min. Debido a que la sonicación provoca un aumento de la temperatura, los crioviales deben ir inmersos en hielo molido.



Fig. 5. Sonicator empleado para extraer compuestos celulares, CVX 130 PB, Vibracell®

Los tejidos, después de ser sonicados, se criocentrifugaron a 14,000 rpm / 10 min / 4°C. Se separó el sobrenadante para los diferentes análisis:

1. Catalasa (500 μ L)
2. Glucógeno (500 μ L)

Después de la sonicación se confirmó si todo el tejido fue desintegrado con el fin de conocer si la liberación de los compuestos fue un proceso completo. Se realizaron frotis por el proceso de squash con el precipitado y se tiñeron con *Diff-Quick*.

Estrés oxidativo

La determinación de estrés oxidativo se realizó a través del kit: *Catalase assay, Cayman chemical®*. Este kit utiliza la función peroxidativa de la enzima catalasa (CAT) para determinar la actividad enzimática. El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H₂O₂. El formaldehído producido se mide colorimétricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como el cromógeno. Purpald forma un heterociclo bicíclico con aldehídos, que con la oxidación cambia de incoloro a un color púrpura. El ensayo se puede utilizar para medir la actividad de CAT en plasma, suero, lisados de eritrocitos, homogeneizados de tejidos y lisados celulares.

Preparación de reactivos

1. Tampón de ensayo de catalasa - Cada vial contiene 5 ml de tampón de ensayo. Diluir 2 ml de concentrado de tampón de ensayo de catalasa con 18 ml de agua ultrapura. Cuando se almacena a 4 ° C, este tampón de ensayo diluido es estable durante al menos dos meses.
2. Tampón de muestra de catalasa - Cada vial contiene 10 ml de tampón de muestra. Diluir 5 ml de tampón de catalasa concentrado con 45 ml de agua ultrapura. Este tampón de muestra final (fosfato de potasio 25 mM, pH 7.5, que contiene EDTA 1 mM y BSA al 0.1%) debe usarse para diluir las muestras de formaldehído, catalasa (control) y CAT antes del análisis. Cuando se almacena a 4 ° C, este tampón de muestra diluido es estable durante al menos dos meses.
3. Estándar de formaldehído de catalasa - El vial contiene 4.25 M de formaldehído. El reactivo está listo para usar como se suministra.
4. Catalasa (Control) - Cada vial contiene un polvo liofilizado de CAT de hígado bovino y se utiliza como control positivo. Reconstituir la catalasa (control) agregando 2 ml de tampón de muestra diluido al vial y agitar bien. Tomar 100 μ l de la enzima reconstituida y diluir con

1.9 ml de buffer de muestra diluido. La enzima diluida es estable durante 30 minutos. La Catalasa (Control) reconstituida es estable durante un mes a -20 °C.

5. Hidróxido de potasio catalasa - Cada vial contiene gránulos de hidróxido de potasio (KOH). Colocar el vial en hielo, agregar 4 ml de agua fría ultrapura y agitar en vórtex para obtener una solución de 10 M. PRECAUCIÓN: El calor se genera cuando los gránulos de hidróxido de potasio de catalasa se disuelven en agua. La solución diluida de hidróxido de potasio es estable durante al menos tres meses si se almacena a 4 °C.

6. Peróxido de hidrógeno de catalasa - El vial contiene una solución 8.82 M de H₂O₂. Diluir 40 µl de peróxido de hidrógeno de catalasa con 9.96 ml de agua ultrapura. La solución diluida de peróxido de hidrógeno es estable durante dos horas.

7. Catalasa Purpald (Cromógeno) - Cada vial contiene 4 ml de 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) en ácido clorhídrico 0.5 M. El reactivo está listo para usar como se suministra.

8. Peryodato de potasio de catalasa - Cada vial contiene 1,5 ml de peryodato de potasio en hidróxido de potasio 0.5 M. El reactivo está listo para usar como se suministra.

Curva estándar

Una vez establecida la curva de calibración de las diluciones de formol, se realizó la concentración en base a la dosis inicial (sin diluciones) del formaldehído ya que en la curva estándar se obtenían valores muy bajos, se concentró el formaldehído proveniente de Cayman Chemical® y se obtuvo el promedio de los resultados (Fig. 6).

Preparación de los patrones de formaldehído: Se tomaron siete tubos de ensayo de vidrio y se marcaron de la A-G. Se agregó la cantidad de formaldehído y el tampón de muestra diluido a cada tubo (Tabla 2).

Tabla 2. Preparación de patrones para la curva estándar de catalasa

| Tubo | Formaldehído (μL) | Tampón de muestra (μL) | Concentración final (μM de formaldehído) |
|------|-------------------|------------------------|--|
| A | 0 | 1000 | 0 |
| B | 10 | 990 | 5 |
| C | 30 | 970 | 15 |
| D | 60 | 940 | 30 |
| E | 90 | 910 | 45 |
| F | 120 | 880 | 60 |
| G | 150 | 850 | 75 |

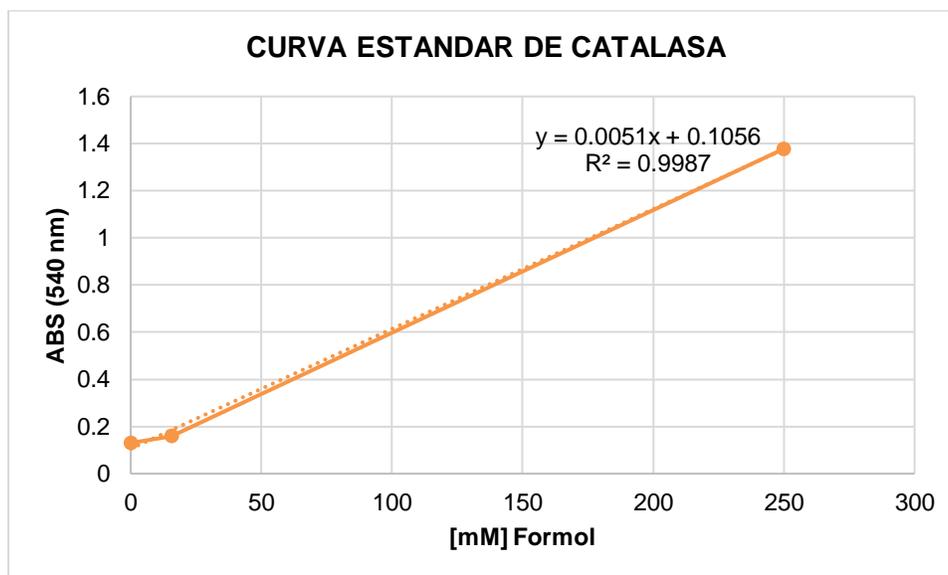


Fig. 6. Curva estándar de las absorbancias obtenidas proporcionadas por el kit Cayman Chemical. Representación gráfica de la señal que se mide en función de la concentración de la catalasa, todos los datos de campo, para ser válidos, deben entrar dentro del valor mínimo y máximo de esta curva.

Realización del análisis:

1. Pozos estándar de formaldehído: agregar 100 μl de tampón de ensayo diluido, 30 μl de metanol y 20 μl de estándar (tubos A-G) por pocillo en los pocillos designados en la placa.
2. Pozos de control positivo (CAT de hígado bovino): agregar 100 μl de tampón de ensayo diluido, 30 μl de metanol y 20 μl de catalasa diluida (control) a dos pocillos.

3. Pozos de muestra: agregar 100 μl de tampón de ensayo diluido, 30 μl de metanol y 20 μl de muestra.
 4. Iniciar las reacciones agregando 20 μl de peróxido de hidrógeno diluido a todos los pocillos que se utilizan. Asegurarse de anotar el momento preciso en que se inicia la reacción y agregarlo lo más rápido posible.
 5. Cubrir la placa con la cubierta de la placa e incubar en un agitador durante 20 min a temperatura ambiente.
 6. Agregar 30 μl de hidróxido de potasio diluido a cada pocillo para terminar la reacción y agregar 30 μl de Purpald (Cromógeno) a cada pocillo.
 7. Cubrir la placa con la cubierta de la placa e incubar durante 10 min a temperatura ambiente en el agitador.
 8. Agregar 10 μl de Peryodato de potasio a cada pocillo. Cubrir con la tapa de placa e incubar cinco min a temperatura ambiente en un agitador.
 9. Leer la absorbancia a 540 nm utilizando un lector de placa (Fig. 7)
- Este procedimiento se realizó tres veces en las muestras por separado para obtener promedios de las absorbancias y estandarizar los resultados de las muestras.

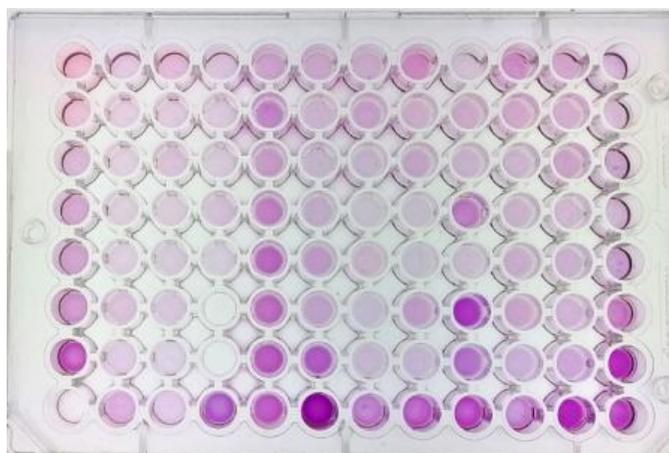


Fig. 7. Placa de trabajo de catalasa, se presenta la reacción química del colorante Purpald de las curvas estándar y las muestras leídas en el espectrofotómetro

Glucógeno

El glucógeno se determinó a través del kit modificado: *Glycogen assay*, Cayman chemical®. Este kit determina glucógeno en el tejido. El glucógeno es hidrolizado por la enzima amiloglucosidasa para formar β -D-glucosa. Esta presentó una absorbancia la cual fue leída en un analizador automático llamado A15 de BioSystem que puede medir la absorbancia

de hasta 3 μL de una muestra. Se determinó la glucosa libre de las muestras resultando en un valor 0. Por lo tanto, en cuanto se aplicó la enzima, todos los resultados finales de glucosa pertenecieron a la glucosa liberada por la hidrólisis del glucógeno.

Preparación de reactivos

1. Estándar de glucógeno - Cada vial contiene glucógeno liofilizado. Reconstituir el contenido del vial con 1 ml de tampón de ensayo diluido para obtener una solución de 2 mg / ml de glucógeno. Este reactivo se usó para preparar la curva estándar. Cuando se almacena a temperatura ambiente, el estándar reconstituido es estable durante dos horas.
2. Tampón de ensayo de glucógeno - El vial contiene 14 ml de un tampón de fosfato concentrado, pH 7.0. Descongelar a temperatura ambiente y diluir el contenido con 56 ml de agua ultrapura. Asegurarse de enjuagar el vial para eliminar cualquier sal que pueda haber precipitado. Cuando se almacena a 4 °C, el tampón de ensayo diluido es estable durante al menos tres meses.
3. Enzima de hidrólisis de glucógeno - Cada vial contiene un polvo liofilizado de amiloglucosidasa. Reconstituir el contenido del vial con 3 ml de tampón de hidrólisis de glucógeno y guardar en hielo. Cuando se almacena a 4 °C, la solución reconstituida es estable durante noventa minutos.
4. Tampón de hidrólisis de glucógeno - El vial contiene 10 ml de tampón de acetato 50 mM, pH 4.5. Descongelar el vial a temperatura ambiente. El búfer está listo para usar como se suministra. Almacenar cualquier tampón no utilizado a 4 °C. El tampón es estable durante dos meses a 4 °C.

Curva estándar

La curva de glucógeno se realizó con el reactivo estándar de glucógeno de una concentración de 2 mg /dl en diluciones dobles de la siguiente manera (Fig. 8)

1. 10 μL de estándar de glucógeno.
2. Diluciones dobles de 5 pozos con 10 μL de agua ultrapura.
3. 50 μL de enzima de hidrólisis a cada pozo.
4. Incubar a 37°C por 120 min.
5. Agregar 50 μL de agua ultrapura.
6. Lectura de glucosa en analizadores automatizados.

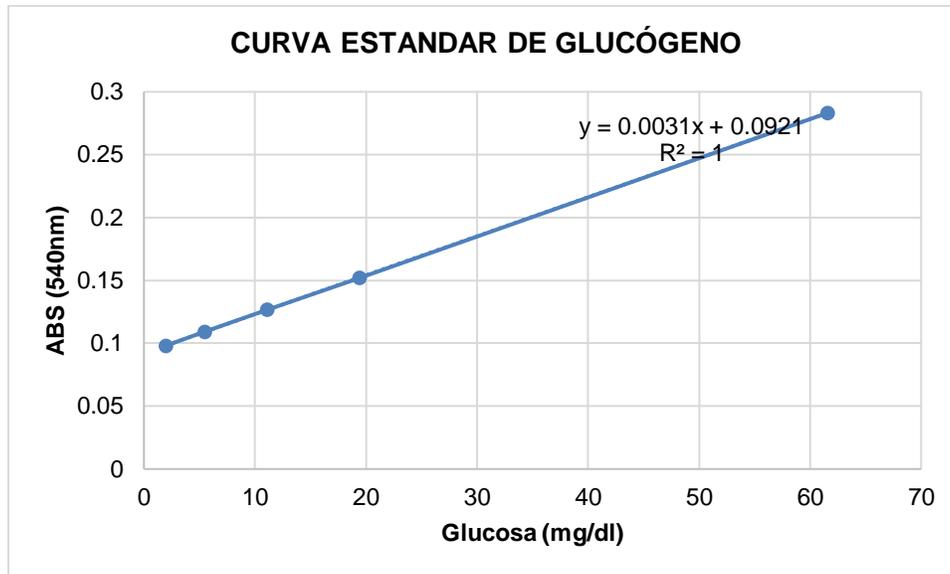


Fig. 8. Curva estándar de las absorbancias obtenidas por el kit Cayman Chemical por medio de la modificación del procedimiento. Representación gráfica de la señal que se mide en función de la concentración de la hidrólisis del glucógeno. Todos los datos de campo, para ser válidos, deben entrar dentro del valor mínimo y máximo de esta curva.

Realización del análisis:

1. 10 μ L de muestra + 50 μ L de enzima de hidrólisis.
2. 120 min en horno a 37°C.
3. 50 μ L de agua ultrapura.
4. Lectura en analizador automatizado *BioSystems A15*® (Fig. 9).

Este proceso se repitió tres veces por separado en las muestras para obtener promedios de las muestras y estandarizar los resultados.



Fig. 9. Analizador automático de lectura fotométrica A15 de *BioSystems*®, capaz de leer absorbancias de hasta 3 μ L de muestra

Análisis estadístico para estrés oxidativo y glucógeno

Análisis 1. Shapiro Wilk

Una vez definidos y estudiados los valores obtenidos, se debe concretar si provienen de la normalidad, por medio de la prueba de bondad de Kolmogorov-Smirnov, la cual se basa en la comparación de la Función de Distribución Acumulada de los datos observados con respecto a la de una distribución dada, midiendo la máxima distancia entre ambas curvas (Royston, 1983). En donde no se requiere un agrupamiento de los datos en clases como en otras pruebas de bondad y puede aplicarse sin importar el tamaño de muestra bajo, en este caso menores a 50 (Royston, 1983).

Análisis 2. Prueba de U de Man-Wihtney

Conocida como prueba de suma de rango de Wilcoxon, evalúa las diferencias entre dos grupos con diferentes tamaños de muestra en cada grupo, en una sola variable ordinal sin distribución específica (Perkins, 2002). La prueba U de Mann-Whitney es la versión no paramétrica de la prueba T de Student paramétrica. Ambas pruebas requieren dos grupos muestreados independientemente y se evalúa si dos grupos difieren en una sola variable continua (Perkins, 2002).

Análisis 3. Regresión y correlación lineal

La correlación y la regresión lineales simple son métodos estadísticos que estudian la relación lineal existente entre dos variables. La correlación cuantifica la relación de dos variables, mientras que la regresión lineal consiste en generar una ecuación (modelo) para conocer la relación existente entre ambas variables y que, permita predecir el valor de una a partir de la otra.

El cálculo de la correlación entre dos variables es independiente del orden o asignación de cada variable a X y Y, mide únicamente la relación entre ambas sin considerar dependencias. En el caso de la regresión lineal, el modelo varía según qué variable se considere dependiente de la otra, lo cual no implica causa-efecto. A nivel experimental, la correlación se suele emplear cuando ninguna de las variables se ha controlado; simplemente se han medido ambas y se desea saber si están relacionadas.

Para los análisis estadísticos se empleó el programa de RStudio para la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de U de Man-Whitney. Para la representación gráfica se empleó el programa de JMP *Statistical Discovery*.

RESULTADOS

Resultados de campo

Primer muestreo

Se realizó el viaje en la embarcación “SAMAYA” de la organización *Ocean Blue Tree*, del 17 al 30 de marzo de marzo del 2019. En 15 días se identificaron 9 embarcaciones turísticas, cada una contaba con dos lanchas, las cuales transportaban en promedio 10 buzos, incluyendo un guía (Tabla 3). Cada lancha realizaba tres o cuatro inmersiones al día. Los buceos realizados en un sitio específico iniciaban desde las 7 am hasta aproximadamente las 6 pm. Las inmersiones entre las embarcaciones fueron continuas en los sitios de buceo.

Tabla 3. Registro de las embarcaciones en el periodo con mayor intensidad de turismo. Se registra el nombre de las embarcaciones presentes en el Parque Nacional de Revillagigedo con cuantas lanchas de transporte cuentan y cupo máximo aproximado. X = sin información; NA = No aplica.

| Embarcaciones y buzos | | | | | |
|-----------------------|-------------------|---------|---------|---------|-------|
| Marzo 2019 | | | | | |
| # | Nombre | Lanchas | Buzos 1 | Buzos 2 | Total |
| 1 | El Quino | 2 | 7 | 9 | 16 |
| 2 | Nautilus Undersea | 2 | 10 | 10 | 20 |
| 3 | Samaya* | 2 | 7 | 9 | 16 |
| 4 | Rocío del mar | 2 | 10 | 9 | 19 |
| 5 | Bella Amie | 2 | X | X | 32 |
| 6 | Solmar V | 2 | 10 | 9 | 19 |
| 7 | Valentina | 2 | 10 | 9 | 19 |
| 8 | Casiopea | 2 | X | X | X |
| 9 | Martin Sheen* | 1 | 5 | NA | 5 |
| | | 17 | | Total | 146 |

*Estos barcos estaban realizando monitoreo e investigación científica, no son de ecoturismo.

Se realizaron tres inmersiones al día cuando se obtuvieron muestras de “El Boiler”, isla San Benedicto, en las fechas 18, 19, 28 y 29 de marzo del 2019 (Tabla 4).

Tabla 4. Mantas gigantes muestreadas y registradas en el periodo con mayor intensidad de turismo. *Sexo = M: Macho, H: Hembra

| Primer muestreo | | | | |
|-----------------|------------|-------|-----------|-----------|
| Marzo 2019 | | | | |
| # | Fecha | Sexo* | Talla (m) | Morfotipo |
| 1 | 18/03/2019 | H | 4.7 | Negra |
| 2 | 19/03/2019 | H | 3.5 | Chevión |
| 3 | 19/03/2019 | M | 2.5 | Chevión |
| 4 | 19/03/2019 | H | 4 | Negra |
| 5 | 19/03/2019 | M | 2.5 | Chevión |
| 6 | 19/03/2019 | H | 3.7 | Negra |
| 7 | 28/03/2019 | M | 4.5 | Negra |
| 8 | 28/03/2019 | H | 3.5 | Chevión |
| 9 | 28/03/2019 | M | 4.8 | Chevión |
| 10 | 29/03/2019 | H | 4.2 | Chevión |
| 11 | 29/03/2019 | M | 3 | Chevión |
| 12 | 29/03/2019 | M | 3.7 | Negra |
| 13 | 29/03/2019 | M | 2.8 | Chevión |
| 14 | 29/03/2019 | H | 4.1 | Chevión |

Segundo muestreo

Se realizó en la embarcación turística “El Quino Guardián”. El viaje de muestreo se realizó del 2 al 11 de noviembre del 2019.

En 9 días se identificaron tres embarcaciones turísticas. Cada una contaba con dos lanchas, las cuales transportaban en promedio 10 buzos, incluyendo un guía (Tabla 5). Cada lancha realizaba tres o cuatro inmersiones al día.

Tabla 5. Registro de las embarcaciones en el periodo con menor intensidad de turismo. Se registra el nombre de las embarcaciones presentes en el Parque Nacional de Revillagigedo, número de lanchas y cupo máximo.

| Embarcaciones y buzos | | | | | |
|-----------------------|---------------|---------|---------|---------|-------|
| Noviembre 2019 | | | | | |
| # | Nombre | Lanchas | Buzos 1 | Buzos 2 | Total |
| 1 | El Quino | 2 | 9 | 10 | 19 |
| 2 | Rocío del Mar | 2 | 11 | 11 | 22 |
| 3 | Vortex | 2 | 7 | 7 | 14 |
| | | 6 | | Total | 55 |

Se realizaron 3 inmersiones al día en los sitios de buceo, obteniendo muestras en “El Boiler” y “El Cañón”, isla San Benedicto, en las fechas 6 y 10 de noviembre del 2019 (Tabla 6).

Tabla 6. Mantas gigantes muestreadas y registradas en el periodo con menor intensidad de turismo. *Sexo = M: Macho, H: Hembra

| Segundo muestreo | | | | |
|------------------|------------|------|-----------|---------|
| Noviembre 2019 | | | | |
| # | Fecha | Sexo | Talla (m) | Tipo |
| 1 | 06/11/2019 | H | 4.2 | Negra |
| 2 | 06/11/2019 | H | 4.3 | Chevrón |
| 3 | 06/11/2019 | H | 4.4044 | Chevrón |
| 4 | 06/11/2019 | M | 3.8306 | Chevrón |
| 5 | 06/11/2019 | H | 4.5376 | Chevrón |
| 6 | 10/11/2019 | M | 3.1209 | Chevrón |
| 7 | 10/11/2019 | H | 3.7 | Chevrón |

Registro de CONANP 2019

Durante el 2019 se realizaron aproximadamente 238 visitas de embarcaciones con fines de realizar actividades turístico-recreativas de campo, de las cuales 217 visitas fueron realizadas por prestadores de servicios turísticos, con la autorización para prestar servicios turísticos con fines lucrativos, conocidos comúnmente como “Liveboards”. Veinte visitas fueron realizadas por embarcaciones privadas (yates y veleros), con fines particulares y sin fines de lucro, con propósitos de realizar buceo autónomo.

En este mismo año se recibieron aproximadamente entre 4,800 a 5,000 turistas, donde el 95% aproximadamente realizan la actividad de buceo autónomo y el 5% aproximadamente solo buceo libre (snorkel). Se registraron aproximadamente 119,020 inmersiones totales en el Parque Nacional de Revillagigedo durante 2019.

Toma de biopsia muscular de manta gigante

Se obtuvieron un total de 21 muestras de tejido muscular. En promedio las muestras fueron de 2.7 ± 1.0 cm de longitud, con un peso promedio de 586.5 ± 90.46 mg de tejido, las cuales se almacenaron en crioviales, que a su vez se almacenaron dentro de las canastillas del tanque de nitrógeno líquido en menos de 5 minutos con respecto al momento de colecta.

A las biopsias se les realizó un estudio histológico con el fin de conocer la constitución del tejido muscular. Las muestras se procesaron y se tiñeron con Hematoxilina–Eosina (HE) para observar la estructura celular (Figs. 10 y 11).

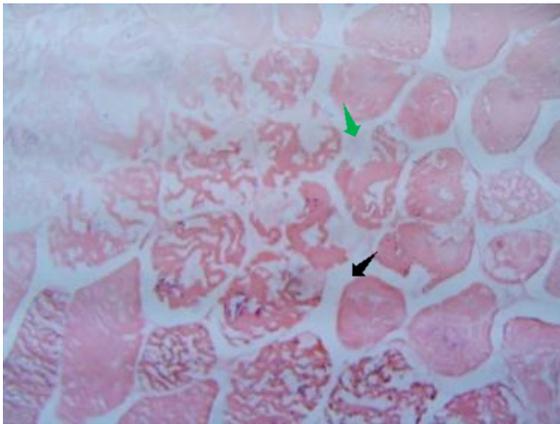


Fig. 10. Muestra 5. Tinción HE (10X). Se observan afecciones como la disgregación del endomisio (↔), no se presentan las estrías transversales y en algunas zonas se ve vacuolización (↔). Los núcleos se observan disminuidos de tamaño y amorfos, en algunas fibras musculares no se presentan núcleos.

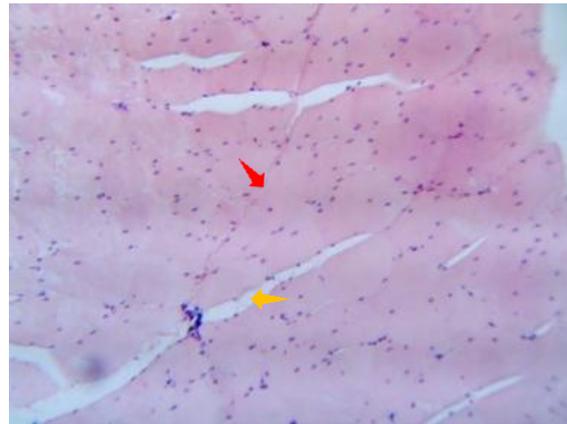


Fig. 11. Muestra 3. Tinción HE (10X). Se observan las fibras musculares completas y en cohesión, el tejido conectivo del perimisio (↔) y del endomisio (↔), dentro de la fibra muscular se observan los núcleos basófilos en la periferia de las células.

Extracción de compuestos celulares en micromuestras

Después de la sonicación del tejido muscular, se separó el contenido intercelular y la estructura celular por medio de la criocentrífuga, obteniendo el sobrenadante y el

precipitado. Con el fin de asegurar la disgregación total de las células por la sonicación, se realizaron frotis con el precipitado de las muestras (Figs. 12 y 13).

En las laminillas se observó un material mucoso basófilo amorfo, de contenido proteínico y compuesto de restos celulares, con zonas translúcidas, dependiendo del grosor de la muestra. No se observaron células completas ni núcleos.

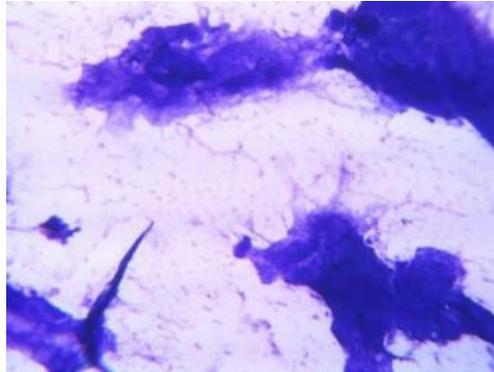


Fig. 12. Laminilla 7. Material mucoso y proteínico (10X), muestra de la correcta sonicación y disgregación total del tejido muscular.

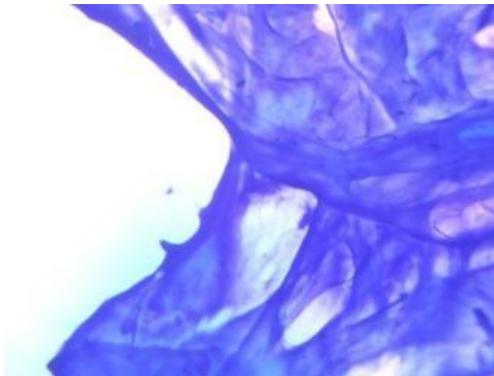


Fig. 13. Laminilla 13. Material mucoso y proteínico (40X), muestra de la correcta sonicación y disgregación total del tejido muscular.

Estrés oxidativo

En promedio para el periodo con mayor turismo se obtuvieron 1382.33 ± 700.59 unidades CAT/mg de tejido a diferencia del periodo con menor turismo de 2819.67 ± 1015.03 unidades CAT (ANEXO I). Se aplicó el análisis de Shapiro-Wilk para describir los valores obtenidos sobre las unidades catalasa con un p valor = 0.0011 ($p < 0.05$), los cuales resultaron no paramétricos.

Se realizó una gráfica de comparación, por medio del análisis de U Mann-Whitney obteniendo un Valor de $U=8$ con un p valor = 22 ($p < 0.05$), en donde se observó la comparación de los periodos con diferente intensidad de turismo por las unidades de catalasa por miligramo de tejido obtenidas de las 21 mantas gigantes (Fig. 14). Se realizó una aproximación a la Z debido a que uno de los grupos experimentales cuenta con menos de 10 datos (periodo con menor intensidad de turismo con siete datos), en donde $Z=-3.02149$ con un p valor= 0.00252. ($p < 0.05$); como este valor es menor al nivel de significancia se determinó una diferencia significativa entre los periodos de turismo. Se observó una mayor variabilidad en los valores de catalasa en las mantas del periodo con la menor densidad de turismo, en comparación con los valores obtenidos en la temporada con mayor turismo en donde se percibe un cúmulo de valores entre las 1000 y 1300 unidades de catalasa.

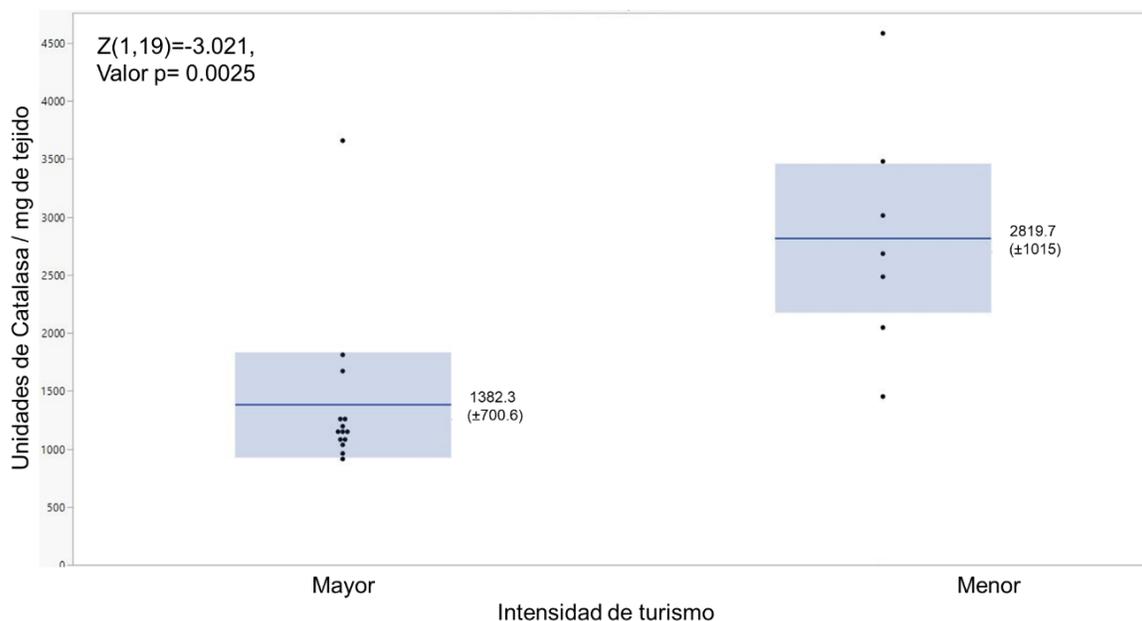


Fig. 14. Unidades de catalasa por mg de tejido entre los periodos con diferente intensidad de turismo. A pesar de que se aplicaron pruebas no paramétricas se realizó una aproximación a la normalidad (Z) debido a que uno de los grupos testigo cuenta con menos de 10 datos.

Análisis y comparación de variables

Se realizó una comparación múltiple entre las principales tres variables (sexo, talla y morfotipo) entre los periodos con diferente intensidad de turismo, con respecto a las unidades de catalasa por miligramo de tejido.

Las hembras presentaron una mayor variabilidad en los valores del periodo con menor turismo en comparación con el otro periodo (Fig. 15). Los valores que sobresalieron del rango intercuartil podrían considerarse como datos atípicos. Al momento de retirarlos no hubo cambios significativos. No se presentó una diferencia estadística de las unidades de catalasa entre los periodos de turismo en las hembras $F(1,10) = 4.33$ con un valor $p = 0.0642$ mayor del nivel de significancia ($p < 0.05$).

A pesar de que los machos cuentan con un menor número de valores, se observa que en el periodo de mayor turismo los niveles de las unidades de catalasa fueron menores y se concentraron entre las 900 y 1300 unidades. Se presentó una diferencia significativa entre los diferentes periodos de turismo con respecto a las unidades de catalasa que presentan los machos con un valor $p = 0.0005$ ($p < 0.05$).

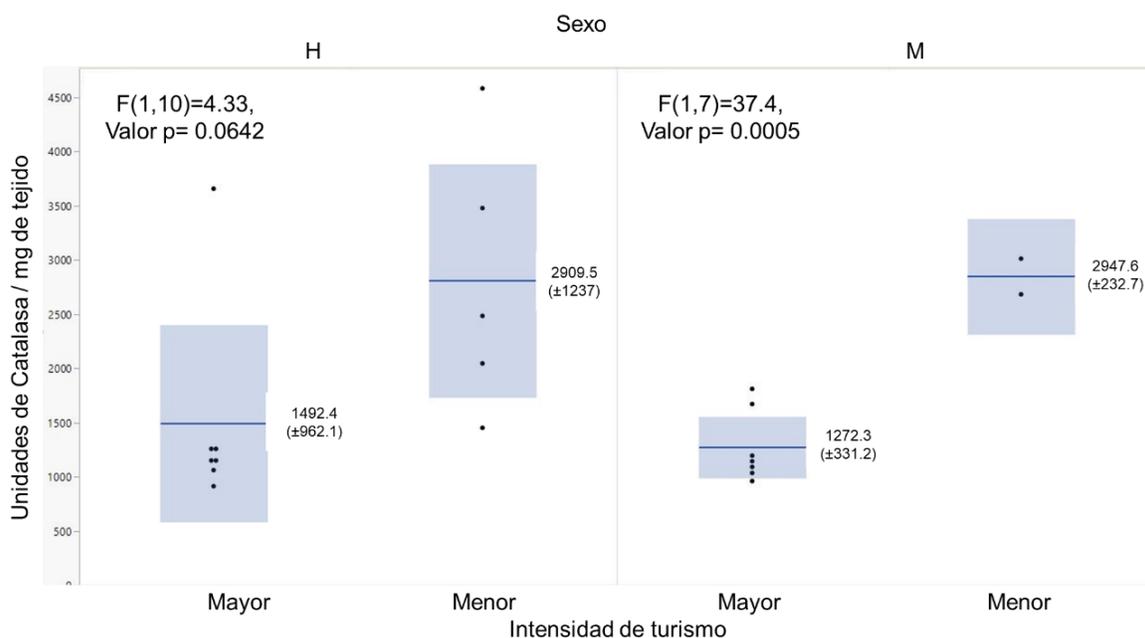


Fig. 15. Unidades de catalasa por miligramo de tejido entre los sexos (H= hembras/ M= machos) y a su vez, entre los diferentes periodos de turismo.

En la siguiente gráfica se observa la distribución de las tallas de las mantas y la diferencia entre los periodos (Fig. 16). En el periodo de mayor turismo la mayoría de los valores se encuentran dentro de las bandas de confianza. En el periodo con mayor intensidad de

turismo no existió una inclinación de la recta de correlación ($R^2 = 0.050$), indicando que la correlación entre los valores fue nula.

En el periodo con menor turismo se presentó una ligera inclinación con una correlación de ($R^2 = 0.069$) por lo tanto nula.

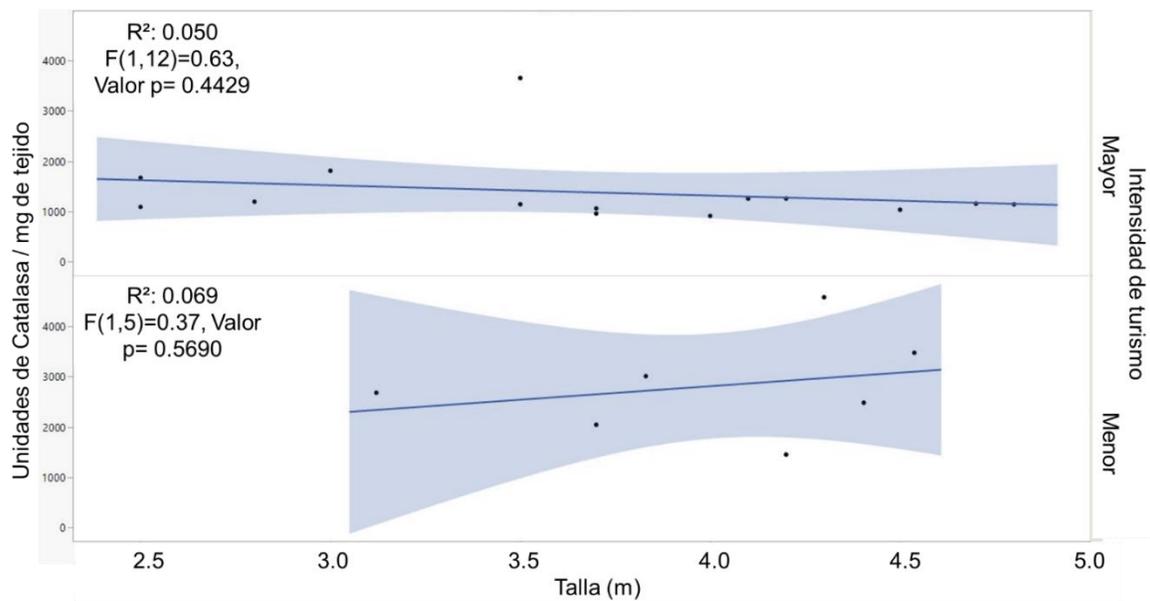


Fig. 16. Correlación lineal de las unidades de catalasa por miligramo de tejido entre los diferentes periodos de turismo por tallas (ancho de disco en metros). Se obtiene el valor R^2 y en caso de tener una correlación positiva o negativa, para evitar la casualidad se obtiene el valor p .

Con respecto a los caracteres morfológicos, se realizó, la diferenciación del morfotipo entre los periodos de turismo con base en las unidades de catalasa. Se observó una mayor variabilidad en los valores del grupo de las mantas tipo chevrón en comparación con el tipo negras, concentrando sus valores entre las 500 y 1000 unidades de catalasa presentes en músculo (Fig. 17). Se obtuvieron diferencias significativas entre morfotipos con un p valor = 0.0313 ($p < 0.05$).

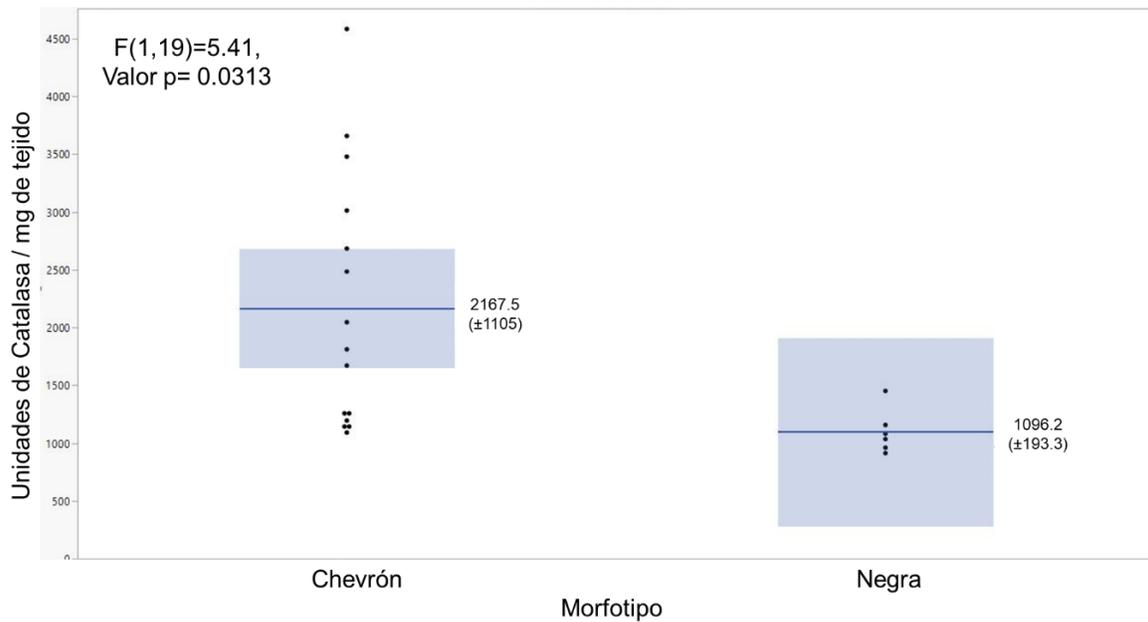


Fig. 17. Unidades de catalasa por miligramo de tejido entre los morfotipos.

Se realizó la diferencia del morfotipo entre los periodos de diferente intensidad de turismo (Fig. 18). En las mantas tipo chevrón del periodo con mayor turismo se observó una menor cantidad de unidades de catalasa con un grupo concentrado entre los 1000 y 1500, en comparación con el periodo con menor turismo en donde los valores presentaron mayor variabilidad. Se presentaron diferencias significativas entre las mantas de morfotipo chevrón entre los periodos de turismo (p valor = 0.0060 ($p < 0.05$)).

Con respecto a las mantas de morfotipo negro, en el periodo con mayor turismo se concentran los valores entre 900 y 1100 unidades de catalasa, a diferencia del periodo con menor turismo en donde se muestreó solo un organismo con mayor cantidad de unidades de catalasa. Se presentaron diferencias significativas (p valor = 0.0145 ($p < 0.05$)) entre las mantas de morfotipo negra entre los periodos de turismo, a pesar de las pocas muestras obtenidas.

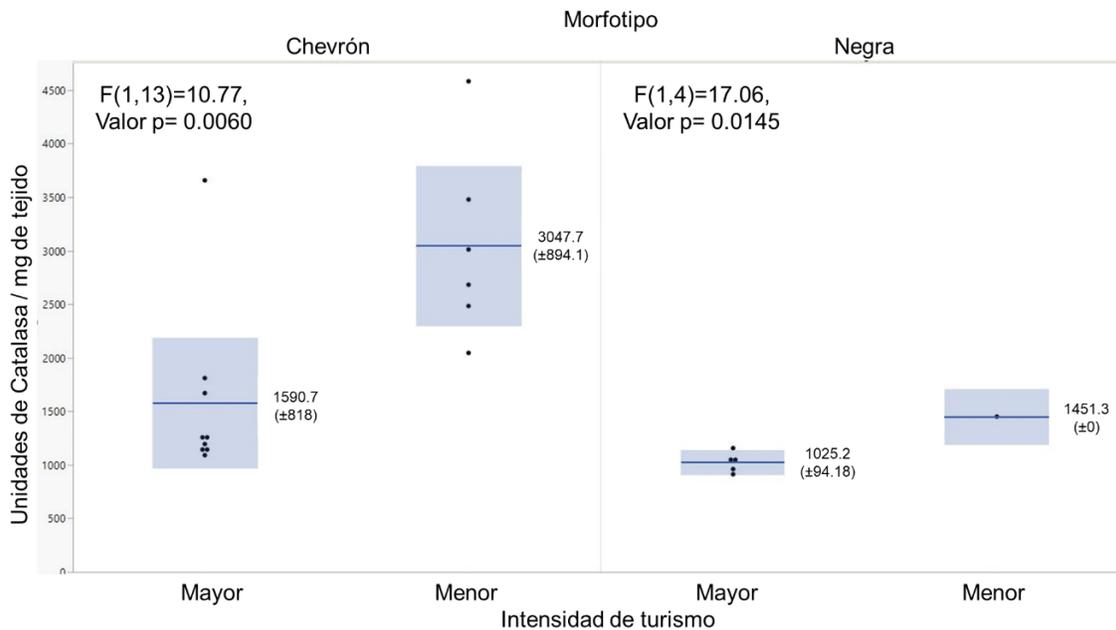


Fig. 18. Unidades de catalasa por miligramo de tejido entre los morfotipos chevrón y negra, y a su vez, entre los diferentes periodos de turismo.

Glucógeno

En promedio, en el periodo con mayor turismo se obtuvieron 9.91 ± 2.14 ng de glucógeno hidrolizado/ mg de tejido, en comparación con el periodo de menor turismo 10.67 ± 1.37 ng de glucógeno hidrolizado (ANEXO II). Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para describir los valores obtenidos de glucógeno hidrolizado ($W = 0.9587$, p-valor = 0.4902 ($p < 0.05$)), lo que significa que los valores se comportan como paramétricos. A pesar esto, se decidieron realizar pruebas no paramétricas debido al número de muestra y a la alta variabilidad a la que éstas están sujetas.

Se realizó el análisis de U de Mann-Whitney obteniendo un valor de $U = 33$ con un p valor = 26 ($p < .05$). A pesar de este valor se realizó una aproximación a la forma de la distribución normal ya que se vuelve menos robusta en tamaños de muestra de un grupo menores a 10 (periodo de menor turismo con 7 datos), por lo que se obtiene el valor $Z = -1.15637$ con un p valor = 0.12302 ($p < .05$), lo que indica que no existe una diferencia significativa entre los periodos de turismo con respecto a los ng de glucógeno hidrolizado obtenido.

Se realizó una gráfica comparativa entre los periodos con diferente intensidad de turismo con respecto a la cantidad de nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido muscular (Fig. 19), en donde se aprecia que el periodo con mayor turismo tiene mayor variabilidad en sus valores en comparación con el de menor turismo. En el periodo con mayor turismo se presentaron datos muy altos que podrían ser atípicos, pero debido a la poca cantidad de muestras, se decidió trabajar con todos los datos. Por otra parte, se removieron los valores que se creían atípicos y no generaron ninguna diferencia estadística.

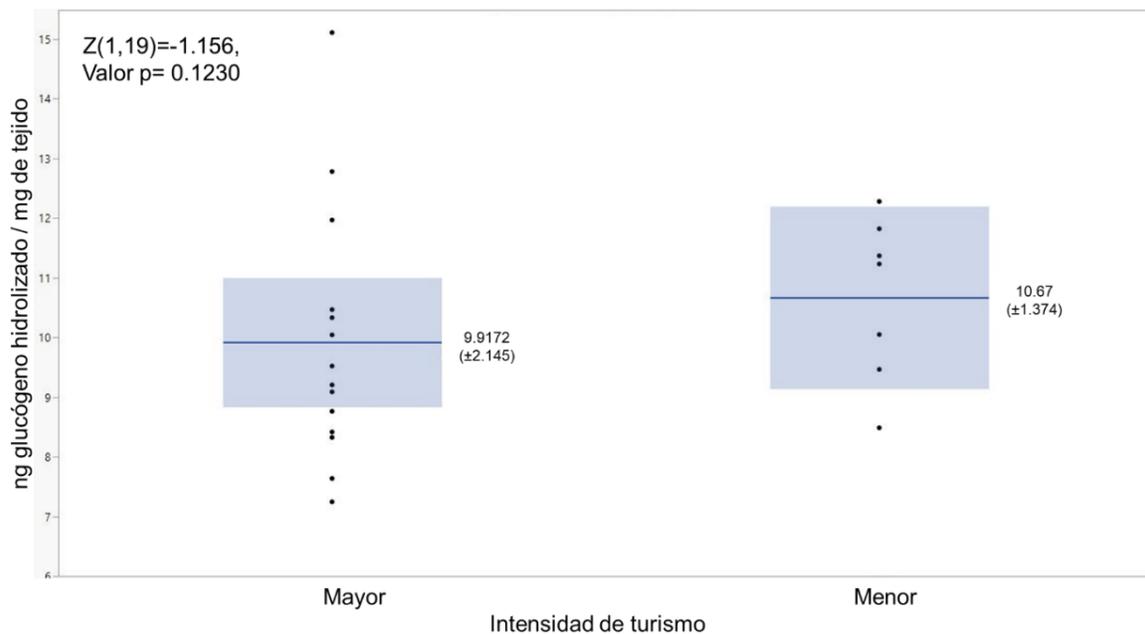


Fig. 19. Nanogramos de glucógeno hidrolizado por mg de tejido entre los periodos con diferente intensidad de turismo. A pesar de que se aplicaron pruebas no paramétricas se realiza una aproximación a la normalidad (z) debido a que uno de los grupos testigo cuenta con menos de 10 datos

Análisis y comparación de variables

Se realizó una comparación múltiple entre las tres variables principales (sexo, talla y morfotipo) entre los periodos con diferente intensidad de turismo con respecto a los nanogramos de glucosa por miligramo de tejido.

Se realizó la gráfica comparativa de hembras y machos con la concentración de los nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido entre periodos con diferente intensidad de turismo (Fig. 20). Tanto en hembras como machos, el promedio del glucógeno

fue mayor en la temporada de menor turismo. En este sentido no se obtuvieron diferencias significativas en hembras (p valor = 0.2608) como en machos (p valor = 0.8786).

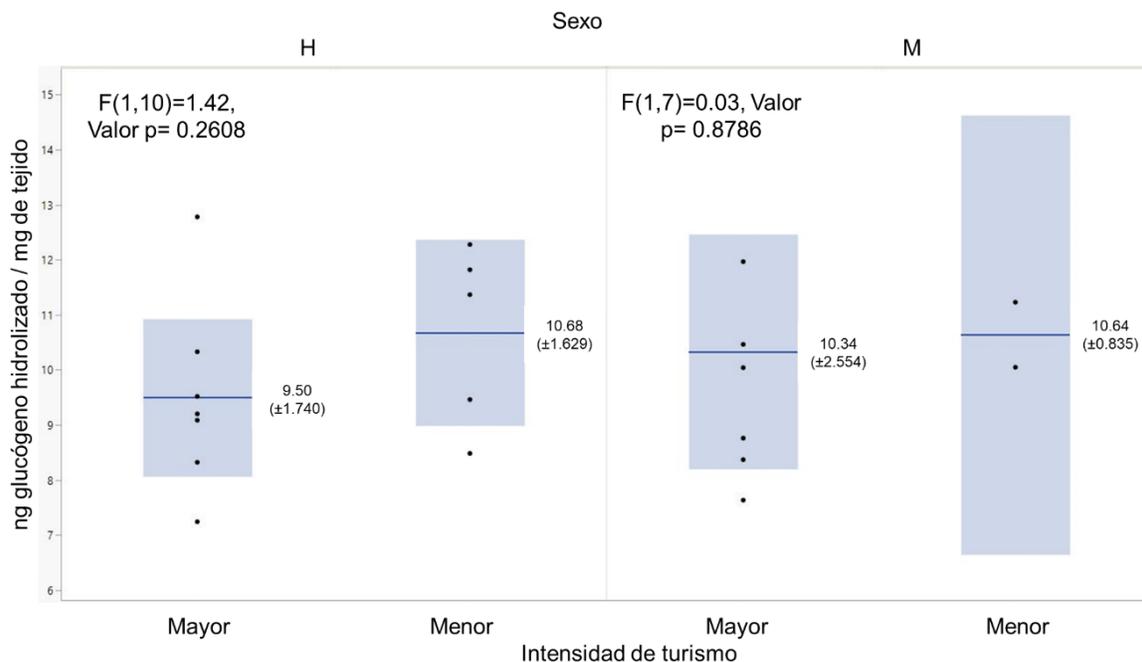


Fig. 20. Nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido entre los sexos (H= hembras/ M= machos) y a su vez, entre los diferentes periodos de turismo.

La talla total (ancho de disco) de las mantas se comparó entre los periodos de diferente intensidad de turismo, con respecto a los nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido (Fig. 21). En el periodo con mayor intensidad de turismo se observó una ligera correlación negativa ($R^2 = 0.037$), sin embargo, esta fue nula y sin significancia ($p = 0.5111$). De igual forma, en el periodo con menor turismo, que cuenta con menos datos, se obtuvo una correlación nula ($R^2 = 0.007$) y sin significancia ($p = 0.8625$).

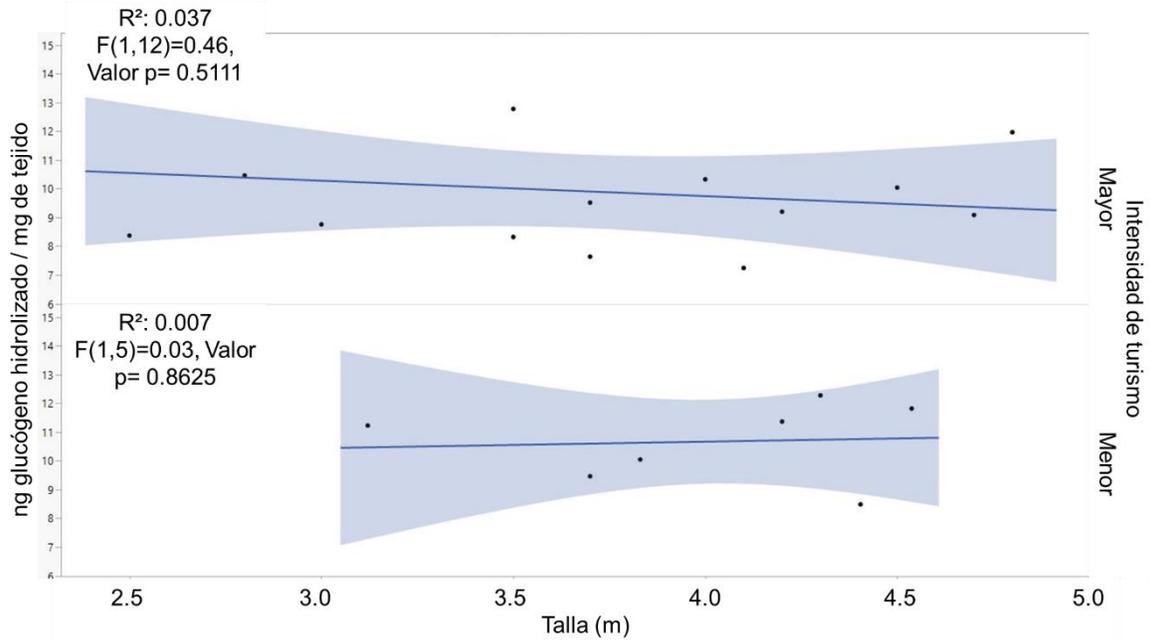


Fig. 21. Correlación lineal de los nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido entre los diferentes periodos de turismo por tallas (metros). Se obtiene el valor R^2 y en caso de tener una correlación positiva o negativa, para evitar la casualidad se obtiene el valor p .

Con respecto a las diferencias morfológicas, se realizaron las comparaciones entre los periodos de turismo de los nanogramos de glucógeno hidrolizado obtenido (Fig. 22). En las mantas tipo chevrón se registraron valores con alta variabilidad en los dos periodos de turismo, con medias similares. Por lo tanto, no existe una diferencia entre los periodos de turismo (p valor = 0.7960). Con respecto a las mantas morfo negro, a pesar de que fue un número bajo de biopsias, tampoco se encontró una diferencia significativa (p valor = 0.1524) entre los periodos de turismo.

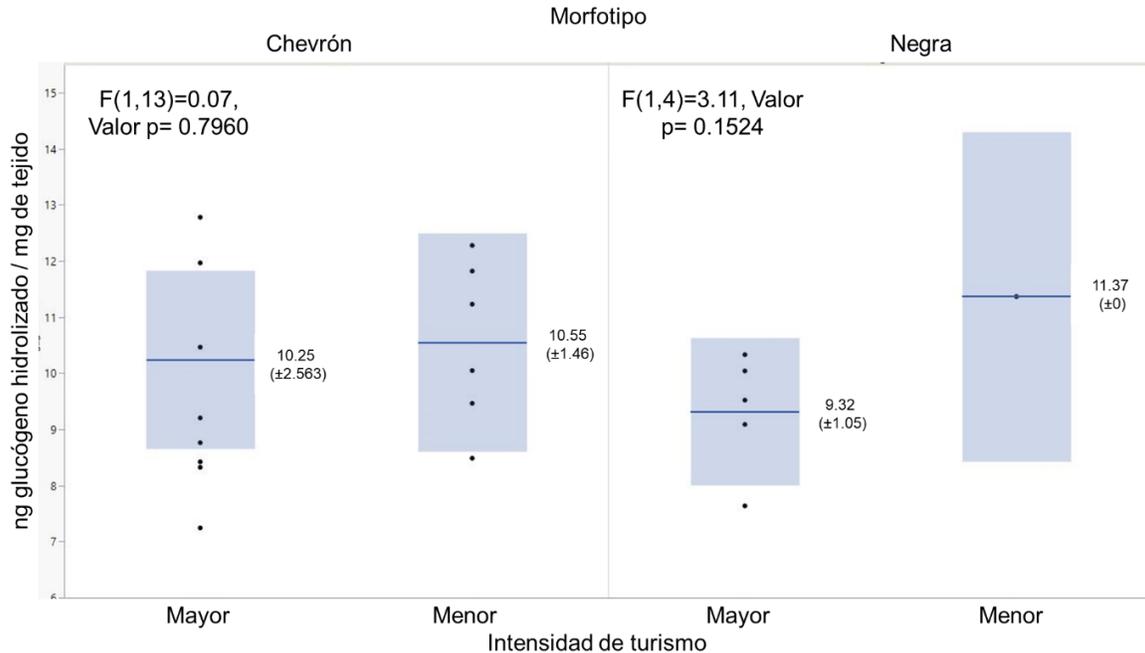


Fig. 22. Nanogramos de glucógeno hidrolizado por miligramo de tejido entre los morfotipos chevrón y negra, y a su vez, entre los diferentes periodos de turismo.

DISCUSIÓN

Toma de biopsia muscular de manta gigante

No existe un protocolo establecido para la toma de biopsia muscular en este tipo de estudios. Como se mencionó en los antecedentes, la mayoría de los análisis de biomarcadores en elasmobranquios se realiza a partir de muestras de sangre (Dowd, Renshaw, Cech, & Kültz, 2010; Manire et al., 2007; Semeniuk et al., 2009). Para el presente proyecto se obtuvieron biopsias musculares, ya que se trabajó con una especie vulnerable (Red List, 2010) y protegida en México (DOF, 2007) en la que se declara prohibida su pesca. Se consideró también la logística y factibilidad para la toma de muestras de sangre, lo cual resulta casi imposible.

En varios proyectos se han utilizado muestras de músculo de organismos muertos (Cicik y Engin, 2005; Vélez-Alavez *et al.*, 2015), los cuales no definen tiempo entre la toma de muestra y el almacenamiento a bajas temperaturas. En este sentido, los metabolitos a estudiar pueden disminuir su actividad y, por lo tanto su concentración si no se realiza en tiempos específicos (5 min) (Botker *et al.*, 1994).

Se realizó la extracción y el almacenamiento de las biopsias en un tiempo menor a 5 min, debido al catabolismo de la catalasa y el glucógeno. Botker (1994) define que, a partir de este tiempo, el glucógeno encontrado en el músculo esquelético disminuye hasta un 42%. Además de lo anterior, los cambios de tiempo y temperatura no superaron lo establecido para el inicio de la actividad metabólica de las moléculas a analizar: catalasa -20°C y glucógeno -4°C (Chemical, 2020).

Por lo tanto, se infiere que los metabolitos analizados en este proyecto se encuentran en las concentraciones más cercanas a las de un organismo vivo. López-Cruz *et al.* (2010) midieron el estrés oxidativo de muestras musculares en *I. oxyrinchus* y *S. zygaena* en donde mencionan la obtención de muestras en organismos muertos. Las muestras se colocaron inmediatamente en hielo para su transporte al laboratorio (en promedio 2.6 h), donde se congelaron y almacenaron a -80 °C hasta la realización de los análisis. Asimismo, realizaron comparaciones con muestras preservadas en nitrógeno líquido, inmediatamente después de la recolección, y almacenadas a -80 °C hasta su análisis, las cuales, no presentaron diferencias significativas entre los metabolitos analizados por estos dos métodos de almacenamiento.

La falta de diferencia significativa de catalasa (CAT) entre los grupos experimentales y los grupos control en los múltiples estudios sobre estrés oxidativo en músculo (López-Cruz *et al.*, 2010; Vélez-Alavez *et al.*, 2013, 2015), puede deberse a que no se menciona el tiempo transcurrido desde que se captura al organismo hasta que se colecta la muestra de músculo en los campos pesqueros o no se toma en cuenta el tiempo de trabajo de la recolección (Semeniuk *et al.* 2009), lo cual, puede influir en el metabolismo de las especies reactivas al oxígeno (ROS). Asimismo, la captura de los organismos influye en el metabolismo de los ROS, ya que el animal entra en un estado de estrés por el esfuerzo físico (Powers & Jackson, 2008) e inicia un proceso de catabolismo fisiológico general, alterando todos los compuestos metabólicos a estudiar (Bouyoucos *et al.*, 2017).

Las muestras una vez almacenadas en el criovial, sin el aditivo de un crioprotector, se introdujeron directamente al nitrógeno líquido en una congelación ultrarrápida, la cual fue descrita para la congelación de embriones por Trouson (1986). Al no emplearse agentes protectores para el tejido se observaron las consecuencias citológicas de la recristalización del agua intracelular, la cual, ocurre a temperaturas tan bajas como -100°C (Lund & Decken,

1980). Considerando que la histología no fue el principal enfoque en este proyecto, el almacenamiento sin agentes protectores del tejido fue favorable, como lo menciona Lund y Decken (1980), quienes evidenciaron que los componentes intracelulares se liberan más fácilmente debido al efecto en cascada de la recristalización del agua intracelular y, por lo tanto, se presenta un aumento de la rotura de la membrana celular, lo que lleva a la liberación de los componentes intracelulares.

Al momento de observar los cortes histológicos se percibió una ruptura de los sarcolemas y se infiere que es debido a que no se utilizó un crioprotector como el glicerol o el DMSO, los cuales evitan la cristalización del agua intracelular y mantienen la morfología celular (Ávila-Portillo et al., 2006; Lund & Decken, 1980) para estudios histológicos con tejidos similares y congelación a tan bajas temperaturas.

Extracción de compuestos celulares en micromuestras

En promedio se obtuvieron muestras pequeñas, de 2.7 ± 1.0 cm con un peso promedio de 586.5 ± 90.46 mg de tejido muscular en las que se emplearon kits comerciales (Cayman Chemical®) en donde establece en los instructivos utilizar por metabolito, de 400 mg hasta 1 gramo de tejido. Debido a esta problemática, se tuvo que modificar la extracción de los compuestos celulares ya establecida en los instructivos y adaptar una para que las lecturas de las muestras, por más pequeñas que fueran, se encontraran dentro de la curva estándar detectable.

El tejido muscular de las mantas se sumergió en tampón de buffer, el cual no contenía ningún agente ácido o corrosivo, la única sustancia que promovía la ruptura de la membrana celular fue un detergente al 10%. Belgrader y Yuan (2009) sugieren el empleo del uso de un tampón hipotónico que provoca la entrada de agua a la célula alterando la osmolaridad y, por lo tanto, revienta fácilmente bajo cizallamiento físico.

La forma de extracción de la catalasa y del glucógeno, comúnmente se realiza por medio de reactivos químicos ácidos y corrosivos, tales como ácido nítrico (HNO_3) (Vélez-Alavez et al., 2013), cloruro de potasio (KCl) (López-Cruz *et al.*, 2010), hidróxido de potasio (KOH) (Cicik & Engin, 2005), ácido perclórico (HClO_4) (Lowe *et al.*, 2002), entre otros. En los instructivos de los kits existen especificaciones sobre que reactivos se pueden utilizar y

cuales pueden ocasionar una interferencia con los metabolitos y alterar los resultados. Los análisis de glucógeno se leyeron en analizadores automatizados A15 de Biosystems®. La razón de evitar reactivos ácidos y corrosivos es no dañar el analizador automatizado ya que son muy vulnerables a estos químicos. Otra de las ventajas de estos aparatos, es una lectura de espectrofotometría de hasta 3 μ L, lo cual fue conveniente por el tamaño de muestra con el que se trabajó.

Para el proceso de extracción se realizó un método físico, el cual no altera los compuestos intracelulares. La sonicación, como lo menciona Belgrader y Yuan (2009), utiliza pulsos de ondas sonoras de alta frecuencia para agitar y lisar células y tejido finamente cortado. Colin *et al.* (2004) mencionan que, para obtener mejores resultados, es necesario realizar dos lisados: el primero de la muestra para la lisis del tejido y el segundo del tipo celular una vez aislado. En el caso de este estudio, se realizó un solo lisado, ya que todo el tejido de trabajo fue tejido muscular estriado bien identificado. Como método de comprobación de la ruptura celular total del tejido, se realizaron frotis de los precipitados de la criocentrifugación, en donde no se observan células completas, y por lo tanto se infiere que todo el contenido celular fue expresado en el sobrenadante.

Estrés oxidativo

Se registró una diferencia mayor ($p = 0.0025$) de catalasa obtenida durante el periodo de menor turismo, lo que infiere un aumento del estrés oxidativo en el tejido muscular de las mantas gigantes.

Esto puede conducir a un envejecimiento celular prematuro y a una vida útil más corta (Semeniuk *et al.*, 2009). Las unidades de catalasa de este proyecto representan una respuesta al estrés agudo, debido al tiempo de acción de este antioxidante de 1 a 5 horas con el pico más alto en los 5 a 10 minutos (Abucayon *et al.*, 2014).

Contrario a los resultados obtenidos en este trabajo, Semeniuk *et al.* (2009) demostró que en los sitios más concurridos por turistas en las Islas Caimán, las rayas sureñas (*Dasyatis americana*) presentan una disminución de la capacidad antioxidante total (TAC) y un aumento del estado oxidativo total (TOS), en comparación con los sitios no turísticos que presentaron un menor número de parásitos y tuvieron el TAC más alto, demostrando una

mejor respuesta hacia los ROS. Esta diferencia entre la presentación de mayor capacidad antioxidante entre Semeniuk *et al.* (2009) con los resultados de CAT presente en las mantas gigantes, puede deberse a que en las Islas Caimán el turismo es continuo y los turistas ofrecen alimento a las rayas. La respuesta de los organismos al estrés varía con respecto al alimento ya que éste promueve el sistema inmune y antioxidante (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). De igual forma, en las rayas sureñas, el hecho de no tener periodos de reposo del turismo puede ser un factor que marque una diferencia en la respuesta al estrés oxidativo en comparación con las mantas gigantes del Parque Nacional de Revillagigedo, el cual, cuentan hasta con cuatro meses de reposo por presencia de huracanes.

Los resultados obtenidos de estrés oxidativo en este proyecto sugieren que los organismos presentan la respuesta descrita por Hans Selye (1946), llamada Síndrome General de Adaptación (SGA), el cual, se basa en la suma de todas las reacciones sistémicas no específicas del cuerpo que resultan de una exposición a un agente estresante.

Es una respuesta fisiológica que se produce ante estímulos estresantes y que ayuda al organismo a adaptarse para pelear o huir (Selye, 1952). La ausencia o el exceso de estrés son dañinos para el organismo; mientras que la cantidad óptima de estrés es esencial para la vida, el crecimiento y la supervivencia (Selye, 1952).

Este síndrome se divide en tres etapas (Johnson *et al.*, 1992; Selye, 1946):

1. La reacción de alarma es la suma de todos los fenómenos sistémicos inespecíficos provocados por la exposición repentina a estímulos a los que el organismo no está adaptado cuantitativa o cualitativamente; es un estado general de catabolismo. En el caso de las mantas gigantes, el estado de alarma se presenta después del lapso de cuatro meses sin turismo, en el momento que inician las inmersiones durante el periodo con menor turismo, en donde se encontraron mayores cantidades de CAT (Fig. 23).
2. La etapa de resistencia representa la suma de todas las reacciones sistémicas inespecíficas provocadas por la exposición prolongada a estímulos a los que el organismo se ha adaptado como resultado de la exposición continua. Se caracteriza por una mayor resistencia al agente particular al que está expuesto el cuerpo y una menor resistencia a otros tipos de estrés. Esta etapa se presenta cuando hay un

aumento de buzos y se infiere que las mantas gigantes están respondiendo eficazmente al agente estresor (buzos), disminuyendo los niveles de CAT por acostumbamiento (Fig. 23).

3. Por último, la etapa de agotamiento representa la suma de todas las reacciones sistémicas inespecíficas (ej. Shock, inflamación, anoxia), que finalmente se desarrollan como resultado de una exposición prolongada a los estímulos a los que se había desarrollado la adaptación, pero que ya no pueden mantenerse y por consecuencia, el organismo perece. No hay registros de esta etapa en las mantas gigantes en el Parque Nacional de Revillagigedo.

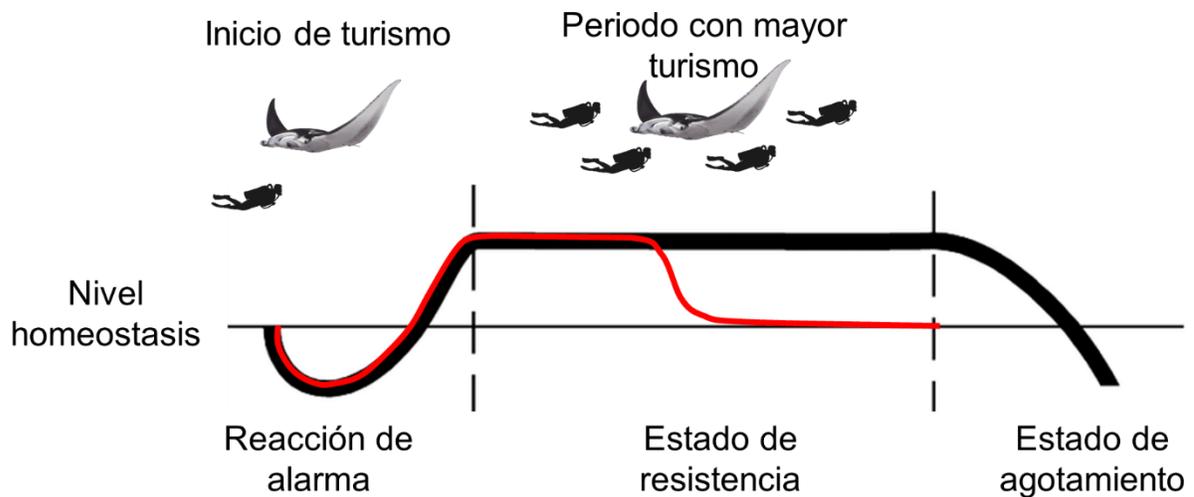


Fig. 23. Fases del Síndrome General de Adaptación, aplicado a los resultados obtenidos con la respuesta al estrés oxidativo muscular de las mantas gigantes con respecto a los periodos con diferente intensidad de turismo. La línea media delgada representa el nivel de homeostasis, la línea gruesa negra representa los cambios fisiológicos durante un evento completo del SGA y la línea roja sugiere la respuesta fisiológica de la CAT.

Debido a que solo se obtuvieron valores significativos en el estrés oxidativo, se realizó la representación gráfica de acuerdo con el proyecto en tiempo y espacio (Fig. 24). La catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) son las primeras enzimas antioxidantes en responder al estrés oxidativo (Finaud *et al.* 2006). En las mantas gigantes, se infiere que el aumento de CAT puede deberse a una respuesta secundaria al estrés agudo en presencia de un agente estresante en un periodo corto, debido a su tiempo de acción de 5 a 10 min (Abucayon *et al.*, 2014). Al aumentar el factor estresante, fisiológicamente, las mantas gigantes sobrecompensan los niveles homeostáticos entrando a la etapa de resistencia, la

cual, con el tiempo, vuelve a los estados homeostáticos normales y se ve reflejada por acostumbramiento a los buzos, disminuyendo la producción de ROS, y por lo tanto de CAT.

La diferencia entre los periodos con distinta intensidad de turismo puede deberse a una respuesta efectiva de las células musculares al estrés oxidativo (Vélez-Alavez et al., 2015), pudiendo afectar o no al organismo (Semenuk et al., 2009). Incluso se sugiere que la diferencia de niveles obtenidos pudieran estar dentro de la curva de tolerancia del organismo (Sheth & Angert, 2014).

Asimismo, la actividad CAT es baja en el músculo de diferentes especies de peces (Vélez-Alavez et al., 2015). Filho *et al.* (1993) encontraron una alta actividad de SOD y CAT en el hígado de los tiburones en comparación con las rayas, lo que sugiere que una mayor actividad de los tiburones refleja un mayor consumo de O₂ y hábitos de natación más activos en comparación con las rayas. Debido a la diferencia de tejidos analizados, no es posible comparar los resultados obtenidos con los valores establecidos por Filho *et al.* (1993), y así, poder determinar si las mantas gigantes presentan valores de CAT más cercanos a los tiburones o a las rayas.

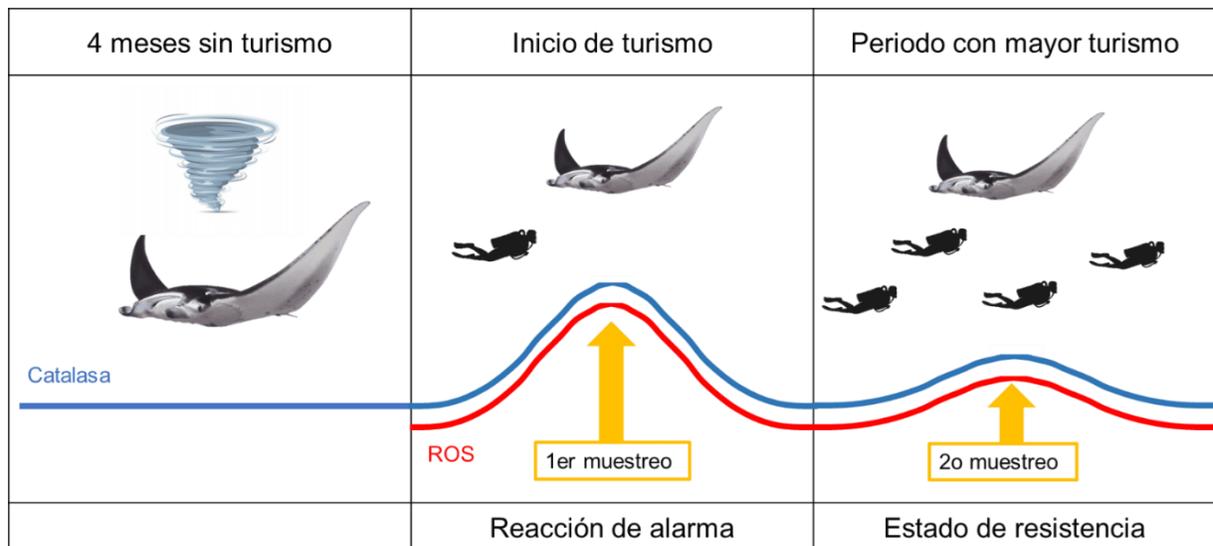


Fig. 24. En el primer recuadro se muestra la temporada baja del Parque Nacional de Revillagigedo en donde existe la presencia de huracanes y las mantas gigantes no tienen contacto con los turistas. El segundo recuadro representa el inicio de turismo (noviembre) en donde aumenta la presencia de buzos y las mantas gigantes presentan un aumento de catalasa como respuesta al estrés oxidativo. En el tercer recuadro, el periodo con mayor turismo las mantas entran en un proceso de acostumbramiento a los buzos disminuyendo sus niveles de CAT muscular.

Sexo: machos y hembras

Se presentó una diferencia significativa entre las unidades de CAT en músculo de los machos en los diferentes periodos de turismo (p valor = 0.0005). Cuando se presentó menor turismo, los niveles de catalasa fueron mayores, por lo tanto, es posible la presencia de una respuesta al estrés agudo en los machos. Esta respuesta puede atribuirse a dos variables: la primera, se debe al pequeño tamaño de muestra de los machos muestreados en el periodo con menor turismo el cual es muy bajo (2) y estos valores crean un sesgo. Se recomienda obtener un número mayor de muestras. La segunda variable sugiere que el apareamiento de las mantas gigantes del Parque Nacional de Revillagigedo se lleva a cabo en los meses de noviembre-diciembre (segundo muestreo), ya que se observaron en cortejo en los meses de octubre (obs. Pers. Mauricio Hoyos), pudiendo resultar en una actividad estresante para los machos como estrés por reproducción (Chand & Lovejoy, 2011; Milla, Wang, Mandiki, & Kestemont, 2009; Schreck, 2010) y ejercicio físico (Bouyoucos et al., 2017; Finaud et al., 2006; Hassan Hassanein, 2010; H. Marshall et al., 2012; Nielsen, Krogh, Savard, & Hargreaves, 2018), así como lo demostró Manire *et al.* (2007) en donde encontraron un aumento en los corticosteroides séricos en los tiburones martillo cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) machos debido a eventos reproductivos.

Tallas: maduros e inmaduros.

Igualmente, se realizó la diferenciación entre las tallas de los organismos en los dos periodos de turismo, en los cuales no se presentó una correlación entre las tallas y las unidades de catalasa presentes en el músculo de las mantas gigantes. La talla de madurez sexual de las mantas gigantes fue establecida por Marshall (2008) de 4.5 metros en promedio para la especie. En este sentido se esperaba encontrar alguna diferencia entre adultos y juveniles sobre las unidades de catalasa como respuesta al turismo. Sin embargo, así como en este trabajo, Semeniuk *et al.* (2009) no encontraron diferencias estadísticas de los antioxidantes y el estado oxidativo en sangre de las rayas sureñas (*Dasyatis americana*) entre los diferentes estadios en la presencia del turismo, reflejando que la respuesta antioxidante no está relacionada con el estadio de los organismos.

Morfotipos: chevrón y negro

Con respecto a la morfología de la especie, no existe evidencia sobre diferencias fisiológicas antioxidantes entre morfotipos de peces o elasmobranquios por lo que las

diferencias encontradas en este proyecto son una línea base para futuros estudios fisiológicos. En este estudio se presentó una diferencia estadística (p valor = 0.0313) entre los morfotipos chevrón y negra de las mantas gigantes presentes en el Archipiélago de Revillagigedo. Al mismo tiempo se encontraron diferencias estadísticas de los morfotipos entre los periodos de turismo. Durante el periodo con mayor turismo se presentaron menores unidades de catalasa en ambos morfotipos. Hasta el momento no existen estudios que mencionen si existen diferencias fisiológicas entre los morfotipos de las mantas gigantes.

Glucógeno

Con respecto a esta variable no se presentó diferencia estadística entre los dos periodos de turismo. A pesar de que en el periodo con mayor turismo se registró una disminución en comparación con menor turismo no fue significativamente representativo. No existen estudios en condriictios sobre la concentración de glucógeno muscular.

En los elasmobranquios el principal almacén de glucógeno es el hígado (Ballantyne, 1997). En caso de un requerimiento energético, el glucógeno hidrolizado libera glucosa para todo el organismo y el glucógeno muscular solo tiene la función de energía para el mismo tejido ya que carece de la enzima glucosa-6-fosfatasa (Bashamohideen & Parvatheswararao, 1972).

El estudio del glucógeno muscular, en este proyecto, representa el estrés crónico, el cual, se ve reflejado con el aumento del nado del organismo y la hidrólisis del glucógeno a glucosa como requerimiento energético. Este tipo de estrés se conoce principalmente como “ejercicio por estrés” (Bashamohideen & Parvatheswararao, 1972; D. Black & Malcolm Love, 1988; E. Black et al., 1960; Driedzic & Hochachka, 1976; Jentjens, Wagenmakers, Jeukendrup, Roy, & Wagenmakers, 2002; Nielsen et al., 2018) y es normalmente observado en la captura de peces. Todos los músculos están expuestos a las hormonas circulantes, y por lo tanto, existe una respuesta glucogenolítica general en toda la musculatura esquelética (Lacourt, 1985).

Existen diferentes trabajos que reportan el descenso del glucógeno muscular por estrés en un 29.05% en carpas (Cicik & Engin, 2005) y hasta en un 53% en mamíferos (Lacourt, 1985). Cabe mencionar que los mamíferos presentan más concentración de glucógeno que

los peces (E. Black et al., 1960). A pesar de la diferencia en la concentración, los valores se encontraban dentro de la curva estándar de detección de la prueba y, por lo tanto, se obtuvieron valores positivos en las muestras musculares de glucógeno hidrolizado, sin embargo, estas no presentaron diferencia significativa entre los periodos de turismo.

El glucógeno muscular puede ser un polisacárido no representativo para evaluar el estrés crónico en las mantas gigantes y puede verse sustituido por el glucógeno hepático.

Autores como Radhaiah (1990) y Cicik (2005) trabajaron con ambientes controlados con peces, donde añadieron sustancias tóxicas con el fin de provocar una respuesta de estrés en los organismos, resultando en diferencias significativas entre sus grupos de trabajo con respecto al glucógeno muscular.

Sexo, tallas y morfotipo

No se presentaron diferencias estadísticas del glucógeno hidrolizado entre los sexos, las tallas ni el morfotipo, por lo que podría ser un polisacárido de poca actividad en la musculatura de las mantas gigantes.

Existe evidencia de que los cambios osmóticos están relacionados con el desgaste energético muscular del glucógeno. Con el aumento de edad de los organismos disminuye la tasa metabólica, entre estos compuestos se encuentra la enzima glucosa-6-fosfatasa, encargada de hidrolizar el glucógeno (Bashamohideen & Parvatheswararao, 1972), pero a pesar este factor, no se presentaron diferencias de este polisacárido entre las tallas de las mantas gigantes. Es importante mencionar que a medida que el organismo se adapta con el tiempo, el glucógeno puede volver al nivel de control, aunque el factor estresante aún esté presente (Marshall, 1990).

Es necesario aumentar el tamaño de muestra y periodicidad del muestreo, debido a que Black y Malcolm (1988) sugieren que la actividad de natación general varía de un mes a otro en relación a los cambios en las corrientes y esto puede ser un punto clave en los cambios periódicos del glucógeno.

Estrés: multifactorial

A pesar del aumento del turismo en el Parque Nacional de Revillagigedo, el estrés en los organismos puede ser multifactorial (Selye, 1946) y tener otro origen en las mantas gigantes.

Existen diferentes factores (intrínsecos y externos) que podrían ser los causantes de estas diferencias antioxidantes y falta de diferencias de reserva energética que pueden afectar la respuesta de las mantas gigantes. Los principales a considerar en este proyecto son:

➤ Filogenia

Rudneva (1997), menciona que se presenta una falta de actividad CAT y poca actividad SOD en los eritrocitos del cazón *Squalus acanthias*, un elasmobranquio primitivo del Mar Negro, lo que sugiere que este pez tiene un sistema antioxidante primitivo. Este autor informó que los niveles altos de urea, glutatión y vitamina K que se encuentran en este elasmobranquio podrían compensar el limitado sistema antioxidante enzimático. Las enzimas antioxidantes pueden correlacionarse con la posición filogenética, con una biota más ancestral que exhibe menos actividad (Rudneva, 1997). Otros estudios comparativos han mostrado que las actividades de CAT y SOD en peces son menores que en mamíferos y aves (Finaud *et al.*, 2006).

Semeniuk *et al.* (2009) midieron antioxidantes sanguíneos en rayas sureñas (*Dasyatis americana*) de moléculas pequeñas como ácido ascórbico, ácido úrico, glutatión y polifenol, definiendo que las células en muchos vertebrados conllevan el estrés oxidativo mediante el uso de enzimas tales como SOD y CAT. Sin embargo, los elasmobranquios tienen un sistema antioxidante enzimático limitado en sus sueros, y compensan esta deficiencia al depender de antioxidantes moleculares pequeños, como la vitamina K, la urea y el glutatión (Vélez-Alavez *et al.*, 2015). Será imperante, en futuros estudios, revisar estos antioxidantes de bajo peso molecular para conocer el papel que desempeñan en las mantas gigantes como respuesta al estrés oxidativo.

➤ Alimento

Un factor que depende completamente de la respuesta fisiológica de cualquier organismo es la alimentación y nutrición. Martínez-Álvarez *et al.* (2005) mencionan que las defensas

antioxidantes de los peces también dependen del comportamiento alimentario y de los factores nutricionales. También mencionan que las especies carnívoras, en comparación con las herbívoras, cuentan con una actividad de glutatión peroxidasa (GPx) muy baja en las mitocondrias del hígado, la actividad CAT más alta en el hígado y riñón y la actividad SOD más alta en el hígado. Con base en lo anterior, los niveles de CAT altos (2819.67 ± 1015.03 unidades CAT/mg de tejido) obtenidos en las mantas gigantes pueden deberse a una respuesta positiva proveniente de una dieta nutritiva (Burgess et al., 2016; Hinojosa-Álvarez, 2009).

Reid *et al.* (1998) mencionan que, durante la privación de alimentos a largo plazo, los peces se vuelven hipometabólicos y, por lo tanto, es concebible que, los peces desensibilicen el proceso de liberación de catecolaminas, lo cual reduce su respuesta ante estados de estrés como huida o pelea.

De igual forma, el glucógeno está altamente relacionado con la nutrición, ya que es una molécula de reserva energética, y se debe consumir una dieta alta en lípidos para poder obtener los requerimientos energéticos para la formación de glucógeno muscular (Barcellos, Marqueze, Trapp, Quevedo, & Ferreira, 2010). Para determinar que la dieta no tuvo relación con el glucógeno obtenido, no se presentaron diferencias estadísticas entre los periodos de turismo del grosor de la capa hipodérmica de las biopsias (ANEXO III).

Esta capa disminuye como reserva energética en periodos de inanición (Barcellos et al., 2010), la cual actúa como segunda reserva de almacén energético como compensación de baja de nutrientes (Driedzic & Hochachka, 1976). Esto indica que la falta de diferencia entre los periodos de turismo del glucógeno hidrolizado no está relacionada con la alimentación de las mantas gigantes. En caso de una alimentación poco nutritiva, tampoco se hubiera mostrado una diferencia en la respuesta al estrés oxidativo, debido a una deficiencia en la respuesta de las catecolaminas, las cuales, conllevan a la activación de los antioxidantes y la glucogenólisis (deRoos & deRoos, 1972; Powers & Jackson, 2008). Si la nutrición es adecuada se llevará a cabo una alostasis idónea para compensar la respuesta a los agentes estresantes y se regresará a la homeostasis en el menor tiempo (Lowe *et al.*, 2002; González de Rivera, 2008)

El glucógeno muscular es solo una pequeña contribución potencial al gasto energético total y, dado que su participación es inmediata, la hidrólisis del glucógeno probablemente está relacionada con un aumento de la actividad muscular (Barcellos et al., 2010); sin embargo, a falta de la diferencia estadística (p valor = 0.1230) de glucógeno hidrolizado, parece no haber una actividad muscular que llegue al punto de un desgaste crónico o este puede estar compensado con una buena alimentación.

➤ Ambiente

Al margen del factor antropogénico (turismo), existen factores ambientales biológicos, físicos y químicos que pueden causar estrés en los organismos. Los efectos sistémicos, causados por la exposición a una variedad de estímulos ambientales como: shock traumático, shock de parto, ejercicio muscular, enfermedades infecciosas, hemorragia, shock nervioso, exposición a cambios de temperatura drásticos, reducción de oxígeno disuelto, toxinas, exposición alta a rayos solares, entre otros, pueden provocar respuestas al estrés (Selye, 1946).

El estrés ambiental, por cualquiera que sea la causa, provoca que los organismos aumenten la fuerza y velocidad de nado. El ejercicio vigoroso puede producir lesión tisular, seguida de una respuesta inflamatoria que a menudo coincide con un aumento de las actividades de GPx y CAT (López-Cruz *et al.*, 2010). Este factor pudo haberse presentado en coincidencia con el periodo de menor turismo, aumentando los niveles de antioxidantes como respuesta al estrés oxidativo muscular por ejercicio. El sistema de defensa alterado de las mantas gigantes puede aumentar su susceptibilidad a los impactos que surgen de las condiciones ambientales cambiantes (Semeniuk et al., 2009).

Todos estos factores individuales o en combinación, pueden afectar el bienestar de los organismos y alterarlos hasta alcanzar un estado de estrés, las causas son difíciles de cuantificar, tipificar y por lo tanto controlar (Odeón & Romera, 2017).

CONCLUSIONES

General

Las mantas presentaron un aumento de estrés oxidativo en el periodo con menor turismo, y viceversa en el periodo con mayor turismo. Sugiere que al inicio de la temporada de buceo existe una respuesta de estrés hacia los primeros buzos, pero se acostumbran con el tiempo a pesar de que estos aumentan de número.

Toma de biopsia muscular de manta gigante y extracción de compuestos celulares en micromuestras

El procedimiento establecido para la toma de muestras en este proyecto resultó apto para los metabolitos analizados y el almacén en nitrógeno líquido resultó ser el mejor criopreservador para la lectura y análisis de la catalasa y el glucógeno, debido a la fisiología de estos metabolitos y del tejido. No se requirieron criopreservadores para la muestra, ya que la cristalización celular promueve la liberación de compuestos intracelulares. El procedimiento establecido para la extracción de los compuestos resultó apto para el tamaño de muestra y para los analizadores automatizados empleados.

Estrés oxidativo y glucógeno

Las mantas gigantes presentaron una mayor actividad de CAT en el periodo con menor turismo en comparación con el periodo de mayor turismo, lo que sugiere un aumento en el estrés oxidativo. De modo particular, los machos, en comparación con las hembras, presentaron una mayor actividad de CAT en el periodo con menor turismo, el cual podría tener relación con el periodo de reproducción de estos organismos, pudiendo ser una respuesta cruzada al turismo o enmascarada por la reproducción. En este estudio se registró la primera diferencia fisiológica de las mantas gigantes al estrés oxidativo con relación al morfotipo, presentando mayores niveles de unidades de catalasa en las de chevrón con respecto al morfotipo negro, desconociendo la causa de esta diferencia.

El glucógeno en las mantas gigantes resultó no ser un metabolito eficaz para inferir el estado de estrés crónico de los organismos con un agente estresor como el turismo. No se encontraron diferencias entre sexos, tallas ni morfotipos.

Recomendaciones

Se recomienda el muestreo de más organismos con una periodicidad mayor para soportar los resultados obtenidos en este proyecto y tener un mejor enfoque de las mantas gigantes al estrés con respecto al turismo o el agente causal de estas variables fisiológicas en el Parque Nacional de Revillagigedo.

Se recomienda evaluar otras variables o complementar con otros metabolitos que responden al estrés para obtener un panorama más completo de lo que ocurre fisiológicamente en las mantas gigantes y como están respondiendo a los agentes externos.

Bibliografía:

1. Abucayon, E., Ke, N., Cornut, R., Patelunas, A., Miller, D., Nishiguchi, M. K., & Zoski, C. G. (2014). Investigating catalase activity through hydrogen peroxide decomposition by bacteria biofilms in real time using scanning electrochemical microscopy. *Analytical Chemistry*, 86(1), 498–505.
2. Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación - Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300.
3. Ballantyne, J. S. (1997). Jaws: The inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. En *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 118).
4. Barcellos, L. J. G., Marqueze, A., Trapp, M., Quevedo, R. M., & Ferreira, D. (2010). The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 300(1–4), 231–236.
5. Bashamohideen, M., & Parvatheswararao, V. (1972). Adaptations to Osmotic Stress in the Fresh-water Euryhaline Teleost *Tilapia mossambica* . IV . Changes in Blood Glucose , Liver Glycogen and Muscle Glycogen Levels. *Marine Biology*, 74(Departamento de Zoología), 68–74.
6. Becerril-García, E. E., Hoyos-Padilla, E. M., Henning, B., & Salinas-De León, P. (2020). Sharks, rays, and chimaeras of the Revillagigedo National Park: An update of new and confirmed records. *Journal of Fish Biology*.
7. Beitinger, T. L., & McCauley, R. W. (1990). Whole-Animal Physiological Processes for the Assessment of Stress in Fishes. *Journal of Great Lakes Research*, 16(4), 542–575.
8. Belgrader, P., & Yuan, B. (2009). *Sonication to selectively lyse different cell types*.
9. Black, D., & Malcolm Love, R. (1988). Estimating the carbohydrate reserves in fish. *Journal of Fish Biology*, 32(3), 335–340.
10. Black, E., Robertson, A., Hanslip, A., & Chiu, W.-G. (1960). Alterations in glycogen, glucose and lactate in rainbow and kamloops trout, *Salmo gairdneri*, following muscular activity. *Fish Res*, 17(4).
11. Botker, H. E., Helligso, P., Kimose, H. H., & Thomassen, A. R. (1994). *technique and delayed freezing*. 524–527.
12. Bouyoucos, I. A., Suski, C. D., Mandelman, J. W., & Brooks, E. J. (2017). The energetic, physiological, and behavioral response of lemon sharks (*Negaprion brevirostris*) to simulated longline capture.

- Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 207, 65–72.
13. Brinn, R. P., Marcon, J. L., McComb, D. M., Gomes, L. C., Abreu, J. S., & Baldisseroto, B. (2012). Stress responses of the endemic freshwater cururu stingray (*Potamotrygon cf. hystrix*) during transportation in the Amazon region of the Rio Negro. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 162(2), 139–145.
 14. Broom, D. M. (2004). Bienestar animal. *Etología aplicada*, 51–87.
 15. Burgess, K. B., Couturier, L. I. E., Marshall, A. D., Richardson, A. J., Weeks, S. J., & Bennett, M. B. (2016). Manta birostris, predator of the deep? Insight into the diet of the giant manta ray through stable isotope analysis. *Royal Society Open Science*, 3(11).
 16. 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. *Libro Jubilar*, (July), 153–170.
 17. Chand, D., & Lovejoy, D. A. (2011). Stress and reproduction: Controversies and challenges. *General and Comparative Endocrinology*, 171(3), 253–257.
 18. Chemical, C. (2020). *Catalase Assay Kit*.
 19. Cıcık, B., & Engin, K. (2005). The Effects of Cadmium on Levels of Glucose in Serum and Glycogen Reserves in the Liver and Muscle Tissues of *Cyprinus carpio* (L ., 1758). *Veterinary Animal Science*, 29, 113–117.
 20. Cliff, G., & Thurman, G. D. (1984). Pathological and physiological effects of stress during capture and transport in the juvenile dusky shark, *Carcharhinus obscurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 78(1), 167–173.
 21. Colin, B., Cleuziat, P., Broyer, P., Mabilat, C., & Incardona, S. (2004). Method and apparatus for ultrasonic lysis of biological cells.
 22. CONANP. (2017). Programa de manejo: Parque Nacional Revillagigedo. En *Programa de manejo*.
 23. deRoos, R., & deRoos, C. C. (1972). Comparative effects of the pituitary-adrenocortical axis and catecholamines on carbohydrate metabolism in elasmobranch fish. *General and Comparative Endocrinology*, 3(SUPPL.), 192–197.
 24. Dowd, W. W., Renshaw, G. M. C., Cech, J. J., & Kültz, D. (2010). Compensatory proteome adjustments imply tissue-specific structural and metabolic reorganization following episodic hypoxia or anoxia in the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*). *Physiological Genomics*, 42(1), 93–114.
 25. Driedzic, W. R., & Hochachka, P. W. (1976). Control of energy metabolism in fish white muscle. *American Journal of Physiology*, 230(3), 579–582.
 26. Evans, A. N., Rimoldi, J. M., Gadepalli, R. S. V., & Nunez, B. S. (2010). Adaptation of a corticosterone ELISA to demonstrate sequence-specific effects of angiotensin II peptides and C-type natriuretic peptide on 1 α -hydroxycorticosterone synthesis and steroidogenic mRNAs in the elasmobranch interrenal gland. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120(4–5), 149–154.
 27. Filho, D. W., & Bovers, A. (1993). Antioxidant Defences in Marine. *Comparative Biochem. Physiol.*, 106C(2), 415–418.
 28. Filho, Danilo Wilhelm, Giulivi, C., & Boveris, A. (1993). Antioxidant defences in marine fish-I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative*, 106(2), 409–413.
 29. Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress. Relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36(4), 327–358.
 30. Frick, L. H., Reina, R. D., & Walker, T. I. (2010). Stress related physiological changes and post-release

- survival of Port Jackson sharks (*Heterodontus portusjacksoni*) and gummy sharks (*Mustelus antarcticus*) following gill-net and longline capture in captivity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 385(1–2), 29–37.
31. González de Rivera, J. L. (2008). HOMEOSTASIS, ALOSTASIS Y ADAPTACION. En *Crisis y Contención* (pp. 31–37).
 32. Hammerschlag, N., Gallagher, A. J., Wester, J., Luo, J., & Ault, J. S. (2012). Don't bite the hand that feeds: Assessing ecological impacts of provisioning ecotourism on an apex marine predator. *Functional Ecology*, 26(3), 567–576.
 33. Hassan Hassanein, L. (2010). The physiological and physical response to capture stress in sharks. *The Plymouth Student Scientist*, 4(41), 413–422.
 34. Hight, B. V., Holts, D., Graham, J. B., Kennedy, B. P., Taylor, V., Sepulveda, C. A., ... Lai, N. C. (2007). Plasma catecholamine levels as indicators of the post-release survivorship of juvenile pelagic sharks caught on experimental drift longlines in the Southern California Bight. *Marine and Freshwater Research*, 58(1), 145–151.
 35. Hinojosa-Álvarez, S. A. (2009). *Ecología trófica de la Manta gigante (Manta birostris, Dondorf 1798) mediante el análisis de isótopos estables de [delta]15N y [delta]13C en las áreas naturales protegidas de Yum Balam e Isla Contoy, Quintana Roo*. 65.
 36. Hoffmayer, E. R., & Parsons, G. R. (2001). The physiological response to capture and handling stress in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 25(4),
 37. Jaime-rivera, M., & Hoyos-padilla, M. (2013). *Evaluation of biopsy systems for sampling white shark*. 48(Motta 1977), 345–351.
 38. Jentjens, R. O. Y. L. P. G., Wagenmakers, A. J. M., Jeukendrup, A. E., Roy, L. P. G., & Wagenmakers, A. J. M. (2002). Heat stress increases muscle glycogen use but reduces the oxidation of ingested carbohydrates during exercise. *Applied Physiology*, 92, 1562–1572.
 39. Johansson, L. H., & Håkan Borg, L. A. (1988). A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, 174(1), 331–336.
 40. Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). Mechanisms of stress: A dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 16(2), 115–130.
 41. Lacourt, A. (1985). Glycogen Depletion Patterns in Myofibres of Cattle During Stress. *Meat science*, 15.
 42. Lambert, F. N., Treberg, J. R., Anderson, W. G., Brandt, C., & Evans, A. N. (2018). The physiological stress response of the Atlantic stingray (*Hypanus sabinus*) to aerial exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 219–220(August 2017), 38–43.
 43. López-Cruz, R. I., Zenteno-Savín, T., & Galván-Magaña, F. (2010). Superoxide production, oxidative damage and enzymatic antioxidant defenses in shark skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 156(1), 50–56.
 44. Lowe, T. E., Peachey, B. M., & Devine, C. E. (2002). The effect of nutritional supplements on growth rate , stress responsiveness , muscle glycogen and meat tenderness in pastoral lambs. *Meat science*, 62, 391–397.
 45. Lund, B., & Decken, A. von der. (1980). Protein Synthesis in vitro after Cryopreservation of Rat Skeletal

- Muscle. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*, 44(1–5), 255–266.
46. Manire, C. A., Rasmussen, L. E. L., Maruska, K. P., & Tricas, T. C. (2007). Sex, seasonal, and stress-related variations in elasmobranch corticosterone concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(4), 926–935.
 47. Marshall, A. D., & Bennett, M. B. (2010). Reproductive ecology of the reef manta ray *Manta alfredi* in southern Mozambique. *Journal of Fish Biology*, 77(1), 169–190.
 48. Marshall, Andrea Denise. (2008). *Biology and Population Ecology of Manta birostris in Southern Mozambique*.
 49. Marshall, H., Field, L., Afiadata, A., Sepulveda, C., Skomal, G., & Bernal, D. (2012). Hematological indicators of stress in longline-captured sharks. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 162(2), 121–129.
 50. Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1–2), 75–88.
 51. McEwen, B. (1998). Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. *New York Academy Science*, 840, 33–44.
 52. Mcveigh, J. M., & Tarrant, P. V. (1982). BEHAVIORAL STRESS AND SKELETAL MUSCLE GLYCOGEN METABOLISM IN YOUNG BULLS. 54(4), 790–795.
 53. Milla, S., Wang, N., Mandiki, S. N. M., & Kestemont, P. (2009). Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 153(3), 242–251.
 54. Nielsen, B., Krogh, A., Savard, G., & Hargreaves, M. (2018). *Muscle blood flow and muscle metabolism during exercise and heat stress*.
 55. Odeón, M. M., & Romera, S. A. (2017). Estrés en ganado: Causas y consecuencias. *Revista Veterinaria*, 28(1), 69–77.
 56. Pankhurst, N. W. (2011). The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 265–275.
 57. Perkins, G. (2002). Mann–Whitney U Test. *Key Topics in Clinical Research*, 128–132.
 58. Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress : Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. En *Physiology* (Vol. 88, pp. 1243–1276).
 59. Powers, S. K., Kavazis, A. N., Deruisseau, K. C., Scott, K., Kavazis, A. N., & Mecha-, K. C. D. (2005). *Mechanisms of disuse muscle atrophy : role of oxidative stress*. (6).
 60. Preciado-González, P. A. (2018). *Distribución y abundancia de Manta birostris (Walbaum, 1792) en el Archipiélago de Revillagigedo durante el año 2016*.
 61. Radhaiah, V., & Jayantha Rao, K. (1990). Toxicity of the pyrethroid insecticide fenvalerate to a fresh water fish, *Tilapia mossambica* (Peters): Changes in glycogen metabolism of muscle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19(1), 116–121.
 62. Reid, S. G., Bernier, N. J., & Perry, S. F. (1998). The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 120(1), 1–27.
 63. Renshaw, G. M. C., Kutek, A. K., Grant, G. D., & Anoopkumar-Dukie, S. (2012). Forecasting elasmobranch survival following exposure to severe stressors. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 162(2), 101–112.

64. Royston, J. P. (1983). Some Techniques for Assessing Multivariate Normality Based on the Shapiro-Wilk W. *Applied Statistics*, 32(2), 121–133.
65. Rudneva, I. I. (1997). Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 118(2), 255–260.
66. Ruiz, A., Sánchez, C., Stewart, J., & Aburto, O. (2018). Biodiversitas, boletín bimestral de la comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. *Conabio*, núm. 72. mayo-junio.
67. Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 549–556.
68. Selye, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *The Journal of allergy*, 17, 231.
69. Selye, H. (1952). Stress and the general adaptation syndrome. *International Archives of Allergy and Immunology*, 3(4), 267–278.
70. Semeniuk, C. A. D., Bourgeon, S., Smith, S. L., & Rothley, K. D. (2009). Hematological differences between stingrays at tourist and non-visited sites suggest physiological costs of wildlife tourism. *Biological Conservation*, 142(8), 1818–1829.
71. Sheth, S. N., & Angert, A. L. (2014). The evolution of environmental tolerance and range size: A comparison of geographically restricted and widespread *Mimulus*. *Evolution*, 68(10), 2917–2931.
72. Stewart, J. D., Beale, C. S., Fernando, D., Sianipar, A. B., Burton, R. S., Semmens, B. X., & Aburto-Oropeza, O. (2016). Spatial ecology and conservation of *Manta birostris* in the Indo-Pacific. *Biological Conservation*, 200, 178–183.
73. Stewart, J. D., Hoyos-Padilla, E. M., Kumli, K. R., & Rubin, R. D. (2016). Deep-water feeding and behavioral plasticity in *Manta birostris* revealed by archival tags and submersible observations. *Zoology*, 119(5), 406–413.
74. Van Rijn, J. A., & Reina, R. D. (2010). Distribution of leukocytes as indicators of stress in the Australian swellshark, *Cephaloscyllium laticeps*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(3), 534–538.
75. Vélez-Alavez, M., De Anda-Montañez, J. A., Galván-Magaña, F., & Zenteno-Savín, T. (2015). Comparative study of enzymatic antioxidants in muscle of elasmobranch and teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 187, 61–65.
76. Vélez-Alavez, M., Labrada-Martagón, V., Méndez-Rodríguez, L. C., Galván-Magaña, F., & Zenteno-Savín, T. (2013). Oxidative stress indicators and trace element concentrations in tissues of mako shark (*Isurus oxyrinchus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 165(4), 508–514.
77. Wendelaar, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591–625.
78. Yunis, A. (1970). *a Comparative Study of Crystallized Glycogen Silky and Shark Muscle*. 604–608.

Anexos

ANEXO I

Resultados de análisis de catalasa sobre las 21 muestras del tejido muscular de las mantas gigantes. Verde: periodo con mayor intensidad de turismo/ Azul: periodo con menor intensidad de turismo.

| Resultados de catalasa | | | |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| Número de muestra | Peso de la muestra (mg) | Promedio de absorbancias | Unidades de catalasa / mg de tejido |
| 1 | 141.3 | 0.16275 | 1156.7622 |
| 2 | 149.3 | 0.17 | 1143.5479 |
| 3 | 83.4 | 0.13875 | 1670.8298 |
| 4 | 145.2 | 0.132 | 913.0038 |
| 5 | 137.6 | 0.1495 | 1091.1590 |
| 6 | 150 | 0.1585 | 1061.2147 |
| 7 | 143.4 | 0.14775 | 1034.7695 |
| 8 | 155.7 | 0.567 | 3657.2926 |
| 9 | 145.4 | 0.1655 | 1143.1385 |
| 10 | 134.3 | 0.16825 | 1258.1845 |
| 11 | 157.5 | 0.284 | 1810.9358 |
| 12 | 143 | 0.13675 | 960.4097 |
| 13 | 120.4 | 0.14325 | 1194.9051 |
| 14 | 114.3 | 0.143 | 1256.4785 |
| 15 | 92.9 | 0.13425 | 1451.3222 |
| 16 | 133.9 | 0.611 | 4582.7471 |
| 17 | 149.9 | 0.37075 | 2483.9611 |
| 18 | 124.2 | 0.3725 | 3012.1039 |
| 19 | 93.4 | 0.3235 | 3478.5053 |
| 20 | 112.2 | 0.29975 | 2683.0675 |
| 21 | 91.3 | 0.186 | 2046.0085 |

ANEXO II

Resultados de análisis de hidrolisis de glucógeno sobre las 21 muestras del tejido muscular de las mantas gigantes. Verde: periodo con mayor intensidad de turismo/ Azul: periodo con menor intensidad de turismo.

| Resultados de glucógeno | | | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| Número de muestra | Peso de la muestra (mg) | Promedio de absorbancias | ng glucógeno hidrolizado / mg de tejido |
| 1 | 141.3 | 5.35 | 9.0870 |
| 2 | 149.3 | 7.95 | 12.7796 |
| 3 | 83.4 | 5.25 | 15.1079 |
| 4 | 145.2 | 6.25 | 10.3306 |
| 5 | 137.6 | 4.8 | 8.3721 |
| 6 | 150 | 5.95 | 9.5200 |
| 7 | 143.4 | 6 | 10.0418 |
| 8 | 155.7 | 5.4 | 8.3237 |
| 9 | 145.4 | 7.25 | 11.9670 |
| 10 | 134.3 | 5.15 | 9.2033 |
| 11 | 157.5 | 5.75 | 8.7619 |
| 12 | 143 | 4.55 | 7.6364 |
| 13 | 120.4 | 5.25 | 10.4651 |
| 14 | 114.3 | 3.45 | 7.2441 |
| 15 | 92.9 | 4.4 | 11.3671 |
| 16 | 133.9 | 6.85 | 12.2778 |
| 17 | 149.9 | 5.3 | 8.4857 |
| 18 | 124.2 | 5.2 | 10.0483 |
| 19 | 93.4 | 4.6 | 11.8201 |
| 20 | 112.2 | 5.25 | 11.2299 |
| 21 | 91.3 | 3.6 | 9.4633 |

ANEXO III

Tabla en donde se muestran las medidas de los diferentes tejidos que conforman las biopsias obtenidas. Se aplicó el análisis de U de Mann-Whitney para conocer las diferencias

entre los periodos de turismo entre las diferentes capas que conforman la biopsia. No se presentan diferencias significativas estadísticas de ninguna capa entre los diferentes periodos de turismo, principalmente la capa de tejido adiposo que demuestra el desgaste energético de reserva en caso de inanición. Verde: periodo con mayor intensidad de turismo/ Azul: periodo con menor intensidad de turismo.

| Medidas: estratos de biopsia | | | | |
|------------------------------|--------|---------|---------|-------|
| Muestra | Piel | Adiposo | Músculo | Total |
| 1 | 0.1 | 0.3 | 1.6 | 2 |
| 2 | 0 | 0.8 | 2.7 | 3.5 |
| 3 | 0.1 | 0.7 | 3.3 | 4.1 |
| 4 | 0.2 | 0.1 | 1.9 | 2.2 |
| 5 | 0.1 | 0.3 | 1.6 | 2 |
| 6 | 0.1 | 0.8 | 3.3 | 4.2 |
| 7 | 0.1 | 0.7 | 1.7 | 2.5 |
| 8 | 0.1 | 0.5 | 0.9 | 1.5 |
| 9 | 0.1 | 0.3 | 1.2 | 1.6 |
| 10 | 0.1 | 0.6 | 1.8 | 2.5 |
| 11 | 0 | 0.7 | 0.8 | 1.5 |
| 12 | 0.1 | 0.5 | 2.6 | 3.2 |
| 13 | 0 | 0.8 | 1.9 | 2.7 |
| 14 | 0.2 | 0.7 | 3.6 | 4.5 |
| 15 | 0.1 | 0.5 | 1.9 | 2.5 |
| 16 | 0.3 | 1.3 | 0.4 | 2 |
| 17 | 0.2 | 0.4 | 3.9 | 4.5 |
| 18 | 0.1 | 0.6 | 1.6 | 2.3 |
| 19 | 0.1 | 0.9 | 1 | 2 |
| 20 | 0 | 0.5 | 1.5 | 2 |
| 21 | 0 | 0.2 | 3.7 | 3.9 |
| p valor | 0.8258 | 0.5 | 0.3974 | 0.5 |

