

TESIS DEFENDIDA POR
Ricardo Alberto González Sánchez
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Codirector del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Codirector del Comité

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Miembro del Comité

Dr. Zaúl García Esquivel
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias de la Vida

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

10 de Diciembre de 2010.

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN CIENCIAS DE LA VIDA
EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**Fisiología térmica y despliegue diferencial en adultos de
Litopenaeus vannamei sometidos a estrés térmico**

TESIS

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

Presenta:

RICARDO ALBERTO GONZÁLEZ SÁNCHEZ

Ensenada, Baja California, México, Diciembre 2010.

RESUMEN de la tesis de **Ricardo Alberto González Sánchez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Diciembre 2010.

Fisiología térmica y despliegue diferencial en adultos de *Litopenaeus vannamei* sometidos a estrés térmico

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Codirector

Dr. Fernando Díaz Herrera

Codirector

Se evaluó la fisiología térmica de los adultos del camarón blanco, determinando su preferendum final por el método agudo y gravitacional, encontrando valores similares independientemente del método utilizado (26.2-25.61 °C).

Se encontró una relación directa entre la temperatura crítica máxima (TCMax) y las temperaturas de aclimatación ($P < 0.05$). Los valores de TCMax se incrementaron de 36 a 41.5 °C conforme aumento la temperatura de aclimatación de 20 a 32 °C.

La tasa de respuesta de aclimatación (ARR) de los adultos del camarón blanco tuvo un intervalo de 0.36-0.76, lo que correspondió con otras especies de crustáceos que habitan regiones tropicales y subtropicales.

La tasa de consumo de oxígeno aumento significativamente ($P < 0.05$) de 39.6 a 90 mg O₂ kg⁻¹ h⁻¹ peso húmedo, conforme se incrementó la temperatura de aclimatación de 20 a 32 °C. El menor valor de Q₁₀ de 1.60 se obtuvo en el intervalo de temperaturas de 23 a 26 °C, mismo intervalo de temperaturas que correspondió al preferendum térmico.

Al exponer a los adultos del camarón blanco al estrés térmico ascendente, se observó un incremento en la osmolaridad de la hemolinfa de 776 a 809 mmol kg⁻¹ independientemente de la temperatura de aclimatación. También se determinó la modificación de parámetros metabólicos al someter a los camarones al estrés térmico, resaltando un incremento en la cantidad de glucosa en la hemolinfa. Dicho incremento no se observó en los demás metabolitos evaluados en este trabajo (colesterol, acilglicéridos y proteínas totales). Se registró en la hemolinfa de los camarones que se expusieron a la TCMax una disminución en la actividad de la Fenoloxidasas, probablemente por que se modificó la temperatura óptima de la enzima.

Se estandarizó la técnica de Despliegue diferencial para el procesamiento de muestras de hepatopáncreas de camarón, de este modo se pudo evaluar la presencia-ausencia de bandas al comparar organismos control con camarones sometidos a estrés térmico.

Los resultados de este trabajo se discuten en relación al mantenimiento de los reproductores.

Palabras Clave: Temperatura, Estrés, *Litopenaeus vannamei*, Diferencial Display.

ABSTRACT of the thesis presented by **Ricardo Alberto González Sánchez** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México December 2010.

Thermal physiology and differential display in *Litopenaeus vannamei* adults submitted to thermal stress

To evaluate the thermal physiology of adults of the white shrimp, we determine the final preferendum by the acute and gravitational methods we obtained similar values without regard the method used (26.2-25.61 °C).

A direct relation between the critical thermal maxima (CTMax) and the acclimation temperature ($P < 0.05$) were found. The CTMax values increased from 36 to 41.5 °C as the acclimation temperature increased from 20 to 32 °C.

The acclimation ratio response (ARR) of the white shrimp adults had an interval of 0.36-0.76, which corresponds with other crustacean species that inhabit tropical and subtropical regions.

The oxygen consumption rate increased significantly ($P < 0.05$) from 39.6 to 90 mg $O_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of wet weight as the acclimation temperature increased from 20 to 32 °C. The lowest Q_{10} value was 1.60 and it was obtained in the same interval of temperatures that corresponded to the thermal preferendum 23 to 26 °C.

As we exposed the adult white shrimp to an ascending thermal stress, we observed an increment in the haemolymph osmolarity from 776 to 809 mmol kg^{-1} without regard to the acclimation temperature. Also we determine the modification of the metabolites as we exposed the shrimps to thermal stress, highlighting an increase in the haemolymph glucose. Such increment was not noticed in the other metabolites evaluated (cholesterol, acilglycerides and total proteins). A diminution in the phenoloxidase activity was registered in the shrimp submitted to the CTMax; probably cause the enzyme optimal temperature was modified.

A differential display technique (DDRT-PCR) were standardized in order to asses the process of hepatopancreatic tissue of the shrimp, by this means we were able to evaluate the presence-absence of banding patterns between control and heat stressed shrimps.

The results of this work are discussed regarding the maintenance of white shrimp breeders.

Keywords: Temperature, Heat stress, *Litopenaeus vannamei*, Differential Display.

Dedicatorias

A mi **Familia**, que aunque no estén cerca siempre están presentes. Lamento haberme perdido: cumpleaños, festejos, fines de semana, paseos, graduaciones, aniversarios y sobre todo no estar cerca cuando me necesitaban. Pero saben que cuentan conmigo para lo que sea.

A mi **Mimi** por estar aquí conmigo y por TODO lo demás.

Agradecimientos

Quiero agradecer:

Al Conacyt por la beca 48568, ya que sin ella no hubiera sido posible desarrollar este trabajo.

Al CICESE por recibirme en su posgrado e instalaciones durante la realización de esta tesis.

A mis Directores, Fernando y Alexei, ya que sin su paciencia, comprensión y correcciones esta tesis nunca hubiera existido. Muchas gracias por la tesis y sobre todo por ser mis amigos y apoyarme en todo.

A los miembros de mi comité, Eugenio y Zaúl por sus comentarios y apoyo durante la realización del proyecto.

A Dolores, Ivonne, Citlali, Norma y David, por su amabilidad y ayuda para realizar todos los trámites y cualquier otra cosa que se ofrecía.

Gracias a todos por hacer mi estancia mas placentera.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Contenido.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	ix
I. Introducción.....	1
II. Hipótesis.....	10
III. Objetivos.....	11
III.1 Objetivo General.....	11
III.1 Objetivos Particulares.....	11
IV. Materiales y Métodos.....	13
V. Resultados.....	21
VI. Discusión.....	34
VII. Conclusiones.....	44
Referencias.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Temperatura preferida por los adultos de <i>L. vannamei</i> determinada mediante el método agudo.....	21
2	Temperatura preferida por los adultos de <i>L. vannamei</i> determinada mediante el método gravitacional.....	22
3	Consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ p.h.}$) en adultos de <i>L. vannamei</i> aclimatados a las temperaturas de 20, 23, 26, 29 y 32 °C.....	23
4	Temperatura crítica máxima de los adultos del camarón blanco procedentes de cinco temperaturas de aclimatación.....	24
5	Endurecimiento térmico determinado a través de exposiciones sucesivas a la TCMax en los adultos del camarón blanco.....	25
6	Osmolaridad de la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes.....	26
7	Colesterol presente en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes.....	27
8	Acilglicéridos presentes en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes.....	28
9	Proteínas totales presentes en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes.....	29
10	Glucosa presente en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes.....	30
11	Actividad de la fenoloxidasa en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes.....	31
12	Gel de poliacrilamida con expresión diferencial de 2 muestras de hepatopaneas de camarón aclimatado a 26 °C.....	32

LISTA DE FIGURAS (continuación)

13	Gel de poliacrilamida con expresión diferencial de 6 muestras de hepatopáncreas de camarón 3 controles y 3 experimentales aclimatados a 20, 26 y 32 °C.....	33
-----------	---	-----------

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Tasas de consumo de oxígeno de adultos de <i>L. vannamei</i> aclimatados a diferentes temperaturas y sus respectivos valores de Q_{10}	23
II	Temperatura Crítica Máxima y ARR de <i>Litopenaeus vannamei</i> aclimatado a cinco diferentes temperaturas.....	26

I. Introducción

En la naturaleza los organismos acuáticos utilizan su capacidad de adaptación para persistir en un hábitat particular respondiendo a los cambios en el ambiente por medio de ajustes metabólicos o de comportamiento (Pigliucci 1996). Esos ajustes proporcionan a los organismos una plasticidad fisiológica, la que es particularmente importante en los ectotermos que experimentan amplias fluctuaciones de temperatura (Buckley, Owen y Hofmann 2001). Este parámetro modifica la respuesta fisiológica de los organismos acuáticos invertebrados y vertebrados, limita las reacciones bioquímicas, afecta su metabolismo, su distribución e influye directamente en la sobrevivencia y el crecimiento en los diferentes estadios del ciclo de vida (Magnuson, Crowder y Medwick 1979; Reynolds y Casterlin 1979).

Para contrarrestar las variaciones ambientales de temperatura, los organismos acuáticos han desarrollado una respuesta termorreguladora, que consiste en la capacidad del organismo para seleccionar activamente un hábitat con un óptimo térmico y a su vez evitar aquellos que no sean favorables (Prosser y Heath, 1991; Luna-Figueroa, Díaz, Espina 2003; Das, Chakraborty, Manush, Chatterjee y Mukherjee 2004; Re, Díaz y Valdez 2006).

La preferencia térmica de un individuo, es una respuesta especie-específica que puede variar de acuerdo a la edad, el peso, la disponibilidad de alimento, la estación, la calidad del agua, intensidad luminosa o bien por factores denso dependientes como la competencia y la presencia de patógenos (Wedemeyer, Meyer y Smith 1999), incluso a lo largo del día (Diana 1983; Giattina y Garton 1982).

Además, se ha mencionado por Beitinger y Fitzpatrick (1979), McCauley y Casselman (1981) que la temperatura que un organismo prefiere, comúnmente coincide con la temperatura óptima que el organismo requiere para moverse, crecer o reproducirse, ya que le permite maximizar la proporción de energía disponible (Kelsch 1996).

Fry (1947) propone dos métodos para evaluar la temperatura preferida (agudo y gravitacional) utilizando un gradiente de temperatura. Mediante el método agudo, la temperatura preferida se determina durante las 2 primeras horas de inmersión de los organismos en el gradiente a partir de diferentes temperaturas de aclimatación. En el método gravitacional el preferendum final se obtiene hasta que el organismo ha tenido suficiente tiempo para moverse hacia una región de preferencia térmica.

Se han realizado algunos estudios de termorregulación en juveniles de peneidos entre los más relevantes se encuentran los trabajos en *Penaeus duorarum* (Burkenroad) (Reynolds y Casterlin 1979); *Penaeus brasiliensis* (Latreille) (Criales y Chung 1980); *Penaeus monodon* (Fabricius) (Chen y Chen 1999); *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Valdez-Sanchez 2002; Hernandez, Buckle, Palacios y Barón 2006) y *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) (Re, Díaz y Valdez 2006).

La medición de la tasa metabólica ha sido utilizada como una herramienta para determinar el impacto que pueden tener diversos factores ambientales como la temperatura, la salinidad o la exposición a contaminantes, permitiéndonos de este modo determinar los costos energéticos que esas combinaciones le imponen al organismo (Stern, Borut y Cohen 1984; Lemos, Phan y Alvarez 2001; Altinok y Grizzle, 2003; Manush, Pal, Chatterjee, Das y Mukherjee 2004; Brougher, Douglass y Soares 2005). El consumo de oxígeno se encuentra íntimamente

ligado con el trabajo metabólico y el flujo de energía que el organismo puede destinar para los mecanismos de control homeostático (Salvato, Cuomo, Di Muro y Beltramini 2001; Das, Pal, Chakraborty, Manush, Sahu y Mukherjee 2005).

La determinación de la tolerancia térmica de diferentes especies es una práctica común en el campo de la biología térmica. Esto ha sido motivado no solamente por el interés en el conocimiento de la fisiología térmica de los organismos sino también por la necesidad de evaluar los efectos biológicos de diferentes fenómenos térmicos como el cambio climático global y el Niño (Beitinger *et al.*, 2000; Mora y Ospína, 2001).

Los estudios sobre tolerancia térmica se han enfocado principalmente en peces (Brett, 1956; Reynolds y Casterlin, 1979; Beitinger *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2004). No obstante, la importancia de este tipo de estudios ha ocasionado que aumente el interés por realizar investigaciones de este tipo en otros grupos de organismos, como los crustáceos (Payette y McGraw, 2003). Entre los que se encuentran los estudios realizados en: *Penaeus brasiliensis* (Criales y Chung, 1980), en *Orconectes rusticus* y *O. virilis* (Claussen, 1980), *Orconectes rusticus* (Layne *et al.*, 1987), *Procambarus clarkii* (Díaz *et al.*, 1994), *Macrobrachium tenellum* (Hernandez *et al.*, 1996), *Macrobrachium rosenbergii* (Díaz *et al.*, 1998; Manush *et al.*, 2004), *Macrobrachium acanthurus* (Díaz *et al.*, 2002); *Cherax quadricarinatus* (Díaz *et al.*, 2004); *Farfantepenaeus aztecus* (Re *et al.*, 2005), *Litopenaeus stylirostris* (Re *et al.*, 2006); *Penaeus monodon* (de la Vega *et al.*, 2006); *Penaeus semisulcatus* (Kir *et al.*, 2008a, b); *Litopenaeus vannamei* (Kumlu *et al.*, 2010).

La tolerancia térmica en los ectotermos es cuantificada a través de la determinación de la temperatura crítica máxima (TCMax) donde la temperatura es incrementada gradualmente hasta que se alcanza un punto crítico (perdida de

equilibrio, muerte). La TCMax es la temperatura media en la cual todos los organismos alcanzan un punto crítico. Este método es ampliamente utilizado ya que requiere pocos animales, es rápido y sus resultados son comparables a las condiciones naturales (Mora y Ospina, 2001; Mora y Maya, 2006).

La definición de la TCMax fue introducida por Cowles y Bogert (1944), modificada por Lowe y Vance (1955) y estandarizada por Hutchison (1961). Cox (1974) define a la TCMax como: “Una medida de tolerancia en la cual se usa la media aritmética de puntos térmicos colectivos en cuanto la actividad locomotora se desorganiza”. Esto se da cuando el organismo pierde la capacidad de escapar a condiciones que rápidamente lo conducirán a la muerte (White, 1983; Beitinger *et al.*, 2000; Re *et al.*, 2006).

Hutchison (1976) menciona que el conocimiento de la temperatura crítica máxima proporciona un índice relevante a nivel fisiológico y ecológico ya que los organismos acuáticos pueden encontrar tales temperaturas en condiciones naturales. Debido a que la TCMax se puede modificar estacionalmente así como también por la temperatura de aclimatación, esta, resulta útil para la evaluación de los requerimientos térmicos y fisiológicos del organismo en cautiverio; la TCMax es considerada una medida de la tolerancia térmica de los organismos acuáticos, ya que permite identificar la temperatura en la que ocurre la primer señal de estrés (Paladino *et al.*, 1980; Pérez *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2004; Re *et al.*, 2005; Mora y Maya, 2006).

De acuerdo a Claussen (1977), la tasa de respuesta de aclimatación (ARR) es definida como el cambio en la TCMax por cambio en la temperatura de aclimatación, es considerada como una medida para denotar la respuesta fisiológica de organismos acuáticos a un cambio en la temperatura, obteniendo valores menores para especies de climas templados o fríos y valores más

elevados para especies tropicales y subtropicales, esto es debido a que las especies que habitan en zonas frías y templadas, experimentan cambios graduales y fluctuaciones de temperatura a largo plazo permitiéndoles el tiempo necesario para realizar los ajustes metabólicos necesarios, lo que resulta en intervalos de tolerancia menores como es el caso de lo reportado para diferentes especies de crustáceos que habitan en agua fría, McLesse (1956) obtuvo un ARR de 0.24 en postlarvas de langosta *Homarus americanus*. Spoor (1955) y Bowler (1963) obtuvieron valores de ARR entre 0.12 y 0.18 en acociles de la especie *Astacus pallipes*. Claussen (1980) obtuvo un valor de 0.24 en *Orconectes rusticus* y para *O. virilis* un valor de 0.15. Layne *et al.* (1987) reportaron valores de ARR entre 0.23 y 0.25 para *O. rusticus*.

Por el contrario, las especies que habitan en zonas tropicales y subtropicales experimentan mayores fluctuaciones de temperatura en periodos cortos, por lo que, presentan intervalos de tolerancia más amplios, para poder sobrevivir a cambios rápidos en la temperatura del agua, ya que no cuentan con el tiempo suficiente para aclimatarse y ajustar su tolerancia, coincidiendo con lo obtenido por Díaz *et al.* (1994) que reportaron un valor de ARR de 0.33 para el acocil *Procambarus clarkii*, que presenta una distribución en zonas templadas-calientes. Para *Macrobrachium tenellum*, el ARR calculado fue de 0.54 (Hernández *et al.*, 1996). Díaz *et al.* (1998) reportaron valores de ARR entre 0.44 y 0.58 para dos estadios del desarrollo del langostino tropical *M. rosenbergii*. En *M. acanthurus*, un langostino subtropical, los valores de ARR obtenidos por Díaz *et al.* (2002) fueron de 0.33 a 0.52. Para el acocil subtropical *Cherax quadricarinatus* el ARR fue de 0.33 a 0.66 (Díaz *et al.*, 2004). En el camarón café *Farfantepenaeus aztecus*, una especie tropical estuarina, el ARR fue de 0.30 a 0.50 (Re *et al.*, 2005), para el camarón azul *Litopenaeus stylirostris*, Re *et al.* (2006) reportaron un ARR entre 0.45 y 0.50. Para postlarvas y juveniles del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* aclimatado a cuatro temperaturas Kumlu *et al.* (2010) obtuvieron valores de ARR de 0.35 a 0.44.

Lignot *et al.* (1999) mencionan la necesidad en la camaronicultura de desarrollar medidas individuales tanto fisiológicas como bioquímicas para evaluar el estado fisiológico de las poblaciones de camarones y así permitirnos predecir los efectos del estrés y contaminantes sobre los organismos; proponen el uso de la osmolaridad y los niveles de glucosa en la hemolinfa.

La glucosa, el lactato y la capacidad osmorreguladora han sido propuestas como indicadores de estrés para diferentes especies de crustáceos como es el caso de los juveniles de *Litopenaeus vannamei*, donde Mercier *et al.* (2006) evaluaron el estrés por manejo en cultivo en 2 estanques de materiales diferentes (plástico y concreto), encontrando que además de la glucosa y el lactato, también se pueden utilizar las proteínas totales, la hemocianina, el colesterol, lípidos totales y triglicéridos para evaluar la condición fisiológica de los camarones. En estudios previos se ha notado que el metabolismo del organismo se modifica al estar expuesto a condiciones estresantes, por lo cual se ha propuesto el uso de dichas variables metabólicas para la evaluación del proceso de adaptación ante un estresor (Lignot *et al.*, 1999; 2000; Rosas *et al.* 2001; 2002, Sánchez *et al.* 2001 y Pascual *et al.* 2003; 2004) y como indicadoras de estrés en juveniles del camarón blanco (Racotta y Palacios 1998). Palacios (1999) menciona que además pueden ser utilizadas como indicadoras del estado reproductivo y de la calidad de larvas en *L. vannamei*.

Hall y van Ham (1998) mencionan que la concentración de glucosa en la hemolinfa es un método simple y confiable que se puede utilizar como un indicador de estrés en camarones, ya que reportan que varios agentes estresores provocan un aumento significativo en la concentración de glucosa en la hemolinfa de *P. monodon*.

Sánchez *et al.* (2001) evaluaron los niveles de glucosa, lactato, proteínas,

colesterol, triacilglicéridos, la capacidad osmótica, conteo total de hemocitos y la actividad de la fenoloxidasa en la hemolinfa de adultos de *L. setiferus* aclimatados a dos temperaturas y determinaron que pueden ser utilizados como indicadores de estrés.

La fenoloxidasa es la enzima responsable del proceso de melanización que se observa en crustáceos e insectos (Söderhäll y Cerenius, 1992). La actividad de la fenoloxidasa ha sido evaluada en *Farfantepenaeus californiensis*, *Penaeus monodon*, *Farfantepenaeus paulensis*, *L. stylirostris* y *L. vannamei* (Rendón y Balcázar, 2003).

Además de las herramientas antes mencionadas para evaluar la salud de los organismos, también se utilizan herramientas moleculares como es el caso de la expresión diferencial que también ha ayudado a descubrir muchos genes importantes involucrados en infecciones virales, cáncer, ovulación, ritmo circadiano, transcripción, polimorfismo de RNA mensajero y la interacción RNA-proteína. Esta técnica se basa en el aislamiento e identificación de genes expresados diferencialmente, por medio de tres pasos: Primero, la retrotranscripción del RNA mensajero presente en la muestra utilizando oligo dT. Segundo, la selección de oligonucleótidos aleatorios para la amplificación por PCR del cDNA presente en la muestra y por último el uso de geles de secuenciación para el análisis de los fragmentos de PCR (Liang y Pardee, 1992; 2003).

Unajak *et al.* (2006) identificaron la presencia de una secuencia con gran homología a las proteínas argonauta de mamíferos y de *Drosophila melanogaster* en el cDNA de *Penaeus monodon* utilizando la técnica de expresión diferencial.

Montaño-Pérez *et al.* (2005) utilizaron la expresión diferencial en hemocitos de *L. vannamei* retados con *Vibrio alginolyticus* y reportan que son

capaces de responder indicando cierto tipo de especificidad en la respuesta inmune del camarón. Somboonwivat *et al.* (2006) analizaron la expresión diferencial en hemocitos de *Penaeus monodon* infectados con *Vibrio harveyi*, encontrando un incremento en la expresión de 48 bandas y un decremento en la expresión en 31 bandas después del reto con *V. harveyi*.

Chávez-Calvillo *et al.* (2010) evaluaron los cambios en la expresión genética de *L. vannamei* alimentados con 2 tipos de dietas, una con proteína animal y otra con proteína vegetal en 2 tejidos: hepatopáncreas y músculo, reportando diferencias en la expresión de 6 genes del hepatopáncreas y 4 en el músculo.

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone) se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico desde el Golfo de California hasta el norte de Perú, se le puede encontrar hasta una profundidad de 70 metros (Michel, 2002). Es una de las especies de peneidos más estudiadas; ya que es el soporte de muchas pesquerías comerciales comprendiendo el 30% de los camarones peneidos que se cultivan en la costa este del Pacífico (Páez, 2002). Su éxito comercial se debe a que este decápodo presenta una alta tasa de crecimiento con una supervivencia y crecimiento aceptable en altas densidades de cultivo (Rosenberry 1994; Treece 2000). Wyban, Walsh y Godin (1995), Ponce Palafox, Martínez Palacios, Ross (1997) y Díaz, Farfán, Sierra y Re (2001) muestran que la sobrevivencia y la tasa de crecimiento de esta especie dependen de la temperatura y de su interacción con la salinidad.

Debido al potencial económico que el camarón blanco representa para México, es de suma importancia el evaluar la fisiología térmica de los adultos de esta especie y así contar con mayor información para el mantenimiento de organismos adultos de *Litopenaeus vannamei* y optimizar sus condiciones de

reproducción antes de que el estrés limite su capacidad reproductiva, causando efectos nocivos en los gametos.

II. Hipótesis

Al exponer a los adultos del camarón blanco a un estrés térmico, ocurrirá un desbalance interno que se reflejará en la modificación de sus parámetros fisiológicos y metabólicos reflejándose también en su expresión diferencial permitiéndonos evaluar la capacidad de adaptación térmica así como la termotolerancia de esta especie.

III. Objetivos

III.1 Objetivo General

Determinar la respuesta fisiológica y metabólica involucrada en la termotolerancia y el expresión diferencial en adultos de *Litopenaeus vannamei*, aclimatados a diferentes temperaturas, para conocer su capacidad de adaptación térmica.

III.2 Objetivos particulares:

Determinación de la temperatura preferida de adultos de *Litopenaeus vannamei* utilizando dos métodos.

Cuantificar el efecto de cinco diferentes temperaturas de aclimatación sobre el consumo de oxígeno de rutina y Q_{10} del camarón blanco para estimar su temperatura óptima.

Cuantificar la variación de los parámetros metabólicos (glucosa, proteínas totales, colesterol, acilglicéridos y fenoloxidasa) y la osmolaridad de la hemolinfa del camarón blanco expuesto a la temperatura crítica máxima (TCMax) utilizando cinco temperaturas de aclimatación: 20 °C, 23 °C, 26 °C, 29 °C y 32 °C $\pm$ 1 °C.

Estimar la tasa de respuesta a la aclimatación (ARR) del camarón blanco aclimatado a cinco temperaturas.

Determinar el endurecimiento térmico de adultos del camarón blanco mediante la exposición sucesiva a la TCMax en los organismos aclimatados a diferentes temperaturas.

Evaluar la expresión diferencial de genes en el camarón blanco expuesto a diferentes temperaturas de aclimatación.

IV. Materiales y Métodos

Se colocaron 5000 organismos en estadio de postlarva PL₂₀ en estanques de 2000 L provenientes del laboratorio Acuacultores de La Paz S.A. ubicado en La Paz, BCS, los cuales contaron con flujo continuo de agua de mar a 35‰, mantenidos a una temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con calentadores sumergibles de 1000 W, los camarones permanecieron en estas condiciones hasta que alcanzaron la etapa adulta. Se les proporcionó diariamente alimento comercial Rangen al 8% de su peso húmedo.

Una vez que alcanzaron la talla de 15 a 18 g de peso húmedo, se colocaron 700 organismos en cada uno de los 5 estanques de 2000 L ($n=3,500$) provistos con recambio de agua y aireación constante, donde se aclimataron por 30 días a cinco temperaturas ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), con una tasa de incremento o decremento de la temperatura de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por día, estas se mantuvieron utilizando calentadores de 1000 W conectados a controladores individuales de temperatura.

El preferendum térmico de los camarones fue determinado por el método agudo y gravitacional descrito por Reynolds y Casterlin (1979) para lo que se utilizó un gradiente horizontal descrito por Díaz, Re, Medina, Re, Valdez y Valenzuela (2006) que constó de un tubo de PVC de 400 cm de longitud y 20 cm de diámetro con 20 segmentos de 20 cm de longitud cada uno. La profundidad de la columna de agua fue de 9 cm y el gradiente se formó al colocar un calentador de 1000 W que se ubicó en uno de los extremos del gradiente, mientras que en el extremo opuesto se bombeó agua fría proveniente de un termorregulador (Neslab HX-150). El gradiente tuvo un intervalo de temperatura de 10 a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. En cada segmento se colocó una piedra de aireación para mantener una concentración de oxígeno disuelto de 5 a $9\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$, evitando así la estratificación en la columna de

agua, la temperatura se midió en cada segmento con termómetros digitales colocados equidistantemente. En la parte frontal del gradiente, se colocó una cortina y un espejo en un ángulo de 45° para observar a los organismos en el interior del mismo sin molestarlos, evitando así el estrés.

Para la determinación de la temperatura preferida mediante el método agudo se utilizaron 100 adultos de camarón blanco previamente aclimatados durante 30 días en estanques de 2000 L a las temperaturas de 20 °C, 23 °C, 26 °C, 29 °C y 32 °C $\pm$ 1 °C. Al finalizar el periodo de aclimatación, se seleccionaron 5 camarones provenientes de cada temperatura de aclimatación. En el interior del gradiente ya formado, se colocaron 5 organismos marcados y sexados de acuerdo a lo descrito por Pérez y Kensley (1997) obteniendo una relación final de 1 macho por 1 hembra y se introdujeron en el gradiente en las cámaras virtuales que tenían la temperatura de aclimatación de donde provenían los camarones. La ubicación de los organismos y la temperatura de cada cámara se registraron cada diez minutos durante 120 minutos. Se realizaron cuatro repeticiones por cada condición experimental.

El preferendum final se determinó por la intersección de las temperaturas preferidas por los organismos provenientes de cada temperatura de aclimatación, con la línea de igualdad.

Para determinar la temperatura preferida por medio del método gravitacional, se utilizaron 20 organismos marcados individualmente de acuerdo a Díaz *et al.* (1995) provenientes de la temperatura de 29 °C, a los cuales no se les proporcionó alimento 24 h antes de iniciar los experimentos, se marcaron y sexaron de la misma manera que los organismos que se usaron en el método agudo. La posición de los animales en los segmentos del gradiente, así como la temperatura, se registró cada hora durante un ciclo de 24 horas. Se realizaron

cuatro repeticiones. Se simuló un ciclo día-noche (12 h luz/12 h oscuridad) con un intervalo de fase luminosa a oscura de 0.35×10^{15} - 0.02×10^{15} quanta $s^{-1} cm^{-2}$ respectivamente, con un periodo de transición gradual entre ambos de 30 minutos.

Para la medición del consumo de oxígeno de los camarones, se utilizó un respirómetro semiabierto como el descrito por Díaz *et al.* (2007), se utilizaron 20 organismos provenientes de cada temperatura de aclimatación ($n= 100$) que se colocaron individualmente en 20 matraces de 2.800 L utilizados como cámaras respiratorias, con excepción de una que permaneció vacía como control para corregir el consumo de oxígeno ocasionado por microorganismos presentes en el sistema.

Los organismos se colocaron en las cámaras respirométricas 18 horas antes de iniciar las mediciones para evitar estrés por manejo (Martínez Palacios, Ross y Jiménez Valenzuela 1996). Los camarones no fueron alimentados 24 h antes de iniciar los experimentos de medición de consumo de oxígeno.

Se tomaron las lecturas del oxígeno disuelto en cada cámara, con un oxímetro YSI 52 B provisto de un sensor polarográfico, el cual se conectó a una cámara cerrada por medio de un sistema de mangueras para evitar que la muestra de agua tuviera contacto directo con el aire.

Las cámaras respirométricas permanecieron cerradas durante 1 hora y media, tiempo suficiente para evitar que el oxígeno disuelto disminuyera más allá del 30% y se convirtiera en un factor de estrés (Stern *et al.* 1984).

Antes de cerrar las cámaras se tomó una muestra de agua para cuantificar la concentración inicial de oxígeno y al finalizar el período de 1 hora y media se tomó otra muestra para medir la concentración final de oxígeno disuelto. Se

realizaron dos repeticiones con un intervalo de 2 horas para cada condición experimental. Las mediciones se realizaron entre las 9:00 y 13:00 h.

El consumo de oxígeno de los organismos se calculó a partir de la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales del oxígeno consumido por los organismos provenientes de cada temperatura de aclimatación y se expresaron como ($\text{VO}_2 \text{ mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ p.h.}$) donde p.h. es el peso húmedo.

El cálculo del coeficiente térmico para la tasa metabólica del camarón (Q_{10}), el cual representa la sensibilidad del organismo a las variaciones de temperatura se realizó por medio de la siguiente ecuación (1), propuesta por Schmidt-Nielsen (1997) para los organismos provenientes de cada temperatura de aclimatación:

$$Q_{10} = (\text{Tasa}_2 / \text{Tasa}_1)^{(10/\text{Temp2}-\text{Temp1})} \quad (1)$$

Para determinar la TCMax, se utilizaron 40 organismos provenientes de cada temperatura de aclimatación (20, 23, 26, 29 y 32 ± 1 °C) que se colocaron de 2 en 2 en acuarios de 24 x 12 x 12" (45 L), equipados con un calentador de 1000 W y una piedra de aireación para evitar la estratificación y mantener una temperatura uniforme, se colocaron los camarones 30 minutos antes de dar inicio al experimento para disminuir el estrés por manejo (Pérez *et al.*, 2003). Posteriormente se incrementó la temperatura del agua a una tasa de 1 °C por minuto hasta observar la primer señal de estrés o pérdida de equilibrio (LRR) (Re *et al.*, 2005; 2006). En ese momento se sacaron los organismos y se les extrajo una muestra de 10 µl hemolinfa para realizar de manera inmediata la medición de la presión osmótica. La osmolaridad de la hemolinfa se determinó con un osmómetro de vapor modelo Wescor 5200. Los resultados se expresaron en mmol Kg⁻¹. Se realizaron 20 repeticiones por cada tratamiento.

Para obtener la tasa de respuesta de aclimatación (ARR), se utilizaron los datos obtenidos del estudio de la TCMax y se dividieron entre la temperatura de aclimatación respectiva, obteniendo de este modo, $\Delta\text{CTMax}/\Delta T$ (Claussen, 1977).

Para evaluar el endurecimiento térmico del camarón blanco se expusieron de manera repetida 20 organismos por temperatura de aclimatación a la TCMax espaciada de la siguiente manera: 0, 1, 3, 6, 12 y 24 h., una vez observada la pérdida de equilibrio (LRR), los organismos se regresaron a un acuario con la temperatura de aclimatación de la que provenían, donde se mantuvieron hasta la siguiente exposición.

Para la cuantificación de los metabolitos, (glucosa, proteínas totales, colesterol, acilglicéridos) se extrajo la hemolinfa de los camarones de cada condición experimental utilizando una jeringa de insulina precargada con una solución anticoagulante fría de SIC-EDTA en relación 2:1 (Vargas-Albores *et al.*, 1993). Todas las muestras se centrifugaron a 800 g por 3 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue separado para la cuantificación de cada metabolito por medio de kits comerciales. Se utilizaron placas de 96 pozos donde fueron colocados 10 μL de cada muestra por triplicado, posteriormente se añadieron 200 μL del reactivo correspondiente, se incubaron y se leyeron en un lector de placas marca BIO-RAD a 540 nm (glucosa, colesterol y acilglicéridos) 490 nm (fenoloxidasas) y a 595 nm (proteínas totales), finalmente la concentración de cada metabolito fue calculada en base a una curva de regresión.

Los análisis estadísticos de la temperatura preferida, consumo de oxígeno, tolerancia térmica (TCMax), endurecimiento, osmolaridad de la hemolinfa y los metabolitos se procesaron mediante el análisis exploratorio de datos (Tukey, 1977) y se graficaron en cajas en paralelo, dentro de las cuales el 50% de los datos se distribuyó alrededor de la mediana y en el intervalo de confianza; el otro

50% de los datos se distribuyó en cada barra. Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA) por medio de los programas SigmaSTAT y SigmaPLOT para observar las diferencias entre los tratamientos.

Para analizar la expresión diferencial de los hepatopáncreas de los camarones provenientes de las 5 temperaturas de aclimatación se utilizaron los organismos en el punto en el que alcanzaron su TCMax, en ese punto se disectaron los hepatopáncreas y se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido, posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta que se procesaron.

Se utilizaron aproximadamente 80 mg de tejido para realizar la extracción de RNA por medio de TRIzol (Invitrogen). Se homogenizaron 80 mg de hepatopáncreas con 1 mL de TRI, se agregaron 200 µL de cloroformo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4 °C, se transfirió el sobrenadante con el RNA y se agregaron 500 µL de alcohol isopropílico, se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. Después se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 mL de etanol frío al 75%, se mezcló y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4 °C, se dejó secar la pastilla por 10 minutos y se resuspendió el RNA en agua libre de nucleadas, se incubó durante 10 minutos a 55 °C, se cuantificó a una longitud de onda de 230 nm utilizando un espectrofotómetro Nanovue, se ajustó la concentración a 2000 ng µL⁻¹ y se almacenó a -80 °C.

Se sintetizaron 3 oligos dT y 11 aleatorios, con las siguientes secuencias:

 Oligo (dT) 16bases:

 GdT: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'

 AdT: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'

 CdT: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'

Oligos aleatorios de 13bases:

P1DDaleatorio: 5'-AAGCTTGATTGCC-3'

P2DDaleatorio: 5'-AAATCGGTCATAG-3'

P3DDaleatorio: 5'-TAAATGCTGGTGG-3'

P4DDaleatorio: 5'-TAAATGCTGGTAG-3'

P5DDaleatorio: 5'-AAAGATCTGACTG-3'

P6DDaleatorio: 5'-TAAATGCTGGGTG-3'

P7DDaleatorio: 5'-TAAATGCTGTATG-3'

P8DDaleatorio: 5'-TAAATGGAGCTGG-3'

P9DDaleatorio: 5'-TAAATGTGGCAGG-3'

P10DDaleatorio: 5'-TAAAGCACCGTCC-3'

P11DDHSP: 5'-GGNCCNAARATTGA-3'

Para sintetizar cDNA a partir del RNA previamente extraído se utilizó el kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) y se siguieron las indicaciones del fabricante, en el cual se utilizó como cebador cada uno de los 3 oligos “dT” antes mencionados. El cDNA resultante se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanovue, se ajustó la concentración a $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y se almacenó a -80°C .

Una vez sintetizado el cDNA se realizaron reacciones de PCR con el kit GoTaq (Promega) utilizando como cebadores los oligos aleatorios y el oligo dT empleados para la síntesis del cDNA correspondiente con el siguiente programa: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de (94°C por 30 segundos, 40°C por 90 segundos y 72°C por 50 segundos) seguido de una extensión final de 72°C por 15 minutos.

Una vez obtenidas las amplificaciones se desnaturalizaron a 95°C por 5 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% con Urea 8 M de 40 cm

de longitud y se corrió a 2000 V, 60 mAmps, 70 W durante 2 horas. Posteriormente se realizó una tinción con plata para revelar la presencia de las bandas.

V. Resultados

La temperatura preferida determinada mediante el método agudo en adultos de *L. vannamei* fue de 26.2 ± 0.44 °C. La influencia de la temperatura de aclimatación no tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) (Figura 1).

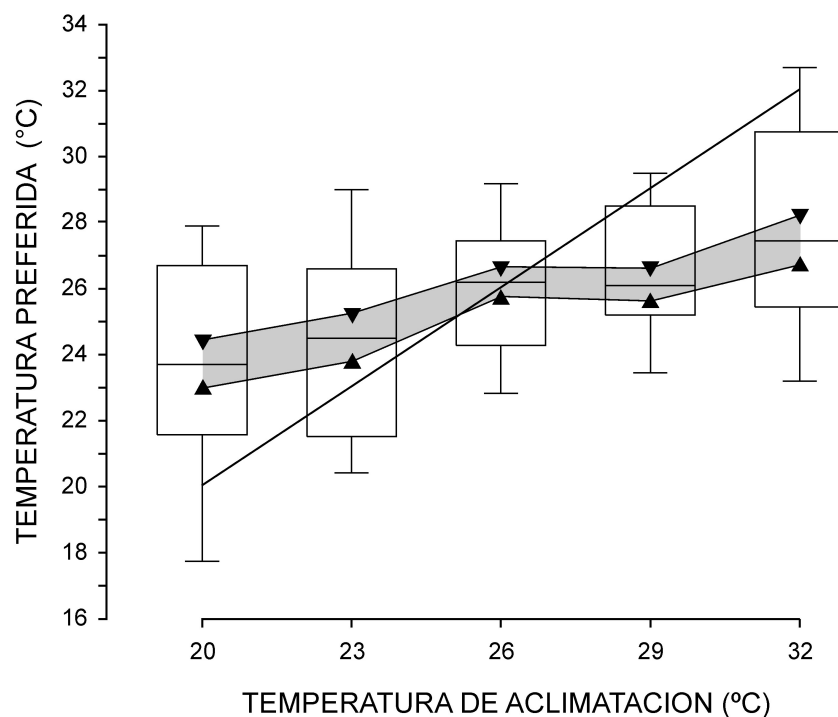


Figura 1.- Temperatura preferida por los adultos de *L. vannamei* determinada mediante el método agudo. La zona delimitada por triángulos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

La temperatura preferida por los adultos del camarón blanco mediante el método gavitacional durante el día fue de 26.0 °C y durante la noche de 25.6 °C, no se observaron diferencias significativas entre el preferendum diurno y el nocturno de temperatura ($P < 0.05$) (Figura 2), con un preferendum final de 26.0 °C. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el preferendum final de los adultos determinado mediante el método agudo y el gravitacional.

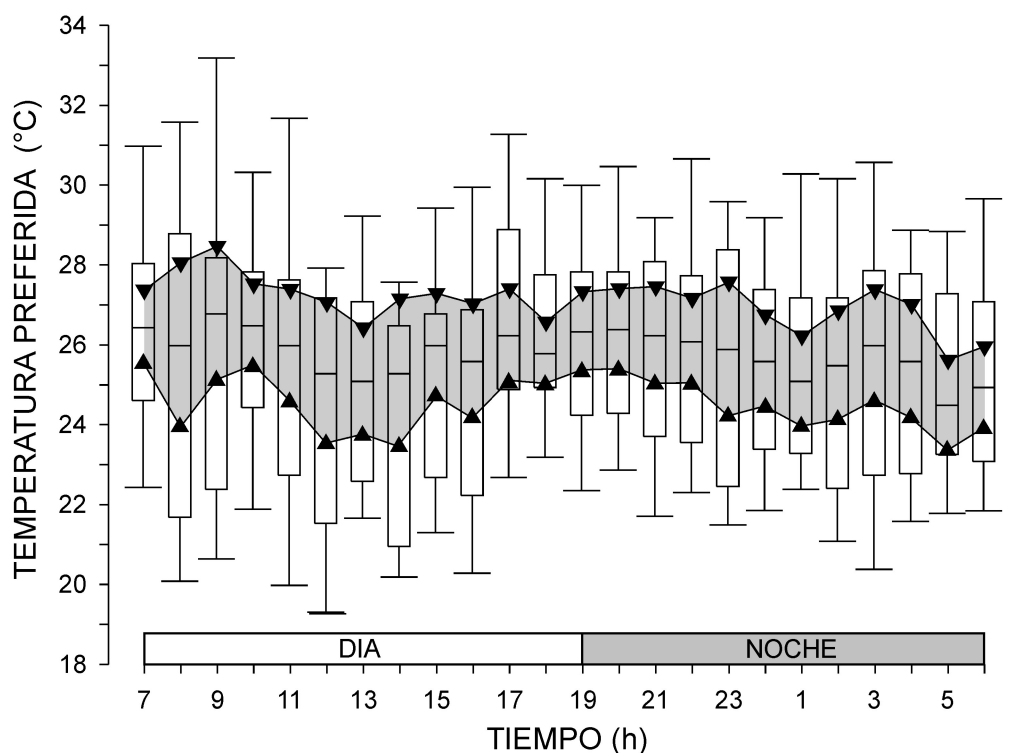


Figura 2.- Temperatura preferida por los adultos de *L. vannamei* determinada mediante el método gravitacional. La zona delimitada por triángulos representa los intervalos de confianza de las medianas al 95%.

La tasa de consumo de oxígeno de los adultos del camarón blanco se incrementó significativamente ($P < 0.05$ y $y = -37.91 + (3.97 x, r^2 = 0.99)$) conforme la temperatura de aclimatación aumentó de 20 °C a 32 °C. Alcanzando un máximo de 90.0 mg O₂ kg⁻¹ h⁻¹ p.h. (Figura 3). El intervalo del cociente de temperatura del camarón blanco (Q_{10}) entre los intervalos de temperatura de 20-23 °C fue de 2.99, y entre 23-26 °C fue de 1.60 (Tabla I).

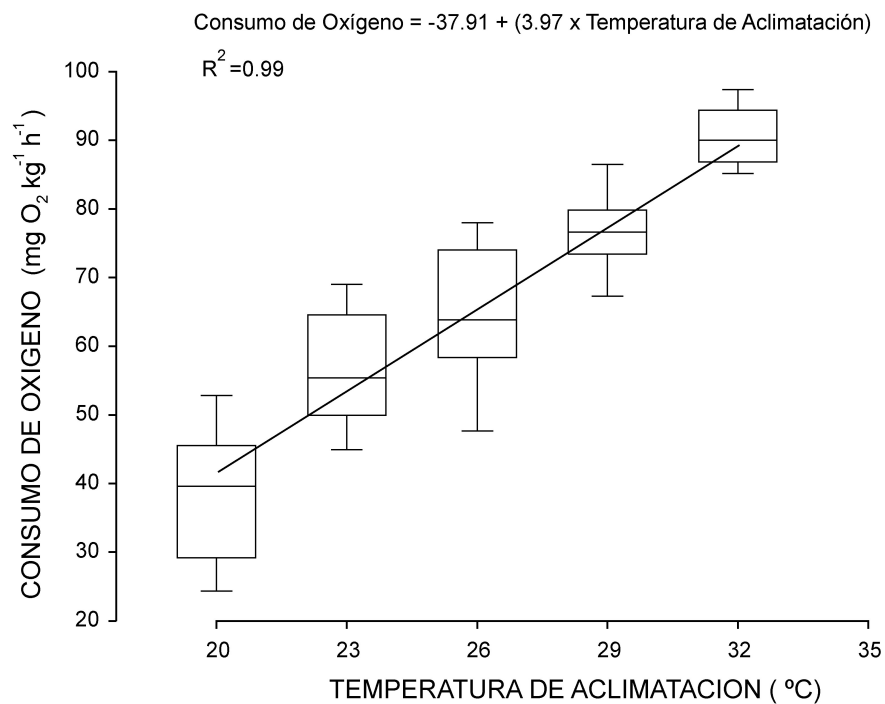


Figura 3.- Consumo de oxígeno (mg O₂ kg⁻¹ h⁻¹ p.h.) en adultos de *L. vannamei* aclimatados a las temperaturas de 20, 23, 26, 29 y 32 °C.

Tabla I.- Tasas de consumo de oxígeno de adultos de *L. vannamei* aclimatados a diferentes temperaturas y sus respectivos valores de Q_{10} .

Temperatura (°C)	Consumo de oxígeno (mg O ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹ p.h.)	Intervalo de Temperatura	Q_{10}
20	39.6	-	-
23	55.4	20-23	2.99
26	63.8	23-26	1.6
29	76.6	26-29	1.83
32	90.0	29-32	1.74

La TCMax de los adultos de camarón blanco se incremento conforme la temperatura de aclimatación incremento de 20 a 32 °C, un análisis de varianza de una vía nos indico que la temperatura de aclimatación tuvo un efecto ($P < 0.05$) sobre la temperatura critica máxima, siendo de 36 °C para los camarones aclimatados a 20 °C, de 37.4 °C para los de 23 °C, de 39.3 °C para los de 26 °C, de 39.9 °C para los de 29 °C y de 41.5 °C para los camarones aclimatados a 32 °C (Figura 4).

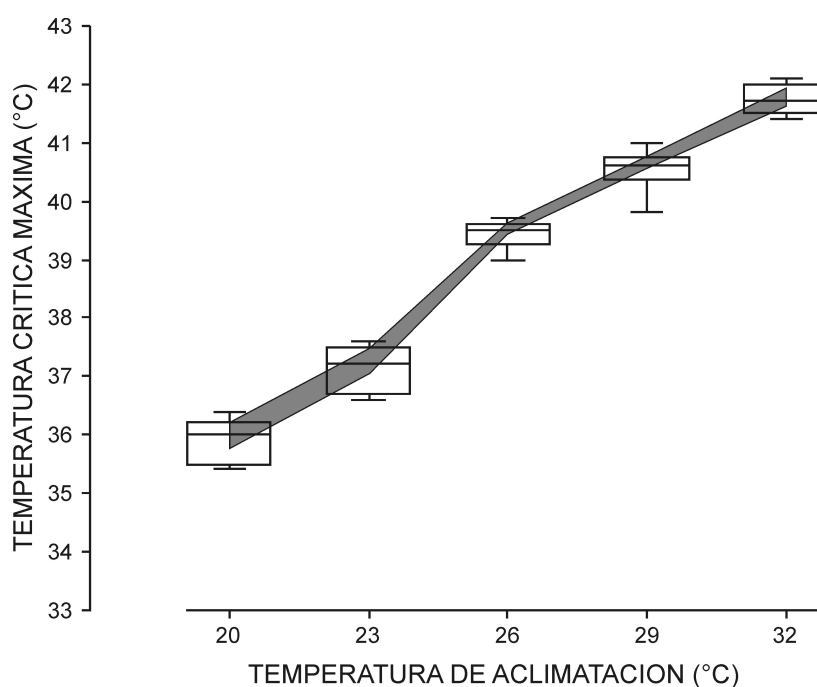


Figura 4.- Temperatura crítica máxima de los adultos del camarón blanco procedentes de cinco temperaturas de aclimatación. La zona sombreada representa el intervalo de la mediana al 95%, las barras incluyen la distribución al 50% y las líneas representan los cuartiles.

En este estudio, no se observó un endurecimiento térmico en los adultos de *L. vannamei*, ya que no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los valores de las 6 distintas exposiciones a la TCMax a las que fueron sometidos en un lapso de 24 horas (Figura 5).

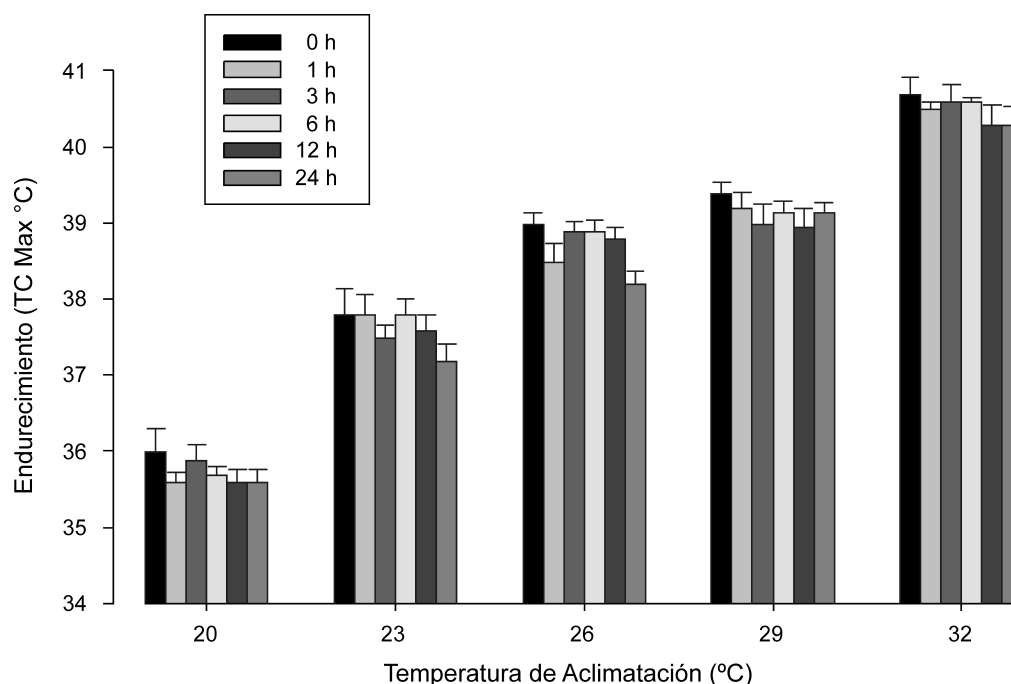


Figura 5.- *Endurecimiento térmico determinado a través de exposiciones sucesivas a la TCMax en los adultos del camarón blanco procedentes de cinco temperaturas de aclimatación.*

La osmolaridad de la hemolinfa de los organismos control provenientes de las diferentes temperaturas de aclimatación, no presentaron diferencias significativas entre sí, indicando una osmolaridad constante e independiente de la temperatura de aclimatación a la que se encontraban los camarones (776 mmol kg^{-1}). Al comparar las osmolaridades de la hemolinfa de los organismos provenientes de las diferentes temperaturas de aclimatación, expuestos a la TCMax y donde se observó como punto final la primera pérdida de equilibrio se obtuvo intervalo de la osmolaridad de ($803\text{-}809 \text{ mmol kg}^{-1}$). Para el caso de los organismos mantenidos en las cinco temperaturas de aclimatación (20, 23, 26, 29, 32 °C), y expuestos a la TCMax se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la osmolaridad de las muestras control y las muestras experimentales (Figura 6).

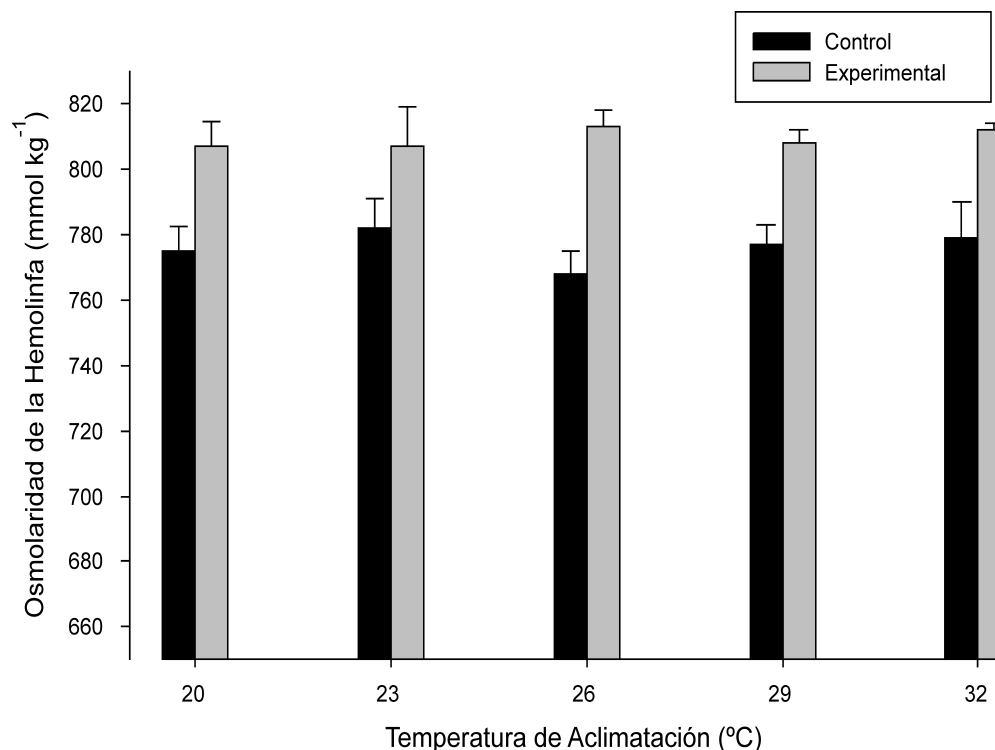


Figura 6.- Osmolaridad de la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes. En color negro se presentan los controles y en gris los experimentales.

Se realizó el cálculo del ARR de acuerdo a lo descrito por Claussen (1977) obteniendo un intervalo de 0.20-0.63 para los adultos del camarón blanco aclimatados a las cinco temperaturas antes descritas (Tabla II).

TABLA II. Temperatura Crítica Máxima y ARR de *Litopenaeus vannamei* aclimatado a cinco diferentes temperaturas.

Temperatura de Aclimatación	TCMax	Intervalo de Temperatura	ARR
20	36.0	--	
23	37.4	20-23	0.46
26	39.3	23-26	0.63
29	39.9	26-29	0.20
32	41.5	29-32	0.53

Al analizar los metabolitos en los adultos del camarón blanco de organismos controles, se observó que en ninguno de los casos la temperatura de aclimatación tuvo un efecto en los metabolitos. Sin embargo con la exposición a la TCMax se observó lo siguiente:

Los resultados de colesterol no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los organismos control y los experimentales, con valores de 0.231 a 0.338 mg mL⁻¹ (Figura 7).

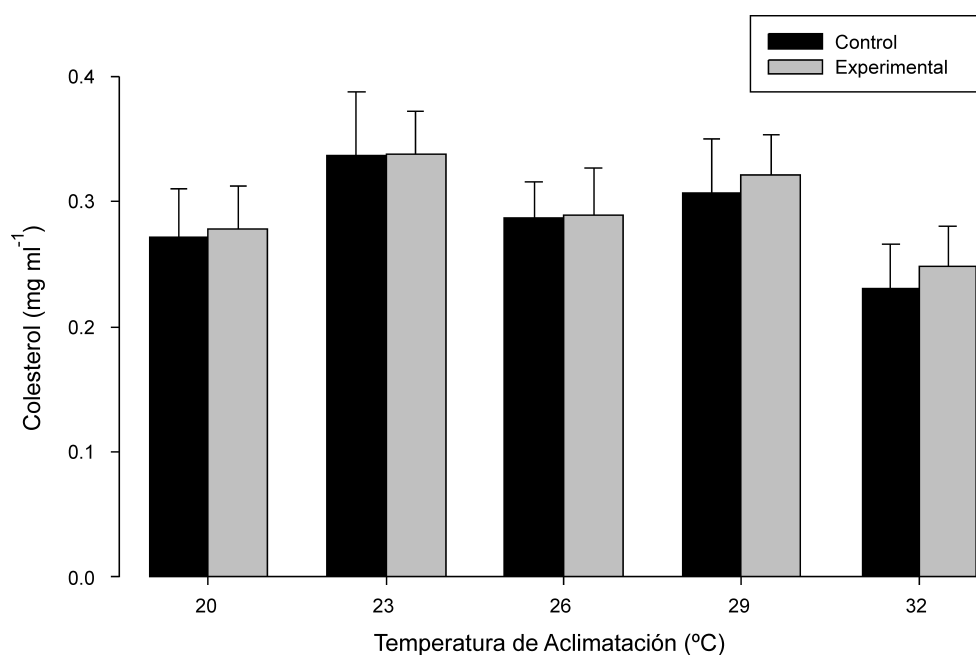


Figura 7.- Colesterol presente en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes. En color negro se presentan los controles y en gris los experimentales.

En el caso de los acilglicéridos de los camarones expuestos a la TCMax los resultados variaron de 0.442 a 0.66 mg mL⁻¹ y no mostraron diferencias significativas entre los organismos control y experimentales ($P < 0.05$) (Figura 8).

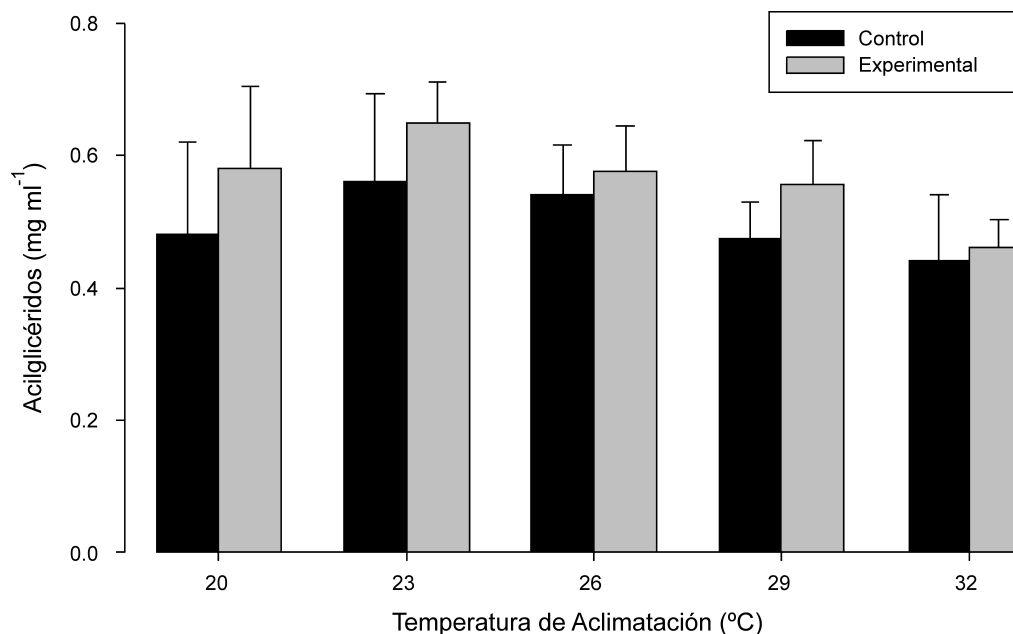


Figura 8.- *Acilglicéridos presentes en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes. En color negro se presentan los controles y en gris los experimentales.*

En cuanto a las proteínas totales, de los camarones, en este trabajo se reportaron valores de 149 a 177 mg mL⁻¹, sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los organismos control y experimentales ($P < 0.05$) (Figura 9).

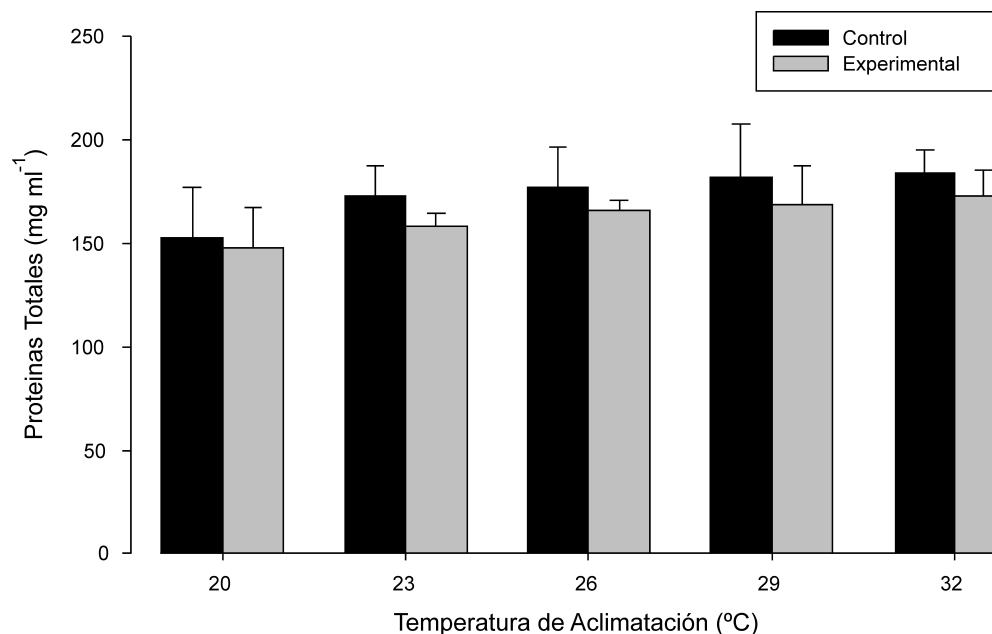


Figura 9.- Proteínas totales presentes en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes. En color negro se presentan los controles y en gris los experimentales.

Los valores de glucosa encontrados en el presente estudio en los adultos del camarón blanco no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los organismos control independientemente de la temperatura de aclimatación en la que se encontraban, con valores de 0.18 a 0.26 mg mL⁻¹. En el caso de los organismos experimentales, si se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) al compararlos con los organismos control, manteniéndose la glucosa en un intervalo de 0.49 a 0.57 mg mL⁻¹ (Figura 10).

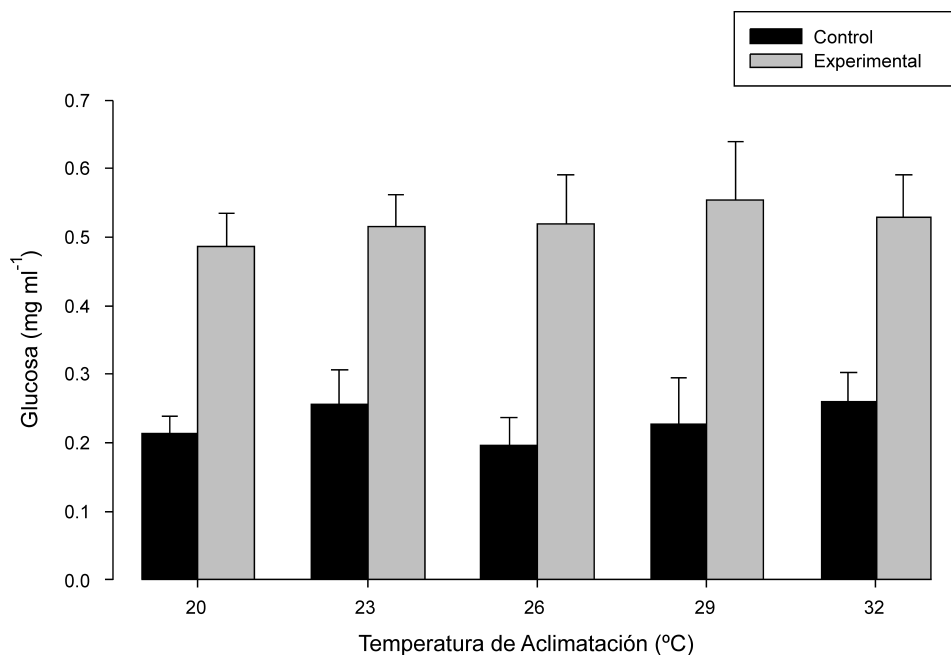


Figura 10.- Glucosa presente en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes. En color negro se presentan los controles y en gris los experimentales.

Los resultados de la fenoloxidasa en la hemolinfa de los camarones, mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los organismos control y los experimentales de cada una de las distintas temperaturas de aclimatación, la actividad de la fenoloxidasa en los organismos experimentales se mantuvo en un intervalo de 0.048 a 0.052 a una D.O. de 490 nm y en los organismos control en un intervalo de 0.16 a 0.18 una D.O. de 490 nm (Figura 11).

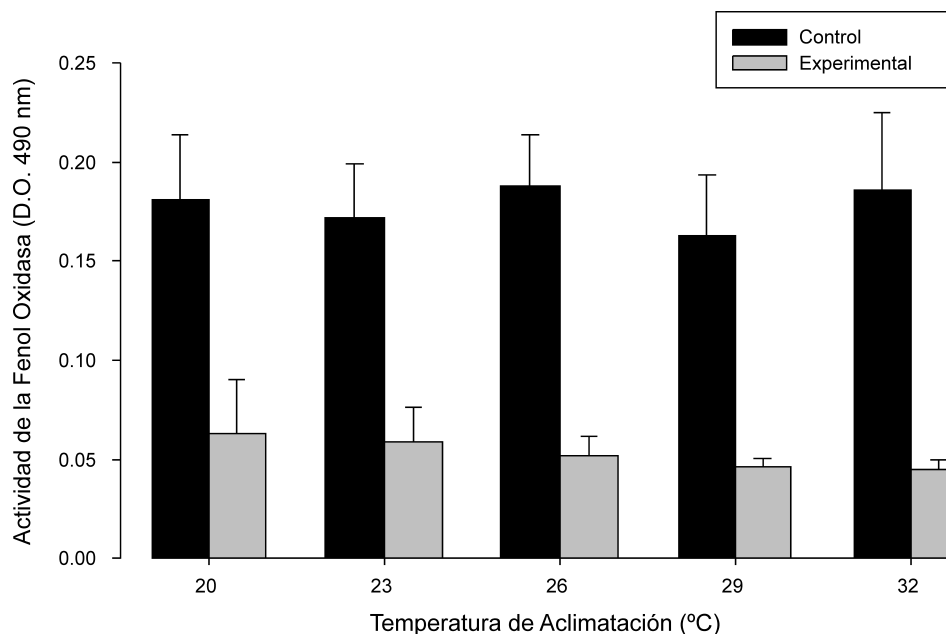


Figura 11.- *Actividad de la fenoloxidasa en la hemolinfa del camarón blanco aclimatado a 5 temperaturas diferentes. En color negro se presentan los controles y en gris los experimentales.*

Hasta el momento se tienen estandarizadas las condiciones de PCR para observar la expresión diferencial del RNA de los hepatopáncreas del camarón blanco, así como el oligo dT y 3 oligos aleatorios (8, 10 y 11). Se puede observar la expresión genética de 2 camarones bajo estas condiciones (Figura 12).

Se comparó la expresión genética de 6 camarones aclimatados a 3 temperaturas (20, 26 y 32 °C), 2 camarones por temperatura, 1 control y 1 camarón expuesto a estrés térmico en el punto de su TCMax (Figura 13).

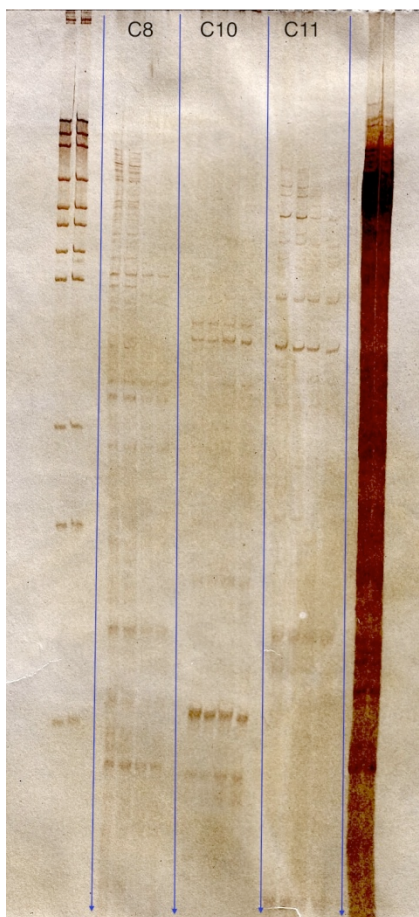


Figura 12.- Gel de poliacrilamida con expresión diferencial de 2 muestras de hepatopancreas de camarón aclimatado a 26 °C, amplificado con los tres oligos aleatorios 8, 10 y 11 respectivamente, utilizando oligo dTC (primeros 2 carriles de cada condición pertenecen al camarón 1 y los segundos 2 carriles pertenecen al camarón 2).



Figura 13.- Gel de poliacrilamida con expresión diferencial de 6 muestras de hepatopáncreas de camarón 3 controles y 3 experimentales aclimatados a 20, 26 y 32 °C, amplificado con oligo aleatorio 8 y oligo dTC.

VI. Discusión

La temperatura preferida en los organismos acuáticos se puede diferenciar entre el preferendum agudo de temperatura y el preferendum final. Mientras que la temperatura aguda preferida está influenciada por la temperatura de aclimatación, el preferendum final no se ve afectado (Reynolds y Casterlin 1979; Díaz y Buckle 1993). En lo que respecta a la determinación de la temperatura preferida de los adultos de *L. vannamei* mediante los métodos agudo y gravitacional, se encontró que los valores estuvieron entre 26.2 - 26.0 °C.

De acuerdo a lo mencionado por Johnson y Kelsch (1998) las especies que experimentan fluctuaciones térmicas anuales bajas, pero están expuestas a fluctuaciones de temperaturas diarias o estacionales tienen un ciclo corto y tendrán relaciones de preferencia de temperatura independientes de las de aclimatación. En este trabajo, las temperaturas preferidas de los adultos de *L. vannamei* determinadas mediante el método agudo fueron independientes de la temperatura de aclimatación. Resultados similares se han obtenido en trabajos realizados por Espina, Díaz Herrera y Buckle (1993) en *Procambarus clarkii*, Chen y Chen (1999) con *Penaeus monodon* en un intervalo de temperatura de aclimatación de 24 a 32 °C. Organismos como los adultos del camarón blanco que experimentan un ciclo corto de temperatura deberán estar favorecidos con una amplia tolerancia térmica y no requerirán tiempo para aclimatarse (Johnson y Kelsch 1998).

El preferendum diurno y nocturno de *L. vannamei*, no fue significativamente diferente. Reynolds y Casterlin (1979), Díaz *et al.* (2000), Pérez *et al.* (2003), Luna-Figueroa *et al.* (2003) y Re *et al.* (2006) han reportado resultados similares en relación a la temperatura preferida en organismos acuáticos y su relación a lo largo del día, nuestros resultados no concuerdan con

la hipótesis bioenergética propuesta por Brett (1971) que menciona que los organismos utilizan el comportamiento termorregulador al elegir temperaturas bajas en el día y altas en la noche para favorecer el balance metabólico diario y preservar energía cuando el alimento es limitante en el hábitat.

Una vez que los camarones se encontraron dentro del gradiente, estos usaron como mecanismo de orientación térmica la ortoquinesis, debido a que los adultos tuvieron un intervalo de temperaturas preferidas de 25.6 a 26.0 °C, permaneciendo en un intervalo estrecho de temperatura, lo que causó que disminuyera su velocidad de desplazamiento, en aquellas temperaturas que maximizaron su disponibilidad de energía, la cual puede ser canalizada a funciones tales como actividad, reproducción y sobrevivencia (Fraenkel y Gunn 1961; Kelsch y Neill 1990; Bryan *et al.* 1990; Kelsch 1996; Lagerspetz y Vainio 2006).

Para juveniles de *Penaeus duorarum* Reynolds y Casterlin (1979) reportaron una temperatura preferida combinando el ciclo diurno y nocturno de 30.3 °C. En juveniles de *L. stylirostris* Re *et al.* (2006) obtuvieron una temperatura preferida de 27.8 °C la cual no fue modificada por la salinidad. Valdez (2002) y Hernandez *et al.* (2006) demostraron que la temperatura y no la salinidad tenía un efecto en la preferencia de *L. vannamei* encontraron una temperatura preferida de 27 a 30 °C para juveniles de esta especie. La temperatura preferida reportada para juveniles de *P. duorarum*, *L. stylirostris* y *L. vannamei* tuvo un intervalo de 27 a 30.3 °C, el cual es similar a lo reportado por Ponce-Palafox *et al.* (1997) quienes mencionan que en el intervalo de temperatura de 28 a 30 °C obtuvieron una mejor sobrevivencia y crecimiento en juveniles de camarón blanco.

En este trabajo realizado en organismos adultos de camarón blanco, se obtuvo una temperatura preferida de 26.0 °C, la que coincide con los estudios

realizados en adultos de *Penaeus setiferus* (Linnaeus) por Bray y colaboradores (1985) donde evaluaron el efecto de la temperatura en la calidad del esperma y reportan un menor número de anomalías en el esperma de adultos mantenidos en temperaturas de 25 a 26 °C. Pascual y colaboradores (1998) determinaron el efecto de la temperatura en la condición del tracto reproductivo de adultos de *P. setiferus* y recomiendan una temperatura de 25 a 27 °C para obtener una mejor calidad de esperma y una correcta regeneración del espermatóforo. En adultos de *L. vannamei* Pérez-Velazquez y colaboradores (2001) evaluaron el efecto que tienen diferentes temperaturas experimentales sobre la calidad del esperma, el porcentaje de anomalías y el conteo espermático, concluyeron que los organismos que se encontraban a una temperatura de 26 °C tuvieron un mayor conteo espermático y un bajo porcentaje de anomalías espermáticas. Por lo tanto podemos concluir que mantener una temperatura de 26 °C es mejor para el mantenimiento de organismos adultos, con fines reproductivos.

Giattina y Garton (1982) sugieren cuatro hipótesis para unificar los conceptos en el estudio del comportamiento termorregulador en organismos acuáticos. Las diferencias observadas entre organismos juveniles y adultos del camarón blanco en relación a la temperatura preferida, está relacionada con el hecho de que los juveniles la temperatura preferida coincide con la óptima para crecimiento, en el caso de los adultos su temperatura preferida será la óptima para la reproducción. Esto coincide con la hipótesis número tres mencionada por Giattina y Garton (1982) que la temperatura preferida puede reflejar el óptimo térmico para que se realicen adecuadamente ciertos procesos fisiológicos.

La temperatura preferida obtenida para los adultos de *L. vannamei* fue un buen indicador de los requerimientos térmicos ambientales para la especie; ya que los organismos se encuentran fisiológicamente estables en este intervalo de temperatura. Nichelmann (1983) menciona que en estos intervalos, el organismo está expuesto a un estrés mínimo y que sus funciones fisiológicas se encuentran

optimizadas, lo que se ve reflejado en condiciones reproductivas adecuadas. La amplitud de esta zona termo-neutral tiene implicaciones ecológicas y acuaculturales importantes (Huey y Stevenson 1979). En consecuencia, nosotros recomendamos para el mantenimiento de un stock reproductivo saludable de *L. vannamei* que el agua en condiciones controladas tenga una temperatura promedio cercana al preferendum térmico reportado en este trabajo (25.8-26.2°C).

En lo que respecta al consumo de oxígeno de los adultos de *L. vannamei*, se encontró que conforme aumentó la temperatura de aclimatación, el consumo de oxígeno también se incrementó; resultados similares han sido obtenidos en peces por Kita *et al.* (1996), Das *et al.* (2004; 2005), Chatterjee *et al.* (2004) y Díaz, González, Sánchez, Leyva y Valenzuela (2007) y en crustáceos como el camarón *P. vannamei* de diferentes pesos corporales (Martínez Palacios *et al.* 1996) y el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (Manush *et al.*, 2004).

El cociente respiratorio (Q_{10}) de los adultos de camarón blanco fue menor en el intervalo de 23-26 °C (1.60), lo que indico que dentro de ese intervalo de temperaturas de aclimatación los organismos tuvieron una mejor adaptación para el mantenimiento de su homeostasis (Dent y Lutterschmidt 2003; Chatterjee *et al.* 2004). Se ha mencionado por Kita *et al.* (1996), Chatterjee *et al.* (2004), Das *et al.* (2004), Das *et al.* (2005) y Debnath *et al.* (2006) que el punto en el que el Q_{10} disminuye en relación a las temperaturas de aclimatación, corresponde a la temperatura óptima, ya que la disminución del Q_{10} significa que el metabolismo del organismo se redujo, pudiéndose canalizar más energía para los procesos reproductivos, dicho intervalo coincidió con el preferendum térmico del camarón blanco (26.0 °C) encontrado en este trabajo.

La tasa metabólica de los crustáceos puede ser medida indirectamente por medio de la tasa de consumo de oxígeno, la temperatura óptima de

reproducción puede ser estimada a través de la determinación del Q_{10} . La observación de que la temperatura óptima coincide con el intervalo de temperaturas en las que los adultos de *L. vannamei* tuvieron un valor menor de Q_{10} , puede ser explicado por el hecho de que los crustáceos tienen sistemas enzimáticos y fisiológicos que funcionan mejor cuando están cercanos a su óptimo de temperatura (Vernberg 1983)

La TCMax es considerada como una medida de la tolerancia térmica de especies acuáticas, se puede determinar incrementando la temperatura progresivamente desde la temperatura de aclimatación hasta que ocurre la primer señal de estrés, viéndose reflejada por la pérdida de equilibrio (LRR) (Becker y Genoway, 1979; Paladino et al., 1980; Beitinger et al., 2000). Este punto de pérdida de equilibrio es considerado como el punto térmico previo a la muerte del organismo, ya que pierde la habilidad de escapar de condiciones que lo conducirán a la muerte (White, 1983; Beitinger et al., 2000). Cuando la temperatura de aclimatación se incremento de 20 a 32 °C, la tolerancia térmica del camarón blanco incremento de 36 a 41.5 °C (Tabla I). El reflejo del incremento en la TCMax conforme aumentaba la temperatura de aclimatación, ha sido reportado anteriormente en otras especies de crustáceos como *Palaemonetes kadiakensis*, *Procambarus clarkii*, *Macrobrachium tenellum*, *M. rosenbergii*, *M. acanthurus*, *Farfantepenaeus aztecus*, *Litopenaeus stylirostris*, en postlarvas y juveniles de *L. vannamei* (Nelson y Hooper, 1982; Díaz et al., 1994; Hernández et al., 1996; Díaz et al., 1998; 2002; Re et al., 2005; 2006; Kumlu et al., 2010). Paladino et al. (1980) enfatizaron la necesidad de conocer la TCMax de organismos con fines acuaculturales debido a que es un indicador de la tolerancia térmica y nos permite identificar la temperatura en la que ocurre la primer señal de estrés.

No se encontró un endurecimiento térmico a través de la determinación sucesiva de la exposición de los organismos a la TCMax en los ejemplares de *L. vannamei* utilizados en este trabajo. Esto probablemente sea debido a que se

trabajó con organismos adultos, y en condiciones naturales, no están expuestos a cambios térmicos tan pronunciados, como los cambios ambientales a los que pueden estar expuestos organismos juveniles de esta misma especie, ya que los organismos adultos se encuentran en mar abierto a diferencia de los organismos juveniles que se encuentran en lagunas costeras y esteros expuestos a una mayor variación de temperatura (FAO, 1995).

Al considerar el punto de pérdida de equilibrio junto con la osmolaridad de la hemolinfa reportada en este trabajo, donde se encontró un valor de 776 mmol kg⁻¹ para los organismos controles y un valor de 809 mmol kg⁻¹ para los experimentales independientemente de la temperatura de aclimatación a la que se encontraban y al observar que un valor por encima de este provocaría la muerte del organismo, se puede inferir que se dio un problema de señalización, debido a una despolarización de la membrana debido al incremento de iones en la hemolinfa, lo que ocasiono que se desconecte el sistema nervioso del muscular, corroborando lo que propone White (1983). Beitinger *et al.* (2000), mencionan que es el punto previo a la muerte en el que la respuesta locomotora se desorganiza debido a un bloqueo neuromuscular y a una falla presináptica, donde el organismo pierde la capacidad de escapar a condiciones que eventualmente lo llevarán a la muerte. Hernández *et al.* (2004) observaron que la temperatura afectó la osmolaridad de la hemolinfa de erizos expuestos a la TCMax, alterando la permeabilidad de la membrana lo que ocasionó variaciones en el flujo de iones y agua, incrementando la presión osmótica en el fluido corporal de erizos expuestos a altas temperaturas; resultados similares se observaron en este trabajo al exponer a la TCMax a camarones blancos adultos.

En el presente estudio no se encontraron diferencias en los valores de colesterol entre los organismos control y experimentales probablemente debido a que los camarones no lo sintetizan sino que lo obtienen de la dieta (Rosas *et al.*, 2004). Con el fin de evitar variaciones entre los organismos utilizados en este

trabajo, todos fueron alimentados con la misma dieta. Rosas *et al.* (2004) reportan un valor de colesterol de 0.32 mg mL^{-1} para *L. setiferus* en poblaciones naturales y observa que los niveles de colesterol y los acilglicéridos están directamente relacionados con el tipo de alimento y la condición reproductiva (Pascual *et al.*, 2003a). En el caso de los acilglicéridos, al igual que el colesterol, no se encontraron diferencias significativas entre los organismos control y los organismos sometidos a la TCMax, probablemente debido a que es un marcador que se utiliza como referencia para la calidad del alimento y comúnmente son afectados por la cantidad y calidad de las grasas incluidas en la dieta, también son utilizados como fuente de energía y almacenamiento. Pascual *et al.* (2003a) reportan valores de entre 0.4 mg mL^{-1} en adultos de *L. setiferus* sometidos a una temperatura de 33°C durante 10 días. Pascual *et al.* (2003b) y Racotta y Palacios (1998) reportan una concentración basal de acilglicéridos en juveniles de *L. vannamei* (0.40 mg mL^{-1}) el cual es similar a los valores reportados en el presente estudio en adultos de *L. vannamei* (0.44 mg mL^{-1}).

Los resultados en la concentración de proteínas totales del presente trabajo son similares con lo reportado por Racotta y Palacios (1998) con valores basales de 125 mg mL^{-1} y una leve disminución en camarones blancos manipulados durante 2 horas. Pascual *et al.* (2003a) reportan valores de 220 mg mL^{-1} en adultos de *L. setiferus* sometidos a una temperatura de 33°C durante 10 días con leves variaciones a lo largo del experimento. Pascual *et al.* (2003b) reportan valores de 224 y 99 mg mL^{-1} en juveniles de *L. vannamei* mantenidos en estanques al aire libre y en condiciones de laboratorio, respectivamente, atribuyendo estas variaciones en la concentración de proteínas a diferentes condiciones nutricionales, por lo tanto es probable que no se haya observado ninguna diferencia significativa al comparar a los organismos control con aquellos sometidos a estrés térmico, debido a que ambos fueron alimentados con la misma dieta.

Los valores basales de glucosa reportados en el presente estudio ($0.18 - 0.26 \text{ mg mL}^{-1}$) son similares a los valores reportados por Racotta y Palacios (1998) de 0.16 mg mL^{-1} en *L. vannamei*, Pascual *et al.* (2003a) de 0.21 mg mL^{-1} en adultos de *L. setiferus* sometidos a una temperatura de 33°C durante 10 días, donde atribuyen la variación en la cantidad de glucosa probablemente debido a que la utiliza como fuente de energía para controlar su concentración interna de iones. Pascual *et al.* (2003b) reportan valores de 0.28 y 0.38 mg mL^{-1} en juveniles de *L. vannamei* mantenidos en estanques al aire libre y en condiciones de laboratorio, respectivamente.

Cuando los camarones se encuentran estresados, la concentración de glucosa en la hemolinfa incrementa para ser utilizada como una fuente de energía rápida (Racotta y Palacios, 1998; Noga, 2000; Pascual *et al.*, 2003a; 2003b). Hall y van Ham (1998) reportaron que un estrés agudo puede causar un incremento rápido en los niveles de glucosa. Telford (1968) menciona que este incremento se puede ver en tan solo 5 minutos después del estrés, tal como se registró en el presente trabajo en los adultos de camarón blanco expuestos a la TCMax; sin embargo, Webster (1996) reporta que la velocidad de la respuesta varía significativamente dependiendo de la especie y del estresor.

Pascual *et al.* (2003a) mencionan que conforme aumenta la temperatura el metabolismo de *L. setiferus* podría incrementarse, necesitando un incremento en el consumo de energía. Una temperatura elevada, puede alterar la permeabilidad de la membrana a iones que incrementan la pérdida de agua y/o el ingreso de iones afectando el balance osmótico (Weber y Spaargaren, 1970). Como respuesta, el acylglicerol, colesterol y proteínas podrían utilizarse para reparar membranas y la glucosa usarse como fuente de energía para controlar la concentración interna de iones a través de bombas (Pascual *et al.*, 2003a).

Los valores basales de fenoloxidasa del presente trabajo (0.16 a 0.18 a una D.O. de 490 nm) son similares a los reportados por Cheng *et al.* (2005) y Li y Chen (2008) en juveniles de *L. vannamei* con un valor basal de 0.11 a una D.O. de 490 nm. Cheng *et al.* (2005) al evaluar el efecto de la exposición a 4 diferentes temperaturas en el sistema de defensa del camarón blanco reportan que a una temperatura de 32 °C se podía observar una disminución en la actividad de la fenoloxidasa después de 12 horas con un valor de 0.045 a una D.O. de 490 nm, dicho valor es similar a los encontrados en los organismos del presente estudio que fueron sometidos a estrés térmico con valores de 0.048 - 0.052 a una D.O. de 490 nm.

Pascual *et al.* (2003a) atribuye una disminución en la actividad de la fenoloxidasa a que los camarones estaban respondiendo a una condición estresante y preparando su sistema de defensa para amortiguar el estrés, dichos autores mencionan que no hay evidencia que demuestre el tiempo que lleva a los hemocitos la producción de fenoloxidasa y suponen que dicho proceso se lleva más de 48 horas, dependiendo de la intensidad del estrés. Sin embargo, en el presente trabajo se observó una disminución en la actividad de la fenoloxidasa en 10-15 minutos, debido a que la fenoloxidasa es parte del sistema de defensa del camarón y fue la forma en la que reaccionó ante un estrés agudo. Yeh y colaboradores (2010), probaron el efecto de un inmunoestimulante en juveniles de camarón blanco al someterlo a un cambio de temperatura de 24 a 28 °C y a una infección con *V. alginolyticus* siguiéndolo a lo largo de 144 horas, observando una disminución en la actividad de la fenoloxidasa a las 6 horas y recuperándose lentamente hasta las 144 horas. Sin embargo dichos autores mencionan que desconocen las causas que activan el sistema de defensa de *L. vannamei*.

Se observó la expresión diferencial de los hepatopáncreas del camarón blanco al contrastar los organismos controles con los organismos experimentales de 3 temperaturas, particularmente se pudo observar la presencia de una banda de

unos 500 pares de bases en la muestra experimental proveniente de una temperatura de aclimatación de 32 °C y la ausencia de la misma banda en la muestra control, así como la presencia de bandas de menor intensidad en ambas muestras. Lo mismo sucedió en las temperaturas de 20 y 23 °C.

VII. Conclusiones

La temperatura preferida encontrada en este trabajo para los adultos de *L. vannamei* fue de 26 °C independientemente del método utilizado, es probable que tanto su temperatura preferida como la modificación de sus parámetros metabólicos, estén determinados por la reproducción, esto para evitar daño a los espermatozoides, ya que la temperatura en la que los espermatozoides tienen una mejor movilidad es de 26 °C al igual que la temperatura preferida reportada en este trabajo.

Las variables más sensibles para determinar la termotolerancia del camarón blanco son: La glucosa, que incrementó 3 veces el valor basal en tan solo 10 minutos después de someter a los camarones a estrés térmico. La actividad de la fenoloxidasa se activo rápidamente como respuesta a estrés agudo para amortiguar el efecto del estresor.

Considerando que la presión osmótica de la hemolinfa es la responsable de mantener la homeostásis en el organismo y que no se observaron diferencias significativas entre los organismos sometidos a su temperatura crítica máxima independientemente de la temperatura de aclimatación en la que se encontraban obteniendo valores máximos de 809 mmol kg⁻¹ en la presión osmótica de la hemolinfa, se infiere que valores de osmolaridad por encima de este causarán la muerte del organismo probablemente por un desajuste en la concentración de agua y iones a nivel celular.

Según resultados preliminares en la expresión diferencial, se observó la expresión de algunas bandas y la ausencia de otras al comparar condiciones basales con condiciones de estrés. Por lo que es factible detectar estos cambios a nivel genético.

La determinación de parámetros fisiológicos como la preferencia térmica y la tasa metabólica de organismos de alto valor comercial como el camarón blanco es de suma importancia para poder establecer sitios adecuados para reproducción y cultivo que permitan una correcta utilización del recurso.

Referencias

- Altinok, I., Grizzle J.M. 2003. Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish. J. World Aqua. Soc. 34: 113-117.
- Barua, D., Heckathorn, S.A. 2004. Acclimation of the temperature set-points of heat-shock response. J. Therm. Biol. 29: 185-193.
- Beitinger, T.L., Fitzpatrick, L.C. 1979. Physiological and ecological correlates of preferred temperature in fish. Am. Zool. 19: 319-330.
- Beitinger, T.L., Bennett, W.A., McCauley, R.W. 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. Environ. Biol. Fish. 58: 237-275.
- Bowler, K. 1963. A study of factors involved in acclimatization of temperature and death at higher temperatures in *Astacus pallipes*, I: experiments in intact animals. J. Cell. Comp. Physiol. 62: 119-132.
- Bowler, K. 2005. Acclimation, heat shock and hardening. J. Therm. Biol. 30: 125-130.
- Brett, J.R. 1956. Some principles in the thermal requirements of fishes. Quart. Rev. Biol. 31: 75-87.
- Brougher, D.S., Douglass, L.W., Soares J.H. 2005. Comparative oxygen consumption and metabolism of striped bass *Morone saxatilis* and its hybrid *M. chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂. J. World Aqua. Soc. 36: 521-529.
- Bryan, J.D., Kelsch, S.W., Neill, W.H. 1990. The maximum power principle in behavioral thermoregulation by fishes. Trans. Am. Fish. Soc. 119: 611-621.
- Buckley, B.A., Owen, M.E., Hofmann, G.E. 2001. Adjusting the thermostat: the threshold induction temperature for the heat-shock response in intertidal mussels (genus *Mytilus*) changes as a function of thermal history. J. Exp. Biol. 204: 3571-3579.
- Bukau, B., Horwich, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 Review Chaperone Machines. Cell. 92: 351-366.

Cech, J.J. 1990. Respirometry. En: Schreck, C.B. y Moyle, P.B. (eds.). Methods for Fish Biology. Am. Fish. Soc. Bethesda, MD. 335-362.

Chatterjee, N., Pal, A.K., Manush, S.M., Das, T., Mukherjee, S.C. 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of *Labeo rohita* and *Cyprinus carpio* early fingerlings acclimated to three different temperatures. J. Therm. Biol. 29: 265-270.

Chávez-Calvillo, G., Pérez-Rueda, E., Lizama, G., Zuniga-Aguilar, J.J., Gaxiola, G., Cuzon, G., Arena-Ortiz, L. 2010. Differential gene expression in *Litopenaeus vannamei* shrimp in response to diet changes. Aquaculture. 300: 137-141.

Chen, H., Chen, Y. 1999. Temperature preferendum of postlarval black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Mar. Freshwat. Res. 50: 67-70.

Cheng, W., L. Wang y Chen J. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture. 250: 592-601.

Claussen, D.L. 1977. Thermal acclimation in ambystomatid salamanders. Comp. Biochem. Physiol. 58A: 333-340.

Claussen, D.L. 1980. Thermal acclimation in the crayfish *Orconectes rusticus* and *O. virilis*. Comp. Biochem. Physiol. 66A: 377-384.

Cowles, R.B., Bogert, C.M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements a desert reptile. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 83: 265-296.

Cox, D.K., 1974. Effect of three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill. In: Gibbons, J.W., Sharitz, R.R. (Eds.), Thermal Ecology. AEC Symposium Series. Springfield. 150-163 pp.

Criales, M.M., Chung, K.S. 1980. Tolerancia térmica en postlarvas y juveniles del camarón rosado *Penaeus brasiliensis*. Informes Museo del Mar. 27: 1-15.

Currie, S., Moyes, C.D., Tufts, B.L. 2000. The effects of heat-shock and acclimation temperature on Hsp70 and Hsp30 mRNA expression in rainbow trout: in vivo and in vitro comparisons. J. Fish Biol. 56: 398-408.

Das, T., Pal, A.K., Chakraborty, S.K., Manush, S.M., Chatterjee, N., Mukherjee, S.C. 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of Indian Major Carps acclimated to four temperatures. J. Therm. Biol. 29: 157-163.

Das, T., Pal, A.K., Chakraborty, S.K., Manush, S.M., Sahu, N.P., Mukherjee, S.C. 2005. Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of *Labeo rohita* acclimated to four temperatures. J. Therm. Biol. 30: 378-383.

de la Vega, E., Hall, M.R., Degnan, B.M., Wilson, K.J. 2006. Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). Aquaculture. 253: 82-90.

Debnath, D., Pal, A.K., Sahu, N.P., Baruah, K., Yengkopam, S., Das, T., Manush, S.M. 2006. Thermal tolerance and metabolic activity of yellowtail catfish *Pangasius pangasius* (Hamilton) advanced fingerlings with emphasis on their culture potential. Aquaculture. 258: 606-610.

Dent, L., Lutterschmidt, W.I. 2003. Comparative thermal physiology of two sympatric sunfishes (Centrarchidae: Perciformes) with a discussion of microhabitat utilization. J. Therm. Biol. 28: 67-74.

Diana, J.S. 1983. Oxygen consumption by Largemouth bass under constant and fluctuating thermal regimes. Can. J. Zool. 61: 1892-1895.

Díaz, F., Buckle, F. 1993. Thermoregulatory behaviour of *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea, Palaemonidae). Trop. Ecol. 43: 199-203.

Díaz, F., Del Rio-Portilla, M., Sierra, E., Aguilar, M., Re-Araujo, A. 2000. Preferred temperature and critical thermal maxima of red abalone *Haliotis rufescens*. J. Therm. Biol. 25: 257-261.

Díaz F., Espina, S., Rosas, C., Sánchez, A., Venegas, C. 1989. Ritmo respiratorio y amplitud metabólica del camarón café *Penaeus aztecus* (Tamiahua, México) con ablación de los pedúnculos oculares. Rev. Inv. Mar. 10. 1: 27-39.

Díaz, F., Espina, S., Buckle, L.F. 1994. Thermal stress responses of *Procambarus clarkii*. Riv. Ital. Acquacol. 29: 149-154.

Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E., Re, A.D. 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. Mar. Fresh. Behav. Physiol. 34: 93-104.

Díaz, F., Re, A.D., Medina, Z., Re, G., Valdez, G., Valenzuela, F. 2006. Thermal preference and tolerance of green abalone *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845) and pink abalone *Haliotis corrugata* (Gray, 1828). Aquac. Res. 37: 877-884.

Díaz, F., Re, A., González, R., Sánchez, L., Leyva, G. y Valenzuela, F. 2007. Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass. *Aquac. Res.* 38: 1387-1394.

Díaz, F., Re-Araujo, A., Sierra, E., Amador, G. 2004. Behavioral thermoregulation and critical limits applied to the culture of red claw *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Fresh. Cray* 14: 90-98.

Díaz, F., Sierra, E., Buckle, L.F., Garrido, A. 1998. Critical thermal maxima and minima of *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda:Palemonidae). *J. Therm. Biol.* 23: 381-385.

Díaz, F., Sierra, E., Re, A.D., Rodríguez, L. 2002. Behavioural thermoregulation and critical thermal limits of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegman) *J. Therm. Biol.* 27: 423-428.

Dietz, T.J. 1994. Acclimation of the threshold induction temperatures for 70 kDa and 90 kDa heat-shock proteins in the fish *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Biol.* 188: 333-338.

Dietz, T.J., Somero, G.N. 1992. The threshold induction temperature of the 90kDa heat-shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 3389-3393.

Downs, C.A., Fauth, J.E., Woodley, C.M. 2001. Assessing the health of Grass Shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: A molecular biomarker system. *Mar. Biotech.* 3: 380-397.

Espina, S., Díaz Herrera, F., Buckle, R.L.F. 1993. Preferred and avoided temperatures in the crawfish *Procambarus clarkii* (Decapoda, Cambaridae). *Journal of Thermal Biology.* 18: 35-39.

FAO, 1995. Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. 646 pp.

Feder, M.E. 1999. Organismal, ecological and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved issues. *Amer. Zool.* 39: 857-864.

Fraenkel, G.S., Gunn, D.L. 1961. The Orientation of Animals. Kineses, taxes and compass reactions. Dover Publications. New York, USA. 376 pp.

Fry, F.E.J. 1947. Effects of the environment on animal activity. Univ. Toronto Studies, Biol. Ser. 55. Ontario Fish. Res. Lab. Publ. 68: 1-62 p.

Fry, F.E.J. 1977. The effect of environmental factors on the physiology of fish. En W. S. Hoar y D. J. Randall (eds.). Fish physiology VII: environmental relations and behavior. Academic Press. London. 1-87 pp.

Giattina, J.R., Garton, R.R., 1982. Graphical model of thermoregulatory behavior by fishes with a new measure of eurythermality. Can. J. Fish. Aquatic Sci. 39: 524-528.

Hall, M.R., Van Ham, E.H. 1998. The effect of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. J. World Aqua. Soc. 29: 290-299.

Harris, R.R., Andrews, M.B. 2005. Physiological changes in the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L.) escaping and discarded from commercial trawls on the West Coast of Scotland II. Disturbances in haemolymph respiratory gases, tissue metabolites and swimming performance after capture and during recovery. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 320: 195-210.

Hazel, J.R., Prosser, C.L. 1974. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. Physiol. Rev. 54: 620-677.

Heath, N., 1884. Effect of cold on fishes. Bull. US Fish. Comm. 4: 369-371.

Hernández, R.M., Buckle, R.L.F., Díaz, F., 1996. Critical thermal maximum of *Macrobrachium tenellum*. J. Therm. Biol. 21: 139-143.

Hofmann, G.E., Buckley, B.A., Place, S.P., Zippay, M.L. 2002. Molecular chaperones in ectothermic marine animals: biochemical function and gene expression. Integ. and Comp. Biol. 42: 808-814.

Hutchinson, V.H. 1961. Critical thermal maxima in salamanders. Physiol. Zool. 34: 92-125.

Hutchinson, V.H. 1976. Factors influencing thermal tolerances of individual organisms. ERDA (Energy Res. Dev. Adm.) Symp. Ser. CONF750425. 10-26 pp.

Johnson, J.A., Kelsch, S.W. 1998. Effects of evolutionary thermal environment on temperature preference relationships in fishes. Env. Biol. Fish. 53: 447-458.

Kelsch, S.W. 1996. Temperature selection and performance by bluegills: evidence for selection in response to available power. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112: 424-430.

Kelsch, S.W., Neill, W.H. 1990. Temperature preference versus acclimation in fishes: selection for changing metabolic optima. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 601-610.

Kir, M., Kumlu, M., 2008a. Effect of temperature and salinity on low thermal tolerance of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). *Aqua. Res.* 39: 1101-1106.

Kir, M., Kumlu, M., 2008b. Critical thermal minima of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae) acclimated to four temperature levels. *J. World Aqua. Soc.* 39: 535-540.

Kita, J., Tsuchida, S., Setoguma, T. 1996. Temperature preference and tolerance, and oxygen consumption of the marbled rock-fish, *Sebasticus marmoratus*. *Mar. Biol.* 125: 467-471.

Kumlu, M., Turkmen, S., Kumlu, M. 2010. Thermal tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) acclimated to four temperatures. *J. Therm. Biol* 35: 305-308.

Lagerspetz, K., Vainio, L. 2006. Thermal behaviour of crustaceans. *Biol. Rev.* 81: 237-258.

Layne, J.R., Claussen, D.L., Manis, M.L. 1987. Effects of acclimation temperature, season and time of day on the critical thermal maxima and minima of the crayfish *Orconectes rusticus*. *J. Therm. Biol.* 12: 183-187.

Lemos, D., Phan, V.N., Alvarez, G. 2001. Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Perez-Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 261: 55-74.

Le Moullac, G., Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture.* 191: 121-131.

Li, C. y J. Chen. 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 701-709.

- Liang, P., Pardee, A.B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 257: 967-971.
- Liang, P., Pardee, A.B. 2003. Analysing differential gene expression in cancer. *Nature rev. Cancer*. 3: 869-876.
- Lignot, J.H., Cochard, J.C., Soyeux, C., Lemaire, P., Charmantier, G. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 170: 79-92.
- Lowe Jr., C.H., Vance, V.J. 1955. Acclimation of the critical thermal maxima of the reptile *Urosaurus ornatus*. *Science* 122: 73-74.
- Luna-Figueroa, J., Díaz, F., Espina, S. 2003. Preferred temperature of the mexican native cichlid *Cichlasoma istlanum* (Jordan and Snyder, 1899). *Hidrobiol*. 13: 271-275.
- Magnuson, J.J., Crowder, L.B., Medwick, R.A. 1979. Temperature as an ecological resource. *Am. Zool*. 19: 331-343.
- Mair, J.McD., 1980. Salinity and water-type preferences of four species of postlarval shrimp (*Penaeus*) from west México. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 45: 69-82.
- Manush, S.M., Pal, A.K., Chatterjee, N., Das, T., Mukherjee, S.C. 2004. Thermal tolerance and oxygen consumption of *Macrobrachium rosenbergii* acclimated to three temperatures. *J. Therm. Biol*. 29: 15-19.
- Martínez Palacios, C.A., Ross, L., Jimenez Valenzuela, L. 1996. The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *J. Aquacult. Tropics*. 11: 59-65.
- McCauley, R.W., Casselman, J.M. 1981. The final preferendum as an index of optimum growth in fish. *Proceedings of the World Symposium of Aquaculture in heated Effluents and Recirculation Systems* 11: 81-93.
- McLesse, D.W. 1956. Effects of temperature salinity and oxygen on survival of the American lobster. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 13: 247-272.
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, A.I., Tovar-Ramírez, D., Hernandez-Herrera, R., Racotta, I.S. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress.

Aquaculture. 258: 633-640.

Michel, E. H. 2002. Taxonomía, Biología y Zoogeografía de los Peneidos de importancia comercial del Pacífico mexicano". Unidad Academ. Maza. Ins. Cien. Mar y Limno. U.N.A.M. México. 15-34 pp.

Montaño-Pérez, K., Gómez-Gámez, A.I., Vargas-Albores, F. 2005. Different expression of *Litopenaeus vannamei* (Boone) haemocytes to *Vibrio* and abiotic particle inoculation. Aquac. Res. 36: 912-919.

Mora, C., Maya, M.F. 2006. Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. J. Therm. Biol. 31: 337-341.

Mora, C., Ospína, A.F. 2001. Tolerance to high temperatures and potential impact of sea warming on reef fishes of Gorgona Island (tropical eastern Pacific). Mar. Biol. 139: 765-769.

Noga, E.J. 2000. Hemolymph biomarkers of crustacean health. Pages: 125-163 in: Recent advances in marine biotechnology, Vol. 5, edit Fingerman, M. and Nagabhushanam, R., ed., Science publishers, Inc. U.S.A.

Páez, O. F., 2002. "La interacción Camaronicultura medio ambiente". Unidad Academ. Maza., Ins. Cien. Mar y Limno., U. N. A. M. México. 3-14 pp.

Paladino, F.V., Spotila, J.R., Schubauer, J.P., Kowalski, K.T. 1980. The critical thermal maximum: A technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fishes. Rev. Can. Biol. 39: 115-122.

Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. 2003(a). Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. Aquaculture. 218: 637-650.

Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C. 2003(b). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. Mar. Biol. 142: 735-745.

Paterson, B.D., Spanoghe, P.T. 1997. Stress indicators in marine decapod crustaceans, with particular reference to the grading of western rock lobsters (*Panulirus cygnus*) during commercial handling. Mar. Freshwat. Res. 48: 829-834.

Payette, A.L., McGraw, I.J. 2003. Thermoregulatory behavior of the crayfish

Procambarus clarki in a burrow environment. Comp. Biochem. Physiol. 136A: 539-556.

Pérez, E., Díaz, F., Espina, S. 2003. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtensein) (Pisces: Cichlidae). J. Therm. Biol. 28: 531-537.

Pérez, I., Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World, Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Éditions du muséum Paris. 175-233 pp.

Pigliucci, M. 1996. How organisms respond to environmental changes: From phenotypes to molecules (and vice versa). Trends Ecol. Evol. 11: 168-173.

Ponce Palafox, J., Martínez Palacios, C.A., Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei* Boone 1931. Aquaculture. 157: 107-115.

Precht, H. 1973. En: Precht, H., Christophersen, J., Hensel, H., Larcher, W., (Eds.). Temperature and Life. 302-348 pp.

Prosser, C.L., Heath, J.E., 1991. Temperature. In: Prosser, C.L. (Ed.), Environmental and Metabolic Animal Physiology. Wiley-Liss, New York, pp. 109-165.

Racotta, I.S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc. 29: 351-356.

Rahman, M., Corteel, M., Wille, M., Alday-Sanz, M., Pensaert, M., Sorgeloos, P., Nauwynck, H. 2007. The effect of raising water temperature to 33°C in *Penaeus vannamei* juveniles at different stages of infection with white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture. 272: 240-245.

Re, A.D., Díaz, F., Sierra, E., Rodríguez, J., Pérez, E. 2005. Effect of salinity and temperature on thermal tolerance of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus* (Lves) (Crustacea, Penaeidae). J. Therm. Biol. 30: 618-622.

Re, A.D., Díaz, F., Valdez, G. 2006. Effect of salinity on the thermoregulatory behavior of juvenile blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* Stimpson. J. Therm. Biol. 31: 506-513.

Rendón, L., Balcázar, J.L. 2003. Inmunología de camarones: conceptos básicos y recientes avances. *AquaTIC*, 19: 27-33.

Reynolds, W.W., Casterlin, M.E. 1979. Behavioral thermoregulation and the final preferendum paradigm. *Am. Zool.* 19: 211-224.

Roessing, J.M., Woodley, C.M., Cech, J.J., Hansen, L.J. 2004. Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fisheries.* 14: 251-275.

Rosas, C., Cooper, E.L., Pascual, C., Brito, R., Gelabert, R., Moreno, T., Miranda, G., Sánchez, A. 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Mar. Biol.* 145: 401-413.

Rosenberry, R. 1994. World shrimp farming 1993. *Aquaculture Digest*, San Diego, USA. 52 pp.

Salvato, B., Cuomo, V., Di Muro, R., Beltramini, M. 2001. Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four marine invertebrates: a comparative factorial study. *Mar. Biol.* 138: 659-668.

Sanz-Rus, A., Enjuto, C., Morales, A.E., Hidalgo, M.C., García-Gallego, M. 2000. Description of a facility for studying energy metabolism in fish: application to aquaculture. *Aqua. Eng.* 21: 169-180.

Schmidt-Nielsen, K. 1997. *Animal Physiology: Adaptation and environment*. Cambridge University Press. USA. 612 pp.

Selvakumar, S., Geraldine, P. 2005. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: Acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. *Comp. Biochem. Physiol.* 140A: 209-215.

Sokal, R.R., F.J. Rohlf. 1979. *Biometry*. American publisher. 832 pp.

Somboonwiwat, K., Premruethai, S., Rimphanitchayakite, V., Aoki, T., Hirono, I., Tassanakajon, A. 2006. Differentially expressed genes in haemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39: 26-36.

Sorensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. lett.* 6: 1025-1037.

Spoor, W. 1955. Loss and gain of heat-tolerance by the crayfish. *Biol. Bull.* 108: 77-87.

Stern, S., Borut, A., Cohen, D. 1984. The effect of salinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A: 271-274.

Telford, M. 1968. The effects of stress on blood sugar composition of the lobster, *Homarus americanus*. *Can. J. Zool.* 46: 819-826.

Tomanek, L. 2005. Two-dimensional gel analysis of the heat-shock response in marine snails (genus *Tegula*): interspecific variation in protein expression and acclimation ability. *J Exp Biol.* 208: 3133-3143.

Treece, G.D. 2000. Shrimp culture. En: Stickney, R. R. (ed). *Encyclopedia of aquaculture*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 798-868 p.

Tukey. J.W. 1977. *Exploratory data analysis*. Addison-Wesley. Massachussets. 688 p.

Unajak, S., Boonsaeng, V., Jitrapakdee, S. 2006. Isolation ad characterization of cDNA encoding Argonaute, a component of RNA silencing in shrimp (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 145b: 179-187.

Vernberg, F.J. 1983. Respiratory adaptations. *The Biology of Crustacea, environmental adaptations*, vol. 8. Academic Press, New York, 1-44 pp.

Weber, R.E., Spaargaren D.J. 1970. On the influence of temperature on the osmoregulation of *Crangon crangon* and its significance under estuarine conditions. *Neth. J. Sea Res.* 5: 108-120.

Webster, S.G. 1996. Measurement of crustacean hyperglycemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J. Exp. Biol.* 199: 1579-1585.

Wedemeyer, G.R., Meyer, F.P., Smith, L., (Eds.), 1999. *Environmental Stress and Fish Diseases*. Narendra Publishing House, Delhi, India, 107pp.

White, R. 1983. Effects of acute temperature change and acclimation temperature on neuromuscular function and lethality in crayfish. *Physiol. Zool.* 56: 174-194.

Wyban, J., Walsh, W.A., Godin, D.M. 1995. Temperature effects on growth,

feeding rate and feed conversion of the pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture. 138: 267-279.

Yeh, S., Li, C., Tsui, W., Lin, Y., Chen, L. 2010. The protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* that had been immersed in the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* and subjected to combined stresses of *Vibrio alginolyticus* injection and temperature change. Fish Shellfish Immunol. 29: 271-278.

Zar, J.H. 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall. USA. 25-150 p.