

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias de la vida con
Orientación en Biotecnología Marina**

**Termotolerancia y campo de actividad metabólico del botete
diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842) (Teleostei:
Tetraodontidae).**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Ruth Areli García Villarreal

Ensenada, Baja California, México

2016

Tesis defendida por

Ruth Areli García Villarreal

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora del Comité

Dra. Ivone Giffard Mena

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dr. Oscar Sosa Nishizaki



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de tesis que presenta **Ruth Areli García Villarreal** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Termotolerancia y campo de actividad metabólico del botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842) (Teleostei:Tetraodontidae).

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Directora de tesis

Se estudiaron las respuestas fisiológicas y metabólicas en juveniles de botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). Los peces fueron expuestos a diferentes condiciones de temperatura, 75 organismos para la fase experimental, los cuales se encontraban entre 20- 80 g. Se utilizaron las siguientes temperaturas de aclimatación (TA) 20, 23, 26, 29 y 32°C, se inició con la temperatura preferida correspondiente a 26 ± 2 °C (Reyes-Hernández, 2009); y a una salinidad constante de 35 ‰ (ppm); se determinó la temperatura crítica mínima (TCMín). Se midió la Temperatura crítica máxima (TCMáx) al final de la exposición a la TCMáx se tomaron muestras de tejido branquial y músculo para determinar la expresión de las proteínas de choque térmico (“HSP” del inglés, Heat shock proteins) asociadas a las TCMáx. Se diseñaron y seleccionaron los primers (cebadores) de las HSP70 y HSP90. Con los datos obtenidos de TCMáx (95%) y TCMín (105%) y se midieron las TIRASmáx-mín para cada temperatura de aclimatación, donde la temperatura induce la actividad respiratoria. TIASmáx-mín fueron calculadas para obtener la diferencia entre la Tasa metabólica máxima (MMR, Maximum metabolic rate) y la Tasa metabólica estándar (SMR, Standard metabolic rate) por medio del consumo de oxígeno (VO₂).

La ventana térmica obtenida tuvo un área total de 485.74 °C² que corresponde a la zona de tolerancia térmica y nos permitió inferir que *S. annulatus* presenta un alto grado de euritermicidad. El Campo de Actividad Metabólico (CAM) mostró que la MMR asociado a las temperaturas de aclimatación tuvo un máximo que se localiza entre los 23 y 25 °C muy próximo a lo reportado por Reyes *et al*, 2012.

El botete diana, presenta un amplio rango de tolerancia a cambios de temperatura, sin embargo, se pudo observar que el CAM mostró una zona térmica abajo de 26 °C, por lo cual se recomienda mantenerlo a temperaturas por debajo de este valor, con el fin de favorecer las condiciones de cultivo, evitar el estrés térmico, así como disminuir infecciones asociadas a altas temperaturas.

Palabras clave: *S. annulatus*, Temperaturas críticas, Campo de Actividad Metabólico.

Abstract of thesis presented by **Ruth Areli García Villarreal** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Thermotolerance and aerobic scope of puffer fish (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842) (Teleostei:Tetraodontidae).

Abstract approved by:

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Thesis advisor

Physiological and metabolic responses in juvenile bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842) were studied. Fish were exposed to different temperature conditions, 75 organisms for the experimental phase, which were between 20- 80 g wet weight. The following acclimation temperatures (TA) 20, 23, 26, 29 and 32 ° C were used, acclimation was started with the preferred temperature corresponding to 26 ± 2 ° C (Reyes-Hernandez, 2009); and a constant salinity of 35 ‰ (ppt); the minimum critical temperature (TCMin) was determined. The maximum critical temperature (TCMax) was measured at the end of exposure to TCMax gill tissue samples they were taken, and muscle for the expression of heat shock proteins ("HSP" English, Heat shock proteins) associated with TCMax. Primers HSP90 and HSP70 were obtained. With the data obtained from TCMin and TCMax, the oxygen consumption was measured with a TCMax at 95% and TCMin at 105% for each temperature of acclimation to obtain TIRASmax-min (temperature induction to respiratory activity). TIASmax-min was measured to obtain the difference between the maximum metabolic rate (MMR, Maximum metabolic rate) and standard metabolic rate (SMR, Standard metabolic rate) by oxygen consumption (VO₂). Scope of Metabolic Activity or Aerobic Scope (SMA, SA) showed a maximum where MMR associated with acclimation temperatures is located between 23 and 25 ° C very close to those reported by Reyes et al, 2012. The bullseye puffer fish, presents a wide range of tolerance to temperature changes, however, it was observed that the CAM showed a thermal zone lower than of 26 ° C, therefore it is recommended to keep at lower temperatures in order to foster the culture conditions, avoid heat stress as well as reducing infections associated to higher temperatures. The thermal window obtained had a total area of 485.74 ° C² which corresponds to the area of thermal tolerance and allowed us to infer that *S. annulatus* has a high degree of eurythermicity.

Keywords: *S. annulatus*, critical temperatures, Aerobic Scope.

Dedicatoria

A mi familia, mis loquísimos y divertidos hermanos Yola y Robert, a mi Apá, y en especial a mi madre, por demostrarme que a pesar de las caídas y tropiezos nunca hay que rendirse, si no al contrario siempre levantar la mirada. A ellos que a pesar de TODO sé que nunca han dejado de creer en mí. Decir que los AMO se queda corto.

Agradecimientos

Al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo económico otorgado a través del programa de becas de maestría y por financiar los recursos para el desarrollo de mi trabajo experimental.

Al CICESE por solventar parte de mis estudios y por permitirme el libre uso de sus instalaciones y recursos.

A mis profesores del posgrado en ciencias de la vida por los conocimientos compartidos durante todas sus clases.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana Denisse Re Araujo por recibirme como estudiante, por compartir sus conocimientos, por todo su apoyo y su INMENSA paciencia, por repetirme los conceptos una y otra vez hasta que los comprendiera. Muchísimas gracias por sus consejos, comentarios y enseñanzas tanto en lo académico como en lo cotidiano. Por no dejar que me quedara en el camino.

Al Dr. Fernando Díaz Herrera por compartir sus conocimientos con tantísima claridad y por cada uno de sus comentarios que me ayudaron a perderle el miedo a mi tema.

A la Dra. Ivone Giffard Mena por transmitir sus conocimientos con tanta sencillez y su total disposición.

Al Dr. Oscar Sosa Nishizaki por su tacto en las críticas constructivas, aunque no pareciera me marcaron más de lo que imagina (de manera positiva).

Al Ing. Ernesto Lerma y el Sr. Martín Hernández (El Pollo), por su ayuda en la instalación de los sistemas de cultivo y todas esas carcajadas.

A mis compañeros de clases y amigos del laboratorio Zarina (hermana mayor), Ernesto Larios (Ernestito) Rocío, Yulizet, Mariana (Chavik), Daniela Chávez, Leonel Pérez y Laura Camacho. Perdón a los que se me escaparon.

A las servicio social MaJo y Mariana (por su mega apoyo y la platicada).

A los de estancia Rogelio y Paty, por ayudar a cuidar a mis tremendos bebés, jaja.

A Alfredo Salas Garza, gracias por todo el apoyo que me has dado desde que llegué a tu laboratorio como estudiante de licenciatura, no sé qué hubiera sido de mí sin todas esas regañadas y jaladas de oreja que realmente las necesitaba.

A mis viejos y muy queridos amigas de la licenciatura, Ana Liz y Caro.

A la familia Sánchez, en especial a Fernando Martínez (Chepo) y a su mamá Graciela (Doña Chela) quienes me dieron posada durante estos últimos meses, sin su gran apoyo y hospitalidad jamás hubiera podido finalizar este ciclo.

A Christian Domínguez, gracias por dejarme volar a tiempo.

A toda mi familia, en especial a mis hermanos Robert y Yolaisi, a mi Apá Esteban y mi Amá Susy, por no dejar que me rindiera en el camino.

A Dios, Proverbios 2:6.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Generalidades de <i>Sphoeroides annulatus</i>	1
Capítulo 2. Antecedentes	
2.1 Temperatura.....	5
2.2 Temperaturas críticas.....	8
2.3 Ventanas térmicas.....	11
2.4 Campo de actividad metabólico.....	13
2.5 Estudios realizados para <i>S. annulatus</i>	17
2.6 Justificación.....	19
Capítulo 3. Hipótesis	
3.1 Hipótesis.....	20
Capítulo 4. Objetivos	
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos particulares.....	21
Capítulo 5. Materiales y métodos	
5.1 Obtención de los organismos.....	22
5.2 Mantenimiento de los organismos.....	22
5.3 Aclimatación de los organismos a cinco T ^o experimentales.....	24
5.4 Determinación de la temperatura crítica mínima (TCMín).....	24
5.5 Determinación de la Temperatura crítica máxima (TCMáx).....	26
5.6 Elaboración de Ventana térmica.....	27

5.7 Presión osmótica de <i>S. annulatus</i>	28
5.8 Determinación del Campo de Actividad Metabólico.....	29
5.9 Análisis estadístico.....	30
Capítulo 6. Resultados	
6.1 Temperatura crítica mínima (TCMín).	32
6.2 Integración de los datos de TCMín y TCMáy en la ventana térmica.	33
6.3 Presión osmótica en <i>S. annulatus</i>	34
6.4 Campo de actividad metabólico mediciones de consumo de oxígeno en las condiciones TIRAS-máy y TIRAS-mín.....	37
Capítulo 7. Discusión	
7.1 Discusión.....	39
Capítulo 8. Conclusiones	
8.1 Conclusiones.....	47
Capítulo 9. Perspectivas	
9.1 Perspectivas.....	48
Lista de referencias bibliográficas	49
Anexos	61
1. Tratamiento con formaldehído	61
2. Toma de muestra en branquias de <i>S. annulatus</i>	63
3. Metodología para extracción de RNA en <i>Sphoeroides annulatus</i>	64
4. Diseño de Primers para <i>Sphoeroides annulatus</i> (cebadores).....	68
5. Resultados de los primers obtenidos y enviados a secuenciar....	69

Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema representativo de <i>Sphoeroides annulatus</i> (Jenyns, 1842).....	1
2	Distribución geográfica de <i>S. annulatus</i>	2
3	Fotografía de un pez adulto de <i>Sphoeroides annulatus</i>	3
4	Relación entre las zonas de tolerancia y de resistencia de un organismo.....	8
5	Tasa metabólica medida como consumo de oxígeno en un organismo acuático hipotético (botete diana).....	14
6	Gráficos que representan las Tasas metabólicas para la obtención del Campo metabólico.....	14
7	a) Esquema detallado, b) fotografía del Gradiente térmico horizontal.....	25
8	a) Estanque con organismos separados previos al experimento, b) organismos transportados en canastillas a través del gradiente.....	26
9	Acuarios utilizados para la evaluación de las TCMáx.....	27
10	Esquema representativo de respirómetro.....	30
11	Respirómetro y ejemplar de botete diana en cámara respirométrica.....	30
12	Gráfico de resultados obtenidos para temperaturas críticas máximas y temperaturas críticas mínimas por García <i>et al</i> (2015).....	32
13	a) Coloración de organismos previos al experimento b) Cambio de coloración evidente en organismos expuestos a TCMín	33
14	Pérdida de la horizontalidad en organismo expuesto a TCMáx.....	33
15	Ventana térmica de juveniles de <i>S. annulatus</i> (botete diana).....	34
16	Comparación entre los valores obtenidos para la presión osmótica en sangre de <i>S. annulatus</i>	36

17	Valores obtenidos para la SMR y MMR	38
18	Gráfico obtenido para CAM de <i>Sphoeroides annulatus</i>	38
19	Avance de primer cuadro de infección y laceraciones.	61
20	Frotis de branquia de <i>S. annulatus</i> , donde se muestra la infestación por <i>Amyloodinium ocellatum</i>	62
21	Metodología utilizada para extracción de RNA, realizado en tejido de <i>S. annulatus</i>	66
22	Ejemplo de una de las curvas obtenidas con ayuda del NanoDrop, la cual muestra la concentración de RNA en muestra de <i>S. annulatus</i>	66
23	Resultado de la extracción de RNA de branquias, donde se observan las bandas correspondientes a RNAm.....	67
24	Resultado después de recibir el tratamiento con DNAsa, donde se observan las bandas correspondientes a RNAm en branquias de <i>S. annulatus</i>	67
25	a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer PFSaHSP90.....	69
26	a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 SaF.....	70
27	a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 Reverse1.....	70
28	a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 Reverse2.....	71
29	a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 Reverse3.....	71
30	a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 Reverse4.....	72
31	Resultados del PCR con los primers para HSPs en <i>S. annulatus</i> ..	72

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Comparación de las presiones osmóticas de la sangre medidas en los organismos en las las TA.....	35
2	Valores obtenidos para la presión osmótica en sangre de <i>S. annulatus</i>	36
3	Datos de las TCMáx y TCMín para obtener las temperaturas correspondientes a las TIASMáx y TIASMín.....	37
4	Distribución de organismos experimentales por TA y prueba realizada	64

Capítulo 1. Introducción

1.1 Generalidades de *Sphoeroides annulatus*.

Sphoeroides annulatus es un pez marino que se distribuye desde San Diego, California, hasta Perú, encontrándose en lagunas, estuarios y bahías. Habita principalmente en aguas tropicales y subtropicales, entre 20 y 40 metros de profundidad, aunque prefiere fondos arenosos poco profundos, es considerada una especie con hábitos demersales, es decir, que prefiere el fondo marino. *S. annulatus*, el cual también se encuentra citado en la literatura con una variedad de nombres comunes como: pez globo, pez tamborero, tamborete, botete tamborín, tamboril anillado, entre otros, siendo botete diana uno de los más comunes en español, y para el inglés “bullseye puffer fish” y “gulf puffer” (Thomson, Findley y Kerstitch, 2000; García, Hernández, Abdo de la Parra y González, 2002; Arias-Rodríguez y Del Valle Pignataro, 2008).

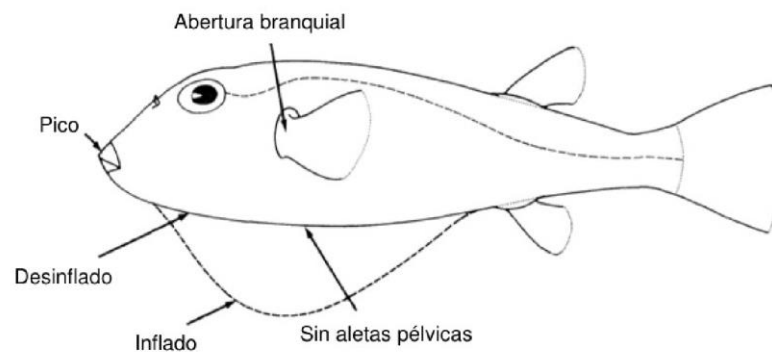


Figura 1. Esquema representativo de *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). (Recuperado de FAO 1995).

Su nombre, descrito por Jenyns (1842), proviene de la característica que presenta en su cuerpo, ya que tiene manchas ordenadas a manera de anillos o líneas circulares (ovoides) que le dan forma a una diana (*bullseye*), las cuales tienden a oscurecerse en organismos adultos. A su vez, botete (*puffer*), por la capacidad que presenta de aumentar su tamaño (inflar su cuerpo) como mecanismo de defensa ante situaciones de peligro. Según la descripción original de Jenyns, *S. annulatus* presenta una longitud de hasta 38 cm (siendo más común las tallas aproximadas a 20 cm), es elongado con cuerpo

robusto en forma cilíndrica, cabeza grande y aplanada, con piel lisa y suave sin escamas; lo cual permite que sea capaz de inflarse, no presenta aleta pélvica, presenta una boca formada por un par de mandíbulas fuertes que están constituidas por dos pares de dientes muy prominentes, característica que incluso da el nombre a la familia (Thomson *et al* 2000; Miller, Minckley & Norris, 2005).

En cuanto a su clasificación: es un Teleósteo de la clase Actinopterygii, perteneciente a la Familia Tetraodontidae, los cuales son generalmente conocidos como peces globo, la familia comprende 19 géneros con alrededor de 121 especies, que se encuentran generalmente en áreas tropicales y subtropicales del océano Atlántico, Índico y Pacífico (Nelson, 1984; Thomson *et al.*, 2000).

S. annulatus se puede encontrar en aguas tropicales y subtropicales. Los rangos de distribución en cuanto a temperaturas, como se observa en la figura 2, va desde norte templado en San Diego California y Baja California México (incluyendo el norte del golfo de California también llamado mar de Cortés), a través del norte subtropical, desde México hasta Nicaragua (incluyendo Islas de Revillagigedo), Ecuatorial desde Costa Rica hasta Ecuador (incluyendo Isla Galápagos, Clipperton, Cocos, Malpelo), hasta el sur templado en la Provincia de Perú (Thomson *et al.*, 2000; García *et al.*, 2002).



Figura 2. Distribución geográfica de *S. annulatus*. (Recuperado de <http://www.discoverlife.org/>).

Es posible encontrarlo en diferentes hábitats, dependiendo de su estadio: a los juveniles es común encontrarlos en zonas de estuarios, lagunas costeras, manglares y en áreas cercanas a desembocaduras de ríos, razón por lo que se le considera una especie eurihalina en sus primeras etapas. La presión osmótica en teleósteos marinos es sólo del 30% o el 50% de la del agua de mar. Los peces teleósteos marinos son muy hipoosmóticos en relación con el agua de mar. Por lo cual son considerados reguladores hipoosmóticos, ya que la presión osmótica sanguínea es muy inferior a la del agua en que viven. La presión osmótica de los peces teleósteos marinos en general oscila entre 300 a 500 mOsm; considerándose la presión osmótica media en 400 mOsm, siendo la presión osmótica del agua de mar cerca de 1000 mOsm, dando como diferencia entre la presión osmótica de la sangre y la del agua marina aproximadamente 600 mOsm (Hill, Wyse & Anderson, 2006).

Se considera que el botete diana es altamente tolerable a distintas salinidades, por lo cual puede ser encontrado en estuarios e incluso en zonas de agua dulce (Reyes-Hernández 2009; Pérez, Re, Giffard y Díaz, 2012; Pérez-Robles, 2015; 2016). A los adultos es común encontrarlos en áreas de arrecifes de coral, fondos arenosos y a lo largo de la interface arena-roca (Thomson *et al*, 2000).



Figura 3. Fotografía de un pez adulto de *Sphoeroides annulatus*.

Dentro de sus hábitos alimenticios en estado silvestre se ha encontrado que su dieta es a base de crustáceos bentónicos móviles (camarones y cangrejos), gasterópodos, bivalvos, pulpos, calamares y sepias, aunque también se ha considerado que tiene

hábitos como forrajeador de plantas acuáticas y detritos. Estudios en la especie *Spherooides sp.* (García-Ortega, 2007) consideran que pueden ser importantes para el control de moluscos y crustáceos.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Temperatura

La vida animal se limita a un estrecho rango de temperaturas, que va desde pocos grados antes del punto de congelación del agua pura (0 °C) hasta aproximadamente + 50 °C. Refiriéndose a la temperatura del organismo, no de sus alrededores. Como ya se mencionó el rango de temperaturas para la vida animal es muy estrecha comparada con la cósmica, pero a pesar de eso, la adecuada la podemos encontrar a lo largo de los océanos. En regiones polares numerosos peces e invertebrados viven en aguas a -1.8 °C. En el otro extremo, en puntos calientes, unos cuantos animales pueden vivir en alrededor de 50 °C.

La importancia de la temperatura radica en que es considerada uno de los factores (parámetros) ambientales más importantes cuando de manejo de organismos se trata, ya que controlarla tiene una importancia vital. Esta no solo afecta el comportamiento de los organismos, sino que tiene implicaciones en su fisiología e incluso su distribución geográfica (Schmidt-Nielsen, 2007).

Para poder sobrevivir en un hábitat tan particular como los son los océanos, todos los organismos marinos como los peces se han visto en la necesidad de adaptarse a la par de los cambios de su entorno. Existen muchos tipos de factores que afectan a los organismos, tanto físicos como químicos, bióticos y abióticos.

Dentro de los diversos factores físicos que afectan el medio ambiente acuático, la temperatura presenta una importancia imprescindible y es considerado como el 'factor abiótico maestro' para peces (Brett, 1971).

El interés del efecto de las temperaturas en la fisiología de peces se ha venido estudiando durante más de 120 años (Eme & Bennett ,2009). Esto se debe a la profunda influencia que la temperatura tiene en los organismos vivos y sus procesos metabólicos. Existe una vasta literatura sobre su importancia en la vida de los peces. Y aunque los primeros

estudios en peces data de 1800, el conocimiento sobre el rol de la temperatura en peces se atribuye principalmente al investigador F.E.J. Fry conocido como 'el padre de la fisiología ambiental en peces', así como a sus estudiantes de la Universidad de Toronto, donde se incluye a J.R. Brett quien en 1956 desarrolló el paradigma de la primicia térmica el cual menciona lo siguiente: “debido a la naturaleza omnipresente de la temperatura ambiental, el requisito fundamental térmico de los peces es un entorno externo más adecuado a su temperatura interna” (Beitinger, Bennett & McCauley, 2000).

Lo anterior se relaciona directamente con la característica que presentan los peces en cuanto a su temperatura corporal, ya que son ectotermos. Los poiquilotermos, también denominados ectotermos [Gr. ecto, fuera + therme, calor], son animales que poseen una temperatura corporal (T_b) determinada por el equilibrio logrado con las condiciones térmicas del exterior, es decir, cuya temperatura es controlada, principalmente, por un fuente externa de calor y su capacidad de generar calor metabólico es insignificante. Con frecuencia estos animales termorregulan. Su mecanismo de termorregulación es conductual; un poiquilotermino controla su T_b mediante el traslado de su cuerpo hacia ambientes que permiten que la T_b se mantenga en un nivel deseable. La temperatura corporal (T_b , body temperature) es quizá la variable ecofisiológica más importante que afecta el desempeño de los ectotermos. Casi todos los aspectos del comportamiento y la fisiología en ectotermos es sensible a la T_b . Actualmente se utiliza el término termoconformador para designar a estos organismos (Curtis, Barnes, Schnek & Massarini, 2008; Hill et al., 2006; Díaz, Salas, Re, González, & Reyes, 2011).

Al ser la temperatura un factor clave en la ecología de poiquilotermos los cambios drásticos de la T° del agua que los circunda influyen directamente en sus procesos metabólicos, comportamiento, migración, crecimiento, reproducción y supervivencia (Pörtner, 2001). Los cambios en la temperatura ambiental estimulan a los animales ectotérmicos a mostrar respuestas compensatorias, tanto fisiológicas como conductuales, con lo cual pueden aminorar los efectos de la temperatura sobre el metabolismo (Hazel & Prosser, 1974).

Existen muchos mecanismos y procesos fisiológicos de comportamiento que los organismos acuáticos han desarrollado para soportar los cambios relacionados con la

temperatura manteniendo así sus funciones vitales estables, esto para que no sean totalmente dependientes de los cambios en la temperatura, este mecanismo se conoce como termorregulación (Reyes-Hernández, 2009). El comportamiento termorregulatorio es utilizado por los poiquilotermos para reducir el impacto de la variación temporal y espacial de la temperatura ambiental de la T_b .

La temperatura ejerce gran influencia en muchos de los procesos individuales en que intervienen el agua y las sales, como son las tasas de difusión y ósmosis, índices de transporte activo, coeficientes de producción de orina y permeabilidad de membranas, entre otros. Por lo tanto es de esperar que la temperatura también afecte la regulación de la composición de los líquidos corporales. Así que no sorprende observar variaciones de la presión osmótica total y de la concentración de ciertos iones conforme existen variaciones de temperatura. Se ha encontrado que para algunas especies el margen de la tolerancia a la salinidad varía con la temperatura, e incluso hay ocasiones en que causan un colapso potencialmente letal, en cuanto a la regulación osmótica-iónica (osmorregulación). En estudios han encontrado que la concentración de sodio en los líquidos corporales disminuye cuando la temperatura desciende. La disminución de la concentración sanguínea con la temperatura ha sido estudiado en organismos como el cangrejo de río *Astacus*, *Carassius auratus L* y la trucha *Salmo trutta*, lo anterior es causado posiblemente por un descenso de la absorción activa de iones. Poco se conoce sobre estos efectos. Sin embargo, se sabe que si existe una correlación del margen de la tolerancia a la salinidad con la temperatura (Hill et al, 2006).

Existen muchos factores que limitan o favorecen el crecimiento de los organismos que son mantenidos en cultivo, dentro de los cuales se incluyen salinidad, densidad de cultivo, la alimentación y la temperatura, entre otros. Dentro de estos factores, la temperatura se considera como decisiva, ya que, como ya se mencionó afecta directamente en los procesos fisiológicos. Para el caso de organismos que serán mantenidos en condiciones de laboratorio, controlar el parámetro temperatura es esencial, ya que no conocer las implicaciones que conlleva el llevar a cabo alguna modificación o no mantener al pez en la temperatura preferencial, puede tener como consecuencia la pérdida del organismo.

2.2 Temperaturas críticas.

Fry (1947) describe detalladamente los conceptos relacionados con la termotolerancia. Desde entonces las respuestas a la temperatura por los peces se han dividido en tolerancia, resistencia y preferencia. Con el fin de definir las zonas de tolerancia y resistencia, se han realizado gráficos de temperaturas letales incipientes (límite de tolerancia) y temperaturas a las cuales la muerte es rápida (límite de resistencia) ambos se hacen frente a la temperatura de aclimatación. Las temperaturas letales incipientes superior e inferior (upper and lower incipient lethal temperatures UILT y LILT) representan las temperaturas a las que, en teoría, 50% de la población podrían sobrevivir indefinidamente. Fuera de las temperaturas de tolerancia se encuentra la zona de resistencia, dentro de la cual existe una fuerte interacción entre la temperatura y el tiempo de exposición. El límite superior de la zona de resistencia está representada por la temperatura crítica máxima (CTM), que es una medida de la resistencia térmica determinada mediante el aumento de la temperatura del agua a una velocidad de $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta que el pez pierde el equilibrio. Los tiempos de supervivencia por encima de CTM son prácticamente cero. El UILT, LILT y la CTM dependen de la temperatura de aclimatación y la historia térmica previa de los peces (Jobling, 1981).

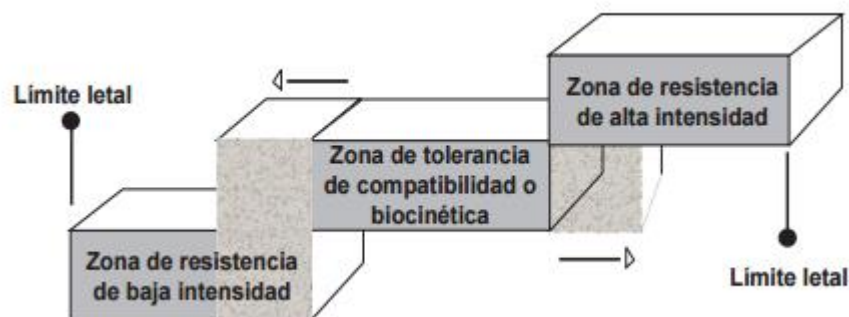


Figura 4. Relación entre las zonas de tolerancia y de resistencia de un organismo. Las flechas indican el aumento de los límites de tolerancia del organismo como consecuencia de la aclimatación al factor. (Tomado de: Espina y Vanegas, 2005).

En cuanto a temperatura se han manejado dos criterios principalmente. Los cuales son los estudios a corto plazo o agudos y a largo plazo o crónicos. Dentro de la zona de tolerancia térmica de los peces, cuando se les da la opción, pasarán la mayor parte del

tiempo dentro de las aguas de una cierta temperatura y estas temperaturas preferidas dependen también de la aclimatación térmica previa y se conoce como Preferéndum térmico agudo. El Preferéndum térmico agudo se determina, por lo general, durante un período corto, pero si los peces se dejan expuestos a un gradiente de temperatura durante un período más largo, gravitarán gradualmente hacia una temperatura característica determinada para la especie y se conoce como Preferéndum térmico final.

Los análisis basados en el corto plazo nos dan información en cuanto a la letalidad en relación a la proporción de estrés suministrado; aquellas pruebas de largo plazo ayudan a medir las respuestas, como la sobrevivencia, campo de crecimiento y el éxito reproductivo, así como la tolerancia al estrés, ya que una exposición al estrés mayor a la tolerada produce cambios irreversibles de las funciones vitales de un organismo llevando a una inminente muerte en caso de ser expuestos más del tiempo que el organismo puede soportar terminan siendo índices letales (Espina y Vanegas, 2005).

Si se toma en cuenta el rango de tolerancia del organismo se forma una especie de gradiente del complejo ambiental en el que el organismo es capaz de vivir de manera indefinida a lo largo del gradiente, pero fuera de este, es decir, hacia ambos extremos, les es posible sobrevivir pero solo por un lapso determinado. A esta zona del gradiente se le denomina zona de tolerancia, de compatibilidad o de capacidad de adaptación; a las porciones extremas del gradiente se les conoce como zona de resistencia o letales, y las cuales se han venido analizando con ayuda de las $TCM_{\text{máx}}$ y $TCM_{\text{mín}}$ (Espina y Vanegas, 2005).

Dentro de la zona de resistencia, se presentan por una parte la zona de tolerancia, y por otra los límites letales tanto superior como inferior, donde es posible encontrar a las temperaturas críticas máximas ($TCM_{\text{máx}}$) y mínimas ($TCM_{\text{mín}}$) las cuales marcan el límite entre las zonas de resistencia y las zonas letales. Dependiendo de la intensidad del factor puede llevar incluso a la muerte del organismo.

La TCM_{áx} y TCM_{ín} se definen como las temperaturas a las cuales la actividad locomotora se desorganiza y el animal pierde la capacidad para escapar de la condición que de mantenerse, finalmente provocará la muerte (Cowles & Bogert, 1944).

La determinación de las temperaturas críticas, constituye una herramienta útil para los estudios ecofisiológicos de adaptación y de estrés. Existe una variedad de factores que influyen en las temperaturas críticas de los animales, como son el estado fisiológico y la edad de los organismos; las estaciones del año, la salinidad del medio, así como la historia térmica previa de los organismos. Estos factores alteran la tolerancia a la temperatura de los especímenes (Wiesepape, Aldrich & Strawn, 1972; Burton, Capizzi, Margrey & Wakefield, 1981; Buchanan, Steward & Davies, 1988). Paladino y colaboradores (1980) señalan que pueden ser un buen indicador de la capacidad que presentan los organismos para aclimatarse a la temperatura, y a su vez de la acción sinérgica de los estresores en el ambiente (Paladino, Spotila, Schubauer & Kowalski, 1980).

En estos intervalos, la temperatura impone límites a la tasa metabólica, y aquí es donde los organismos consiguen ejercer sus funciones eficientemente. En estudios de juveniles de *Metapenaeus bennettiae* se comprobó que la aclimatación a las temperaturas altas o bajas aumentó el límite letal superior y disminuyó el límite letal inferior (Aziz & Greenwood, 1981).

Es importante no confundir la aclimatación que es a corto plazo e inducida en el laboratorio al variar uno o más factores particulares del medio. Mientras que la aclimatización puede ocurrir en el lapso de la vida del organismo en el medio natural, donde muchos factores actúan al unísono (Bowler, 1963; Newell, 1978; Prossel, 1991). El efecto de la aclimatación térmica sobre las temperaturas críticas y las respuestas al estrés térmico se ha comprobado también en los juveniles del camarón *Penaeus aztecus* (Vanegas, 1988; Vanegas, Espina y Sánchez, 1990) y en *Procambarus clarkii* (Díaz, Espina & Bückle, 1994). Aunque diferencias en las metodologías experimentales se pueden traducir en variación de los resultados, esto es, obtención de valores más altos o más bajos de las temperaturas críticas (Becker & Genoway, 1979; Cox & Beauchamp, 1982).

2.3 Ventanas térmicas

Junto con los estudios de fisiología en peces se iniciaron los estudios relacionados con la tolerancia térmica, existe información que data de hace más de 120 años (Beitinger et al., 2000). Y aunque los primeros estudios se enfocaron solo en medir la tolerancia de puntos finales, generalmente sin información del historial de aclimatación previa (Heath, 1884; Carter, 1887; Eme & Bennett, 2009).

Años después se enfatiza la importancia de la historia de aclimatación, esto por Fry y colegas en 1940, quienes empezaron usando valores bajos y altos de tolerancia, esto para crear el primer polígono de tolerancia térmica; estos se describen como representaciones gráficas que definen el nicho térmico en peces.

En 1942, Fry, Brett y Clawson construyeron los primeros polígonos utilizando la técnica de Temperatura Letal Incipiente (de las siglas en inglés, ILT), en sus experimentos los grupos de peces eran sumergidos en series de altas y bajas temperaturas, hasta poder determinar la temperatura letal del 50 % de la población (descripción completa en Fry, 1967). Este tipo de polígonos no se siguieron utilizando desde principios de los 50s, ya que eran bastante pesados y requerían de un gran número de organismos y equipo.

La Metodología de temperatura crítica (CTM) vino a reemplazar ampliamente a la técnica ILT como un medio para determinar la tolerancia térmica (Lutterschmidt & Hutchinson, 1997; Beitinger et. al., 2000). A diferencia con la ILT la CTM requiere relativamente menos peces, menos equipo y proporciona una rápida valoración de la tolerancia térmica, además de ser no letal (Fry, 1967; Beitinger et al., 2000; Noyola, Caamal-Monsreal, Díaz, Re, Sánchez & Rosas, 2013).

Fue hasta 1997 que Bennett y Beitinger construyeron el primer polígono-CTM, utilizando los valores de tolerancia térmica (CTM). Para esas fechas de los ~ 25 (aprox.) polígonos de peces completos, solo cinco eran basados en el CTM (Eme & Bennett, 2009).

Gracias al uso de los polígonos de tolerancia térmica se ha podido describir la habilidad

de los peces a tolerar rangos particulares de temperatura, aplicando tanto para organismos euritermos como estenotermos, aunque los peces euritermos presentarán polígonos de tolerancia térmica amplios, siendo lo contrario para peces estenotermos, los cuales tendrán polígonos de tolerancia térmica relativamente pequeños. Dichos polígonos despliegan tanto el máximo como el mínimo de temperaturas extremas que toleran, así como los efectos térmicos de aclimatación de estas temperaturas, está limitado a temperaturas altas y bajas por las temperaturas máximas y mínimas que pueden ser toleradas por periodos relativamente largos, por lo tanto un polígono de tolerancia térmica es una caracterización completa de la zona de tolerancia de un organismo, y el área encerrada dentro del polígono es una medida que representa el grado de euritermicidad de las especies, en ecología este término se maneja como la capacidad de soportar considerables variaciones de temperatura. Un polígono de tolerancia térmica resume el máximo y el mínimo de temperaturas que las especies pueden tolerar por periodos de tiempo relativamente cortos (Evans, 2006).

Los polígonos de tolerancia térmica son útiles debido a su habilidad para proveer mucha más información que los polígonos de tolerancia de puntos finales por sí solos. El área total de los polígonos (reportados como °C²) nos presenta un índice comparativo útil y conveniente sobre la euritermicidad entre especies. Dentro de los atributos de los polígonos de tolerancia térmica se encuentran; identificar las tácticas de supervivencia relacionados con la temperatura, predecir la propagación de especies exóticas, cuantificar los nichos térmicos de especies en peligro, y determinar las condiciones óptimas de cultivo. Dando una importante percepción sobre la ecología de los peces, así como su distribución. Adicionalmente, estos definen zonas de tolerancia intrínsecas, esto es, tolerancia independiente al historial de aclimatación térmica previa; al igual que las zonas de tolerancia adquiridas (altas y bajas); tolerancia térmica obtenida a través de aclimatación. Dichas zonas muestran la relación existente entre la estrategia térmica de aclimatación y el régimen térmico, esto es, historia de vida o el medio ambiente de los peces.

2.4 Campo de actividad metabólico (CAM)

CAM son las siglas para Campo de Actividad Metabólico o Campo Metabólico, mientras que en inglés se maneja como Aerobic Scope (AS) o AMS (Aerobic Metabolic Scope) (Farrell, 2016; Claireaux & Chabot, 2016; Jørgensen, Enberg & Mangel, 2016; Chabot, Steffensen & Farrell, 2016)

Para llevar a cabo la comprensión de este novedoso tema es necesario tener varios conceptos esclarecidos, como lo es, el metabolismo; el cual proviene del griego *metabole*=cambio, y se refiere a todos los procesos físicos y químicos que tienen lugar dentro de una célula o de un organismo y que incluyen los procesos de síntesis y degradación de energía. A su vez integra todos los procesos bioquímicos que permite la homeostasis para el organismo, manteniendo así el flujo anabólico y catabólico, en conclusión, son el conjunto de transformaciones por el cual las células y los organismos adquieren, reorganizan y anulan los productos básicos en formas que sustentan la vida (Hill et al., 2006; Curtis et al., 2008; Elsas II, 2011).

El metabolismo basal, el cual, es la cantidad mínima de energía necesaria para mantener las funciones vitales de las células, esto es, el gasto energético de un organismo en reposo. Esta energía mínima es utilizada por la célula en las reacciones químicas intracelulares necesarias para la realización de funciones metabólicas esenciales, como es el caso de respiración, circulación sanguínea, regulación de la temperatura corporal, contracción muscular, digestión de alimentos y nutrientes, eliminación de los desechos a través de la orina y de las heces, funcionamiento del cerebro y los nervios. Para conocer los consumos de energía de un animal se utiliza la Tasa metabólica, la cual nos ayuda a conocer la velocidad a la que se convierte la energía de enlaces químicos en calor y trabajo externo, en poiquilotermos se conoce como Tasa metabólica estándar (Fanjul e Hiriart, 1998; Hill et al., 2006; Curtis, et al., 2008). La tasa metabólica es ampliamente medida en animales, la cual es variable y puede ser influenciada por factores tanto endógenos como aspectos fisiológicos, masa corporal y exógenos como disponibilidad de oxígeno y la temperatura (Chabot, Steffensen, and Farrell, 2016).

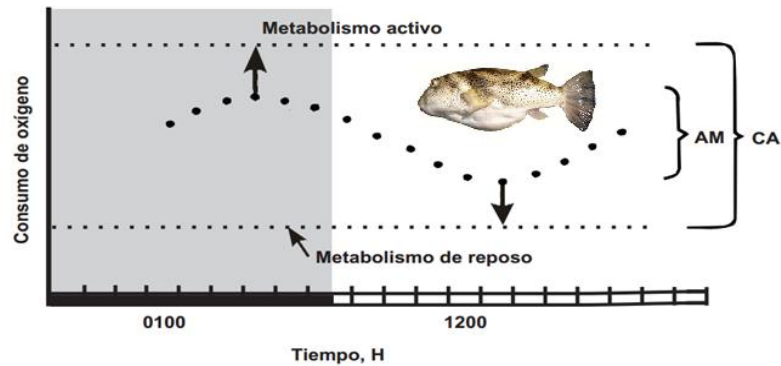


Figura 5. Tasa metabólica medida como consumo de oxígeno en un organismo acuático hipotético (botete diana). Mantenido en ayunas por 24 h, si la tasa se hubiese medido en animales alimentados con actividad máxima o en inanición y en reposo, la curva se habría desplazado como se indica en el esquema. AM= amplitud metabólica de rutina; CA= campo de actividad. (Tomado y modificado de: Espina y Vanegas, 2005).

La tasa metabólica estándar (SMR) y la tasa metabólica máxima (MMR) son dos variables fisiológicas fundamentales que proporcionan el suelo (parte inferior) y el techo (parte superior) en el metabolismo energético aeróbico. La cantidad total de energía disponible entre estas dos variables constituye el Campo del metabolismo aeróbico (AMS), tal y como se observa en el gráfico del extremo izquierdo de la figura 6.

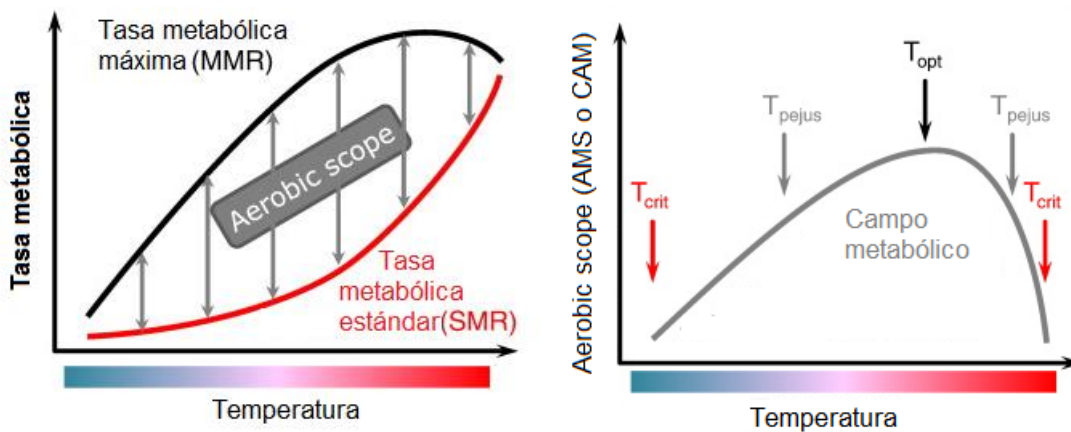


Figura 6. Gráficos que representan las Tasas metabólicas (extremo izquierdo) para la obtención del Campo metabólico (extremo derecho). Tomado y modificado de Verberk et al., 2016.

La SMR se define como la tasa metabólica en reposo, esto es el mantenimiento mínimo de un organismo, no sometido a esfuerzo, aclimatado a las condiciones experimentales, esto es por debajo del cual las funciones fisiológicas se ven alteradas (Fry, 1971; Chabot

et al, 2016). Por lo tanto, la SMR representa el coste de vida básico (basal) y es de gran importancia funcional. Por ejemplo, la teoría de la historia de vida postula que la energía adquirida se asigna entre las funciones como el crecimiento, la reproducción y la auto-mantenimiento (por ejemplo la SMR). En el otro extremo de la escala metabólica, la MMR proporciona el límite superior para el metabolismo de energía aeróbica (Norin & Clark, 2016). La MMR se mide convencionalmente en el punto de agotamiento. Un término similar es la tasa metabólica activa (AMR), que se mide usando respirometría de natación y refleja la tasa metabólica en la velocidad de nado máxima sostenible (Brett, 1964; Schurmann and Steffensen, 1997; Svendsen et al, 2016).

La diferencia que se obtiene entre la MMR y la SMR proporciona una medida del AMS, el cual representa el Campo de actividad metabólico que es la cantidad total de energía aeróbica a disposición del animal para procesos que requieren energía incluyendo la digestión, la locomoción, el crecimiento y la reproducción (Rosewarne, Wilson and Svendsen, 2016).

Actualmente también es posible encontrarlo como Campo aeróbico absoluto (AAS). Si se considera dentro de un rango de temperaturas de aclimatación, la curva resultante de AAS ofrece una descripción clara, definitiva y cuantitativa de la capacidad aeróbica y se ha denominado la curva del campo aeróbico de Fry en su honor. La medición del metabolismo aeróbico de un animal *in vivo* se hace generalmente de forma indirecta a través del consumo de oxígeno (VO_2), ya que este se encuentra íntimamente asociado con el trabajo y el flujo de energía metabólica que el organismo puede utilizar para el control de mecanismos homeostáticos. La medición del consumo de oxígeno es considerado como una herramienta que nos ayuda a conocer de una manera más directa la interacción entre un animal y el medio adyacente (Noyola et al 2013; Rosewarne, et al., 2016; Farrell, 2016).

En síntesis, el modelo del campo aeróbico de Fry expresa gráficamente la dependencia térmica y la capacidad aeróbica absoluta para llevar a cabo actividades (tales como el movimiento, la alimentación, crecimiento y reproducción). Además, la curva del campo aeróbico de Fry muestra la temperatura cuando el Campo de Actividad Aeróbica (AAS) alcanza un valor pico (denominada la temperatura óptima, T_{opt}), que representa la temperatura en la que un pez tiene su capacidad aeróbica máxima para llevar a cabo

actividades. Lo referente a el estudio de la temperatura y la relación que tiene con la influencia que presenta en el metabolismo animal tiene una larga historia, así como la utilización del AAS para hacer predicciones generales acerca de la capacidad que presentan los peces para llevar a cabo actividades con respecto a la temperatura del medio ambiente (Fry, 1947; Brett, 1971; Claireaux y Lefrançois, 2007; Farrell et al., 2008; Elliott and Elliott, 2010). Fry en 1971 también estableció el paradigma de que otros factores ambientales a parte de la temperatura pueden aumentar ya sea SMR de un pez o reducir su MMR (el límite). A la fecha el paradigma general de Fry (1971) no ha cambiado, solo algunos detalles (Fry, 1971; Farrell ,2016).

Norin y Clark, (2016) realizaron una descripción detallada de los métodos para determinar la Tasa metabólica máxima en peces (MMR, Maximum metabolic rate) y sugieren que también estos métodos deben de ser considerados para aplicarse en otros ectotermos acuáticos. La COST (European Cooperation in Science and Technology, 2016) y con ayuda de ecofisiólogos expertos en el área crearon un documento conocido como SI (special issue), en el cual se hacen revisiones y recomendaciones de las características que deben de tener los diferentes métodos y protocolos, así como nuevas técnicas apropiadas para medir y calcular las tasas metabólicas. En el documento que consta de 13 artículos científicos donde se mencionan las instrucciones para usar y diseñar protocolos y equipamiento apropiado para medir las rasgos metabólicos con precisión y de manera confiable en peces de laboratorio.

Por otra parte en el continente americano en la primera reunión de la Red de colaboración Internacional TEMPOXMAR 2014, se presentaron como resultados dentro de los proyectos expuestos una serie de modelos que cubre los diversos aspectos de la vida marina y los posibles efectos que la temperatura y el oxígeno disuelto tienen en especies que se distribuyen desde Chile hasta México. En dicha reunión se reconocieron los modelos en los cuales se han basado y que explican las respuestas fisiológicas de los organismos marinos, sin embargo sale a relucir la importancia que tienen el efecto del tiempo de exposición, así como el origen de los organismos. Ya que los modelos en los que se han basado han utilizado especies de ambientes principalmente polares. Por lo cual se sugiere proponer modelos complementarios que incluyan las adaptaciones que muestran las especies tropicales.

Dentro de los modelos propuestos sale a relucir los procedimientos utilizados en este estudio el cual es basado en el método propuesto por Paschke et al., (2014), donde se incluyen nuevos términos como TIAS del inglés “Temperature Induction Activity Scope” que significa Tasa de Incremento de Actividad inducido por la Temperatura y TIRA (Temperature Induced Respiratory Activity) aún más reciente, y que se traduce como actividad respiratoria inducida por temperatura. Los cuales siguen teniendo modificaciones conforme el método se ha ido afinando.

2.5 Estudios realizados para *S. annulatus*.

Para botete diana de los estudios realizados, destacan sobre todo los relacionados con fisiología, toxicidad, parasitología, cultivo, reproducción y crecimiento (García-Ortega, 2007; Sánchez-Cárdenas, 2007; Chávez, Álvarez, Abdo de la Parra y García, 2008; García, Ibarra, Abdo de la Parra, Rodríguez y Velasco, (2008); Reyes *et al.*, 2012; Núñez *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2012; Abdo de la Parra, Rodríguez, García, Velasco e Ibarra, 2013), en menor cantidad también existe información relacionada a alimentación (García *et al.*, 2002; García-Ortega, 2009).

Sin embargo en cuanto a tolerancia térmica se refiere, son contados los estudios que se encuentran para la especie en cuestión. Reyes-Hernández en 2009 realizó un estudio de termotolerancia, en el cual se evaluó la temperatura preferida (TP), la temperatura óptima de crecimiento (TOC), la Temperatura crítica máxima (TCM_{áx}) y el consumo de oxígeno (VO₂) asociado a diferentes temperaturas de aclimatación. En dicho estudio fueron probadas cinco temperaturas de aclimatación (19, 22, 25, 28 y 31 °C), logrando encontrar que la temperatura preferida es de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Con la medición de la Temperatura crítica máxima (TCM), se determinaron las temperaturas de evitación y la tasa de consumo de oxígeno (TCO).

Pérez-Robles (2010) realizó un estudio donde se evaluó el efecto de la salinidad sobre el consumo de oxígeno, la excreción nitrogenada, así como también la osmorregulación del botete diana. En dichos análisis se utilizaron seis salinidades (10, 17, 23, 29, 35 y 41 ppm) en relación a la TCO, la tasa de excreción de amonio (TEA) y la relación atómica

oxígeno-nitrógeno (O: N).

Así mismo Pérez-Robles y colaboradores en 2015 analizaron los efectos de la salinidad en la supervivencia, crecimiento y en la capacidad osmorreguladora (osmoregulatory capacity, OC) en larvas de botete diana (*Sphoeroides annulatus*). Su trabajo se dividió en dos experimentos en el primero compararon el crecimiento de la larva mantenida a una temperatura constante (28 ± 0.5 °C) bajo siete niveles de salinidad (5, 12, 19, 26, 33, 35 and 40 psu) por un periodo de 28 días, en este experimento no encontraron diferencias significativas en el crecimiento larval. Sin embargo, encontraron que la salinidad afecta significativamente la supervivencia, En el segundo experimento, encontraron que la supervivencia incrementó junto con el aumento de la salinidad seguido directamente de la exposición de las mismos siete niveles de salinidades en un periodo de 72-h. demostrando una alta eurihalinidad, con un 95% de supervivencia.

Lo más reciente de Pérez-Robles y colaboradores (2016) fue un estudio de los efectos de la salinidad en la tasa de eclosión, tiempo de eclosión, porcentaje de supervivencia, patrón de osmorregulación y la incidencia de anomalías en las larvas recién eclosionadas, en embriones de *S. annulatus* que fueron expuestos a 5, 12, 19, 26, 33, 35 y 40 psu. El porcentaje de eclosión (hatching percentage, HP), el porcentaje de supervivencia (survival percentage, PS), porcentaje de larvas normales (PN), porcentaje de larvas deformes (PD) y el tiempo de eclosión (hatching time, HT) que fueron afectados significativamente por la salinidad ($P < 0.05$). Siendo este el primer estudio llevado a cabo en embriones para esta especie; por lo tanto la información que obtuvieron es esencial para mejorar las estrategias de cultivo en los primeros estadios de desarrollo.

2.6 Justificación

La importancia de este pez radica en que es considerada un producto con una creciente demanda de consumo. El botete diana es considerado una de las primeras especies nativas con la cual se ha logrado un éxito en cuanto a la reproducción artificial se refiere, ya que presenta un potencial para soportar las condiciones de cultivo. La importancia de colaborar con investigación para su cultivo, se debe a su apreciable valor comercial, ya que es considerado por asiáticos como un platillo exquisito (gourmet), sin olvidar que es necesario retirar piel y órganos venenosos. Los adultos pueden ser utilizados como alimento y los juveniles como peces ornamentales en acuarios marinos (por su curioso comportamiento).

Para poder llevar a cabo el cultivo de un organismo, es necesario conocer su hábitat y distribución, así como sus hábitos alimenticios; lo cual nos ayudará a conocer sus características conductuales, apareamiento, desove y alimentación.

El criterio considerado más importante para determinar el potencial que tiene la especie para cultivo en acuicultura es la alta tolerancia a los cambios de salinidad y temperatura (Pérez-Robles *et al.*, 2012); es considerado eurihalino ($0-35\text{gL}^{-1}$), con una alta tolerancia a la temperatura ($25-30^{\circ}\text{C}$), entre otras características.

En México, algunas especies de peces marinos son sujetos a estudios como potenciales candidatos para la acuicultura comercial (García-Ortega y Lazo, 2004), dentro de los cuales podemos destacar a *S. annulatus*.

Resaltando la importancia que tienen los estudios relacionados con la termotolerancia y los aspectos de distribución geográfica, así como la respuesta a los cambios climáticos actuales.

Capítulo 3. Hipótesis

Al exponer a *Sphoeroides annulatus* a los límites críticos térmicos máximos y mínimos, se obtendrá una modificación en la capacidad aeróbica del organismo y con ello será posible determinar el campo de actividad metabólico inducido por la temperatura.

Capítulo 4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar las respuestas fisiológicas y metabólicas de juveniles de *S. annulatus* expuesto a cinco diferentes temperaturas de aclimatación.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la Temperatura crítica mínima (TCMín) para juveniles de botete diana.
2. Determinar la ventana térmica de *S. annulatus*.
3. Determinar la osmoregulación asociada al cambio térmico de los organismos después de ser expuestos al TCMáx.
4. Obtener las TIRASmáx y TIRASmín para determinar así el Campo de Actividad Metabólico (CAM) de *Sphoeroides annulatus*.

Capítulo 5. Materiales y Métodos

5.1 Obtención de los organismos.

Los organismos experimentales, juveniles de *Sphoeroides annulatus*, se obtuvieron a través del CIAD (*Centro de Investigación en Alimento y Desarrollo, Unidad Mazatlán*), los cuales fueron trasladados vía aérea desde la planta piloto en el estado de Sinaloa hasta Tijuana B.C., posteriormente fueron transportados vía terrestre hasta el CICESE, estos fueron transportados en bolsas con oxígeno a saturación, y se mantuvieron en una hielera con temperatura apropiada para recibirlos en el mejor estado posible.

Los organismos se recibieron en buenas condiciones, aunque con reacciones normales de estrés debido al traslado como falta de apetito y nado lento, sin embargo, no hubo pérdidas durante la travesía, aunque se pudo observar que venían lastimados de sus aletas (Caudal, anal y pectorales), esto se debe a que estos organismos al ser carnívoros y presentar una fuerte dentadura, acostumbran a morder a otros peces en caso de estrés o hambre.

Al llegar fueron colocados en estanques de 2000 L que se ubican en el invernadero del Departamento de Biotecnología Marina, se mantuvieron en observación y bajo condiciones controladas de temperatura (26 ± 2 °C), oxígeno 5.8 ± 0.5 mg/L de oxígeno disuelto, 7.5-8 pH, amonio y a una salinidad de 35 ‰. Los organismos no fueron alimentados durante las primeras 24 horas, ya que debido al estrés no aceptan ningún tipo de alimento.

5.2 Mantenimiento de los organismos.

Los juveniles de *S. annulatus* fueron instalados en un invernadero del departamento de Biotecnología Marina. 100 peces pertenecientes al primer lote y 300 pertenecientes al segundo lote, obteniendo un total de 400 peces al iniciar el mantenimiento. Posteriormente fueron divididos en grupos de 133 por estanque; en estanques de 2000 L, con aireación y recambio de agua oceánica constante, así como con un controlador

de nivel y temperatura. La temperatura se mantuvo a 26 ± 1 °C como lo recomendado por (Reyes-Hernández, 2009), así como una salinidad de 35 ‰.

El mantenimiento constó de varias partes, una de ellas fue alimentarlos diariamente con calamar fresco cortado en trozos pequeños y adicionado con alimento peletizado de camarón, y la otra fue mantener las mejores condiciones en cuanto a limpieza, la cual estuvo dividida en dos secciones: una consistió en sifonear restos que fueran evidentes, y la otra en frotar de manera periódica las paredes de los estanques con una esponja para evitar el crecimiento de algas, así como recambios diarios de agua del 50%.

Al iniciar el mantenimiento se les proporcionaba alimento a saciar una vez por día. El peso inicial de los peces se encontraba entre 6-12 gramos (promedio= 8.2 g). Sin embargo, se observó que periódicamente los peces se encontraban lastimados (mordidos) de sus aletas (pectorales, caudal y anal), siendo un indicativo de que no se les estaba proporcionando suficiente alimento, razón por la cual se optó por aumentar la cantidad y dosis alimento, se modificó a dos veces al día. La primera entre 8:00 - 8:30 am, y la segunda entre 4:00 - 4:30 pm, la segunda ronda de alimento se recomienda que siempre sea antes de oscurecer, ya que los organismos tienden a irse al fondo y a despreciar la comida en ausencia de luz.

Después de modificar las sesiones de alimento la cantidad de organismos lastimados disminuyó considerablemente. Conforme los organismos fueron creciendo la cantidad de organismos lastimados de las aletas (mordidos) empezó a aumentar, y se optó por agregar una sesión más de alimento, siendo esta cada 4 horas, esto para evitar canibalismo.

El alimento consistió inicialmente de trozos de calamar (*Loligo opallescens*), sin embargo al transcurrir las semanas se detectó un cuadro de infección en piel, esto probablemente se debió a la calidad del alimento. Dicha infección se mostraba generalizada en los organismos, los cuales llegaron al punto de despreciar la comida en su totalidad. Se recurrió a un tratamiento para las infecciones presentadas (Ver anexo).

5.3 Aclimatación de los organismos a cinco T^o experimentales.

Los organismos experimentales fueron divididos en grupos de 15 organismos por temperatura. Para llegar a las temperaturas de aclimatación se partió de la temperatura preferida obtenida por Reyes-Hernández (2009), la cual corresponde a 26 ± 1 °C. Para lograr llegar a las temperaturas, se aumentó o se disminuyó (según la temperatura de aclimatación) entre 1 y 2 grados centígrados por día, hasta alcanzar las temperaturas deseadas; es decir 20, 23, 26 ,29 y 32 °C. Los organismos estuvieron un mínimo de 21 días en las temperaturas antes mencionadas, previo a cualquiera de los experimentos realizados, como lo recomendado por Díaz *et al.* (2007).

5.4 Determinación de la Temperatura crítica mínima (TCMín).

Para obtener la temperatura crítica mínima se utilizó un gradiente térmico horizontal, como el que se muestra en la figura 7-b, el cual corresponde a un tubo de PVC de 4 metros de longitud y 20 cm de diámetro dividido en 20 secciones correspondientes a las cámaras (Díaz *et al.* 2007). Para obtener el gradiente térmico en un extremo se colocó un calentador de 1000 W, mientras que en el extremo contrario un enfriador (Neslab HX-150) se recircula el agua donde al estar en contacto con el serpentín de acero inoxidable sumergido en el extremo del gradiente se enfría, se utilizan piedras de aireación para eliminar la estratificación, esto a lo largo de todo el gradiente, tal y como se detalla en la figura 7-b.

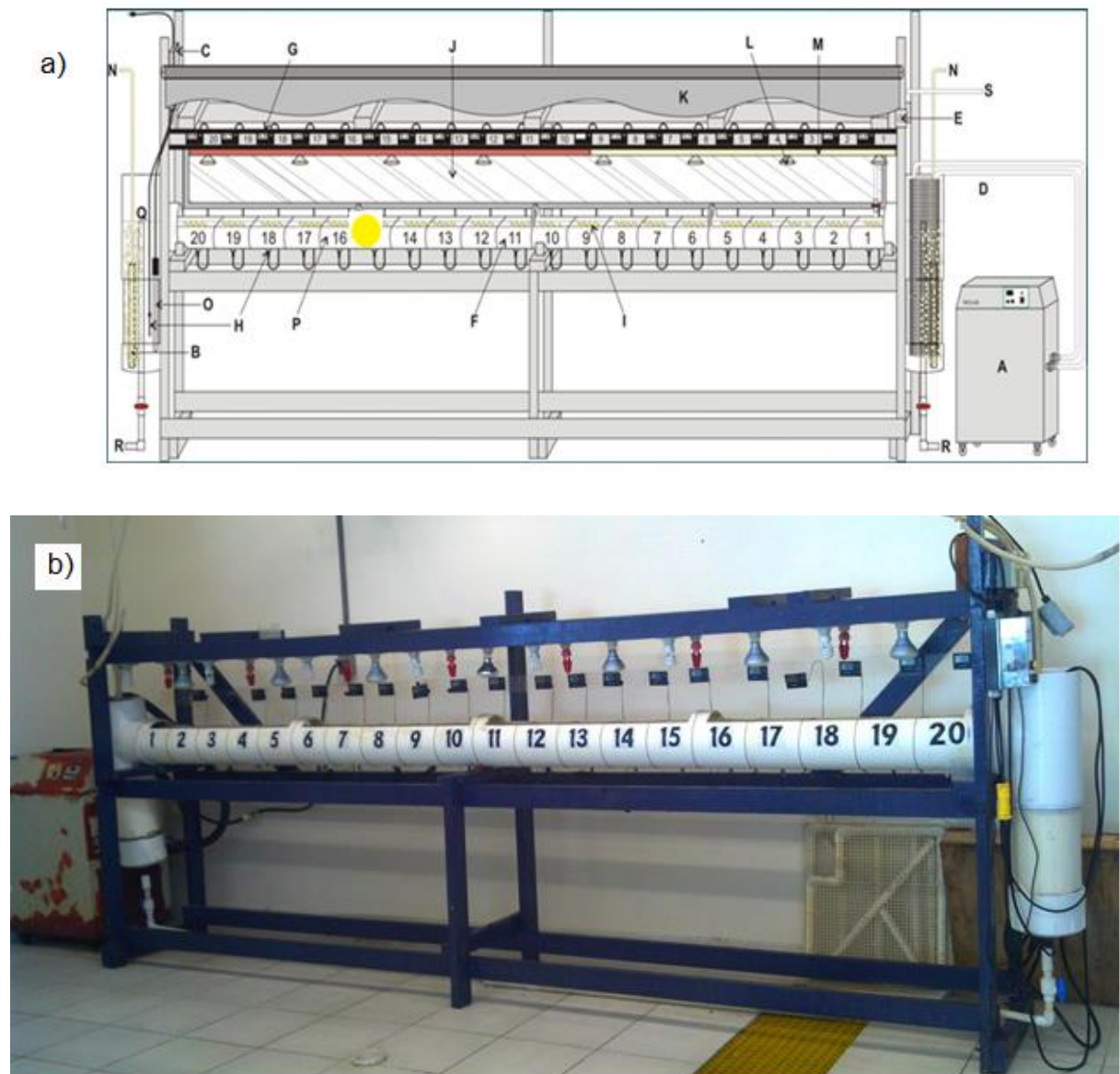


Figura 7. a) Esquema detallado del Gradiente térmico horizontal, partes: A) Sistema de enfriamiento, B) Piedra de aireación, D) Serpentín, G) Lector térmico, H) Sensor térmico, O) Resistencia térmica, R) Drenaje de sistema, L) Lámpara luz blanca, M) Lámpara luz roja, N) Sistema de entrada de agua. b) Fotografía del Gradiente térmico horizontal.

Para obtener las TCMín, se utilizaron dos grupos de organismos (5 por grupo) según las temperaturas de aclimatación, dando un total de 10 organismos para cada temperatura, los cuales fueron llevados a través del gradiente con intervalos de disminución de temperatura a una tasa de 1 °C por minuto aproximadamente. Estos fueron manejados en canastillas marcadas, como se muestra en la figura 8-b.

Previamente antes de ingresar a los organismos a la fase experimental estos fueron separados durante 25 minutos para evitar el estrés por manejo al ser colocados a las canastillas (Figura 8-a), se mantuvieron en ayuno, esto para evitar la interferencia del alimento, y a su vez evitar lo regresaran debido a la manipulación.

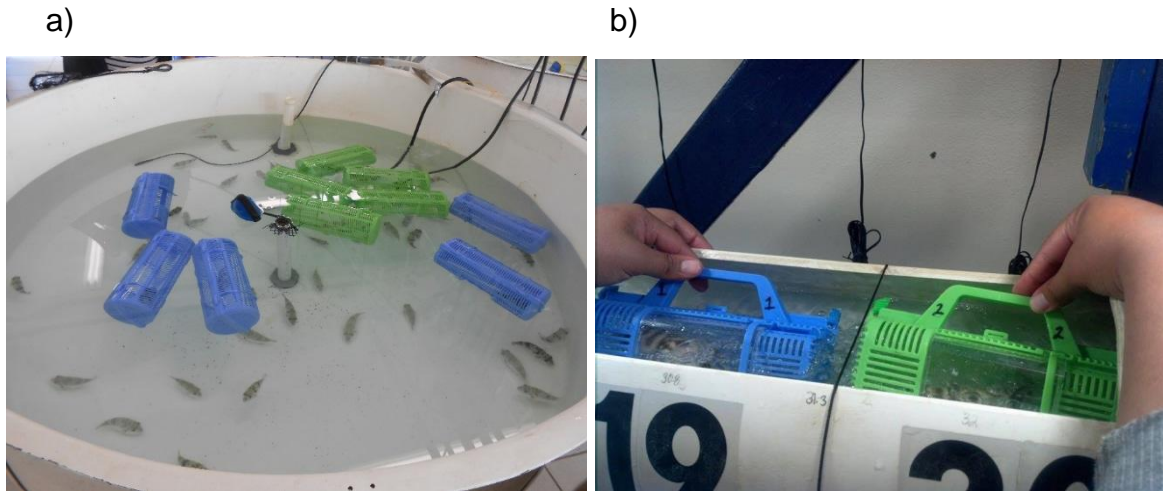


Figura 8. a) Estanque con organismos separados previos al experimento (lado izquierdo). b) Organismos transportados en canastillas a través del gradiente (lado derecho).

5.5 Determinación de la Temperatura crítica máxima (TCM_{máx}). Repetición.

Para llevar a cabo la medición de la TCM_{máx}, se utilizaron 50 organismos, 10 por cada temperatura de aclimatación, la cual tuvo una duración mínima de 21 días. Previo a ingresar los organismos al experimento, éstos se mantuvieron en ayuno durante aproximadamente 24 horas; fueron aislados en canastillas cerradas, pero que permiten el acceso del agua (fig. 8-b).

Para el experimento se dividieron en 2 grupos de 5 individuos, hasta completar los 10 organismos correspondientes a las TA, estos fueron colocados en acuarios experimentales con capacidad de 60 L, pero a un nivel de agua constante el cual corresponde a 10.5 cm de la altura del acuario provistos con un calentador de 1000W y sujetos a una piedra de aireación; con esto se logró difundir el calor de manera uniforme

y mantener una concentración de oxígeno disuelto adecuada. Se introdujeron a los organismos durante 25 minutos, para evitar el estrés por manejo previo a iniciar el incremento de la temperatura (Reyes, 2009).

Durante el experimento una persona se encargó de medir el tiempo con un cronómetro y verificar las temperaturas con un termómetro de mercurio de una precisión de 0.2 °C; mientras otra persona registraba la temperatura y el comportamiento indicador de estrés térmico que mostraban los peces, tales indicadores de estrés son aumento de actividad del organismo, cambio de color de ojos, nado y al llegar a la desorientación final (DT) obtenido por Reyes *et al* (2012) y repetido durante este estudio, los organismos se extraían y se regresaban a la Temperatura de aclimatación.



Figura 9. Acuarios utilizados para la evaluación de las TCM_{áx}.

5.6 Elaboración de ventana térmica.

Para llevar a cabo la elaboración de la ventana térmica. Se utilizaron los datos obtenidos de la exposición de los peces a la TCM_{áx} y TCM_{ín} respectivamente. Con los datos que se obtuvieron a partir de dichos experimentos y con ayuda del programa SigmaPlot, se procedió a la realización de la figura correspondiente a dicha información (se utilizaron las medias de estos datos), lo anterior para las cinco temperaturas de aclimatación (TAs: 20, 23, 26, 29 y 32 °C). Una vez que se obtuvieron los puntos en el gráfico (diagrama o

gráfico de dispersión), se procedió a unirlos con ayuda de una línea de regresión lineal, esto tanto para las temperaturas críticas máximas como mínimas, para simplificar la medición del área fue necesario unir los puntos de los gráficos obtenidos de regresión lineal, para así obtener un cuadrilátero y obtener el área del polígono. Con ayuda de una hoja milimétrica el polígono se fraccionó en figuras (triángulos) más reducidas para disminuir el error la cual se reporta en °C², debido a que representa unidades de área (Eme et al., 2009). Una vez que se obtuvo el área total, se utilizaron las temperaturas preferidas para obtener las áreas correspondientes a los pejusMáx, pejusMín y la zona óptima, finalmente con ayuda del programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) se procedió a obtener la equivalencia de las áreas en °C².

5.7 Presión osmótica en *Sphoeroides annulatus*.

El ensayo se realizó en un total de 75 organismos, de los cuales 50 correspondían a los organismos que fueron expuestos a TCMáx, TCMín y que a su vez ingresaron a las cámaras respirométricas. Los 25 organismos restantes correspondían a los organismos control, los cuales solo fueron sometidos a TCMáx y TCMín, sin entrar al respirómetro. Para realizar la medición de la presión osmótica se extrajo una muestra de 10 µl de sangre de los organismos de manera individual con una jeringa hipodérmica estéril de 1 ml (27 G), las muestras se tomaron de la zona entre la aleta dorsal y la aleta caudal.

Inmediatamente después de haber tomado la muestra esta se inocula luego en un disco de papel sin soluto tras lo cual se inserta al portamuestras en el osmómetro de presión de vapor (Wescor® 5520), se cierra la cámara de muestras y el cierre inicia la secuencia de medición automática y obtener así la cuantificación de la presión osmótica interna (PO). La presión osmótica del medio interno de los organismos así como la del externo se expresó en mOsmol/kg. El osmómetro se calibró previamente con estándares de 100, 290 y 1000 mOsmol/kg (OPTI-MOLE, Wescor).

5.8 Determinación del Campo de Actividad Metabólico mediante la metodología de las (TIAS-Mín y TIAS-Máx) utilizando el 105% y 95 % de las temperaturas críticas respectivamente.

Una vez que se determinó la TCMín y se realizó la repetición de la TCMáx, también se les midió el Campo de Actividad Metabólico (CAM), esto mediante la metodología del TIAS, se realizó para cada una de las temperaturas de aclimatación. Para esto fue necesario calcular los valores al 95%, tanto de la Temperatura Crítica Máxima y el 105% de la Mínima los cuales fueron previamente determinados, para esto los organismos fueron expuestos a la TCMáx y TCMín al 95% y 105%, para posteriormente colocarlos en el respirómetro, es necesario que este se encuentre a la misma temperatura experimental. Los organismos fueron colocados en las cámaras respirométricas, para así medir la concentración inicial de oxígeno con un OXY-10 de 10 canales (Presens), las cámaras permanecieron cerradas durante 5 minutos, el Presens toma medidas cada 30 segundos durante los 5 minutos que los organismos están expuestos a la temperatura y por diferencia entre la concentración final menos la inicial se calcula el oxígeno consumido por los organismos para cada temperatura de aclimatación y cada temperatura de inducción. El mismo procedimiento se realizó para la medición de la TIAS-Mín. Para obtener los cálculos de los consumos de oxígeno se utiliza la siguiente fórmula. $VO_2 = (n_1 - n_2) / \text{volume} * 60 * ww$, lo anterior es Consumo Final – Consumo inicial / volumen de la cámara/ hora /gramos de peso húmedo. El consumo de oxígeno (VO_2) de los organismos se expresó en $mgO_2h^{-1}Kg^{-1}p.h.$ (p.h. corresponde al peso húmedo).

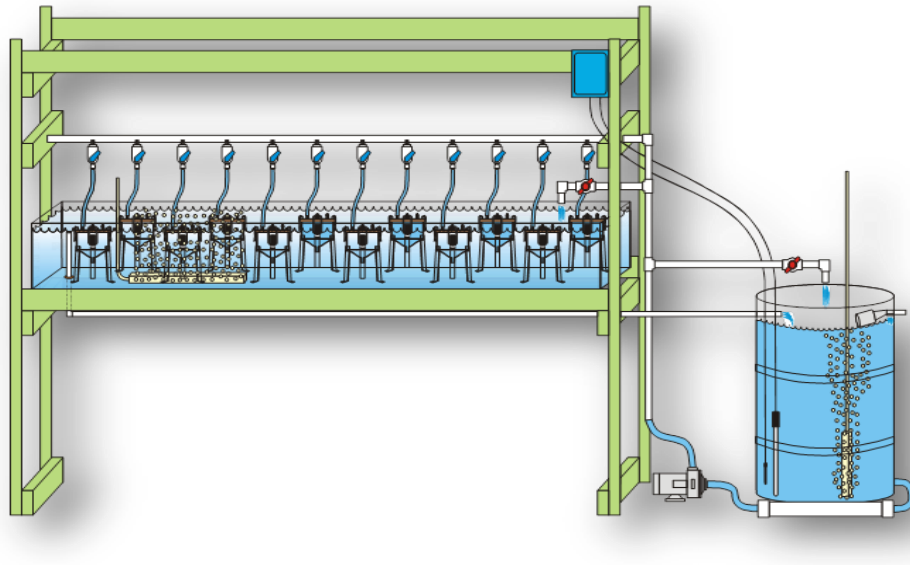
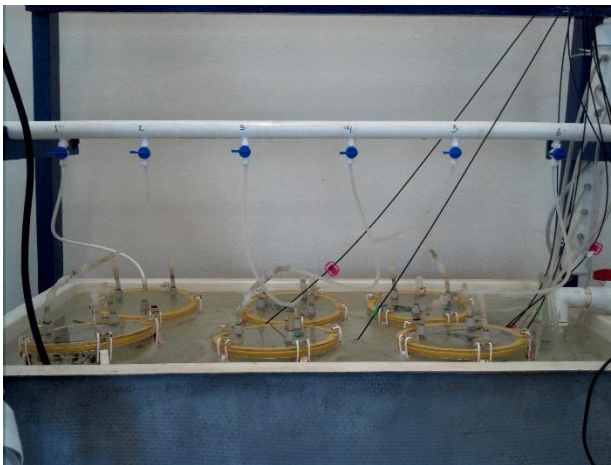
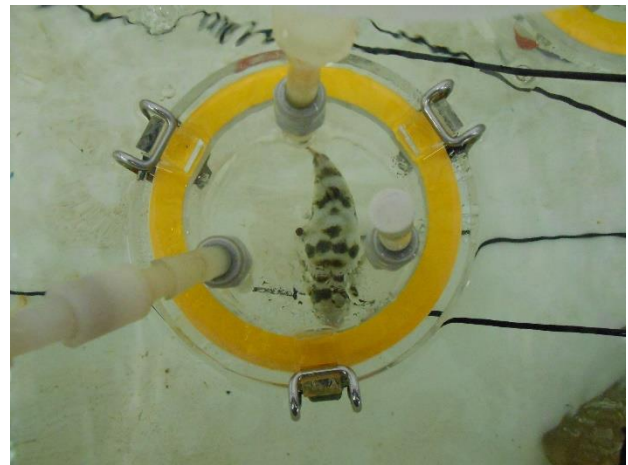


Figura 10. Esquema representativo de respirómetro



a)



b)

Figura 11.a) Respirómetro (lado izquierdo), y b) ejemplar de botete diana en cámara respirométrica (lado derecho).

5.9 Análisis estadístico.

Los datos de los bioensayos se analizaron estadísticamente con el software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc.) Se realizaron análisis de varianza de una vía (One Way ANOVA) con un límite de aceptación/rechazo $\alpha = p < 0.05$. En todos los casos, se consideraron los supuestos de homocedasticidad y de normalidad para las pruebas

paramétricas y no paramétricas. Los cuales fueron corroborados mediante las pruebas de Shapiro-Wilk, también se utilizó el procedimiento de comparación múltiple por parejas de datos con el método de Holm-Sidak.

Capítulo 6. Resultados

6.1 Temperatura crítica mínima (TCMín).

La temperatura crítica mínima aumentó en las primeras 4 temperaturas de aclimatación (TAs: 20, 23, 26 y 29 °C), excepto para la temperatura correspondiente a 32 °C, la cual se mantuvo cercana a la de 29 °C.

Para lo cual se realizó un Análisis de varianza de una vía, con el cual se pudo determinar que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los valores obtenidos en los tratamientos de TCMín con un valor de ($P = <0,001$).

Con los datos obtuvieron se realizó una prueba de Shapiro-Wilk con la cual se obtuvo un valor de $P=0,144$, esto para corroborar la normalidad y la homoscedasticidad de las varianzas ($P=0,210$).

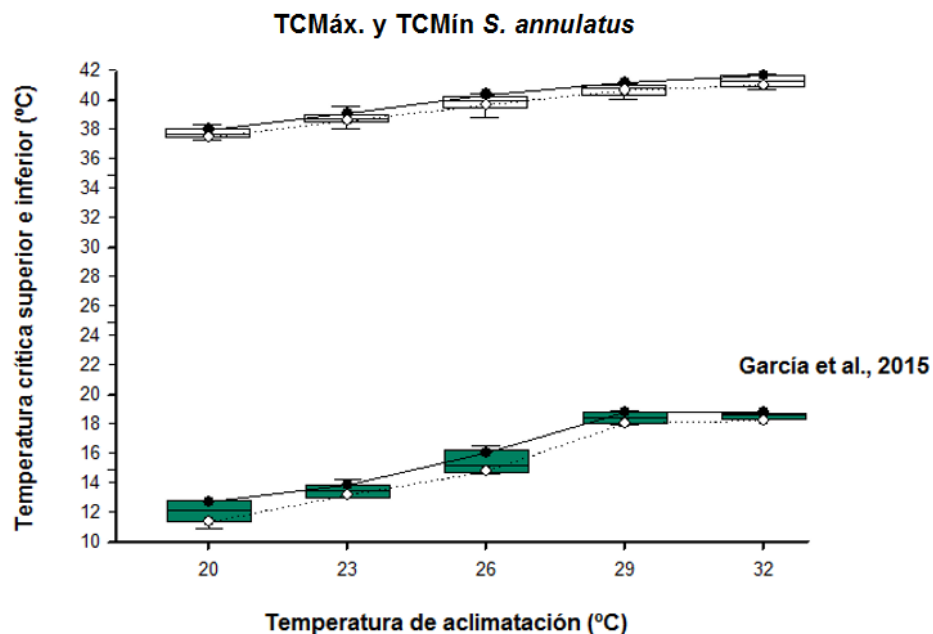


Figura 12. Gráfico de resultados obtenidos para temperaturas críticas máximas y temperaturas críticas mínimas por García et al (2015).

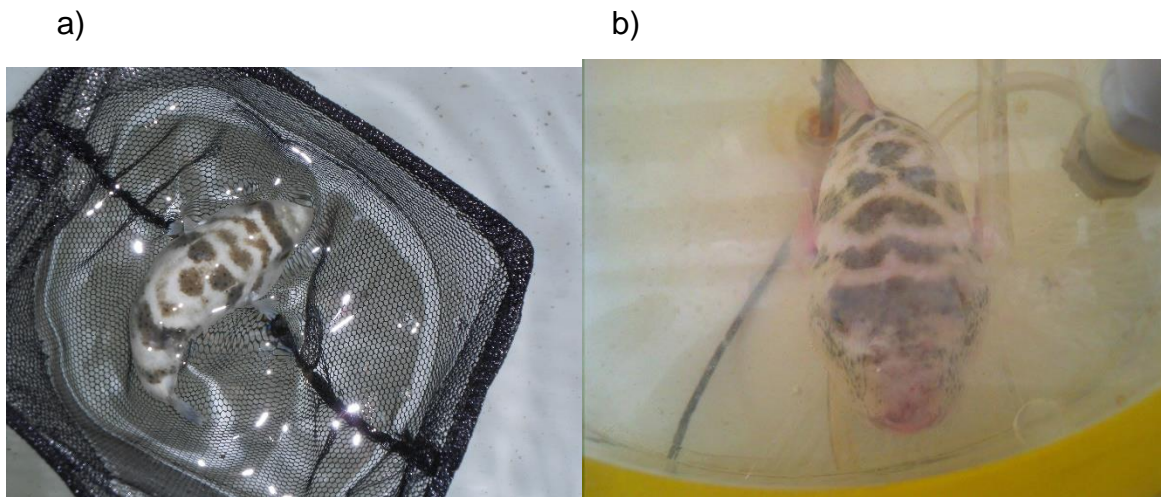


Figura 13. a) Coloración de organismos previos al experimento (organismo en red negra, lado izquierdo) Vs b) cambio de coloración evidente en organismos expuestos a TCMín (organismo en cámara respirométrica, lado derecho).

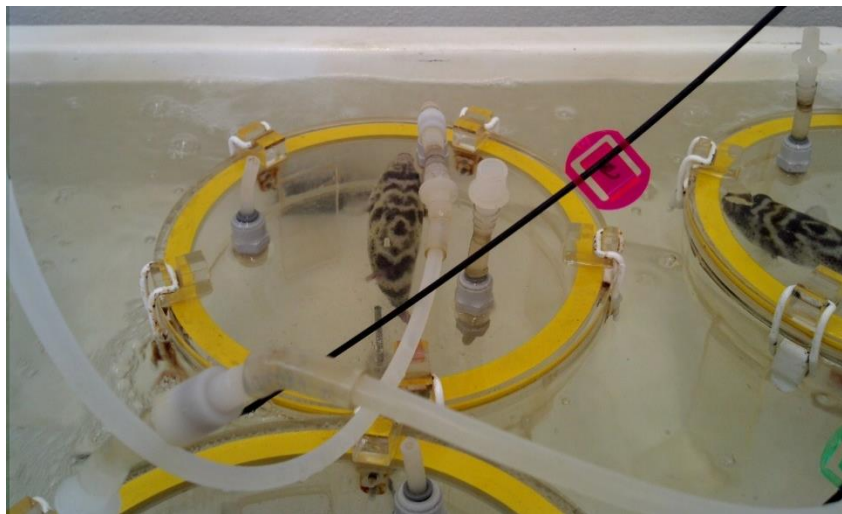


Figura 14. Pérdida de la horizontalidad en organismo expuesto a TCMáx.

6.2 Integración de los datos de TCMín y TCMáx en la Ventana Térmica.

Al integrar los datos obtenidos en los experimentos de TCMín y TCMáx se obtuvo el área total de la ventana térmica y fue de $485.74 \text{ } ^\circ\text{C}^2$, lo anterior bajo el intervalo de aclimatación entre 20 y $32 \text{ } ^\circ\text{C}$. En la ventana térmica se puede observar que está dividida en tres áreas: zona superior (**Pejusmáx**), zona inferior (**Pejusmín**) y zona central (Zona óptima). Las áreas que se encuentran dentro de la Zona óptima (Zona central), a partir del punto

medio que corresponden a las Temperaturas preferidas (TP), obtenidas por Reyes en 2009 con el método agudo (TP por TA: 28.2, 26.7, 27.8, 23.5 y 26.3 °C) tanto hacia la parte inferior como superior representan las zonas de tolerancia adquirida, las cuales se consiguen gracias a la aclimatación. Los puntos que se observan en la gráfica de regresión lineal simple reflejan los resultados de los ensayos de TCM_{máx} y TCM_{mín}, basados en los promedios de estos experimentos.

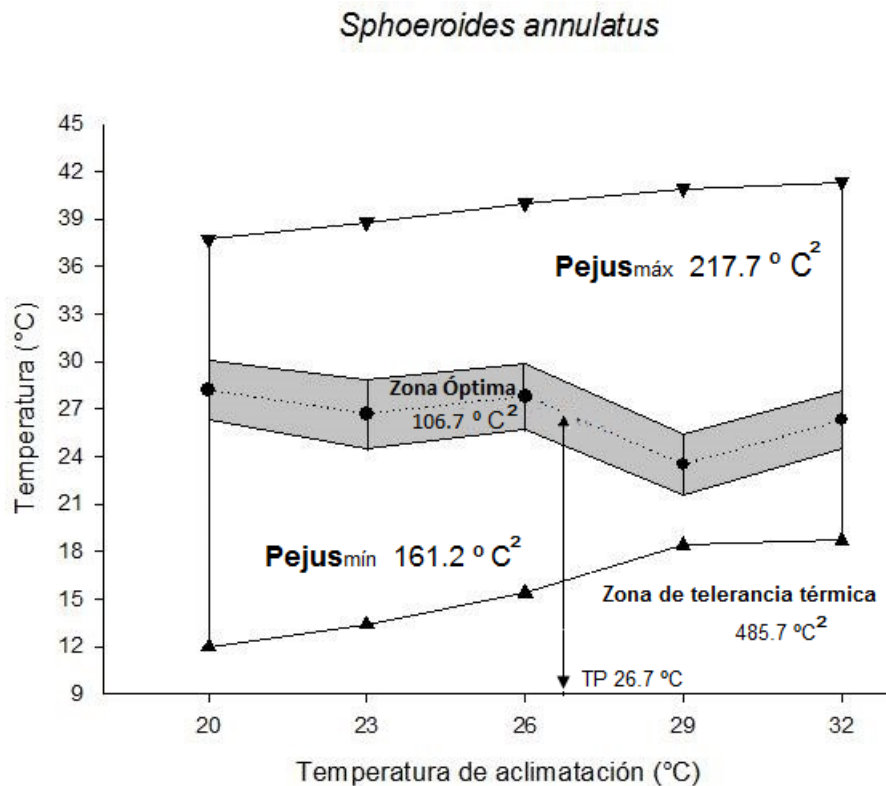


Figura 15. Ventana térmica de juveniles de *S. annulatus* (botete diana) acimatado a cinco diferentes temperaturas.

6.3 Presión osmótica en *S. annulatus*.

Se realizó un análisis de varianza de una vía (One Way ANOVA), con el cual se determinó que las diferencias entre los valores medios entre los grupos de tratamientos experimentales son mayores que los que se esperarían por azar, lo anterior muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa de $P=0.012$.

Con la ayuda de la prueba de Shapiro-Wilk se pudo determinar que los valores que se

obtuvieron de presión osmótica para organismos experimentales (bajo TIAS-TCM_{áx}) tienden a la normalidad ($P= 0,957$), a su vez con la prueba de igualdad de varianzas se pudo corroborar que los datos experimentales presentaron homoscedasticidad.

Así mismo se realizó un procedimiento de comparación múltiple por parejas de las TA, esto con el método de Holm-Sidak. El cual arroja un total de nivel de significancia= 0,05. En el total de comparaciones pareadas no hubo diferencias significativas, excepto para los valores de 23 °C, 26 °C y 29 °C vs 32 °C. Tal y como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación de las presiones osmóticas de la sangre medidas en los organismos en las TA. Exp= experimentales, después de ser expuestos a las TIAS-Máx donde PO= presión osmótica (mmol kg⁻¹).

Comparación	Dif. entre medias	t	P	P> 0,050
PO 29 Exp vs. PO 32 Exp	152,306	4,65	<0,001	Yes
PO 26 Exp vs. PO 32 Exp	129,556	3,446	0,014	Yes
PO 23 Exp vs. PO 32 Exp	124,156	3,302	0,019	Yes
PO 20 Exp vs. PO 32 Exp	84,656	2,733	0,069	No
PO 29 Exp vs. PO 20 Exp	67,65	2,116	0,228	No
PO 26 Exp vs. PO 20 Exp	44,9	1,216	0,734	No
PO 23 Exp vs. PO 20 Exp	39,5	1,07	0,75	No
PO 29 Exp vs. PO 23 Exp	28,15	0,733	0,85	No
PO 29 Exp vs. PO 26 Exp	22,75	0,592	0,805	No
PO 26 Exp vs. PO 23 Exp	5,4	0,127	0,9	No

En el caso del análisis de la presión osmótica bajos las TA de los organismos control se pudo determinar con el análisis de varianza de una vía (one way ANOVA) que no existen diferencias estadísticamente significativas, con un valor de $P=0,139$, a su vez mostraron a través de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk una tendencia a la normalidad con un valor $P=0,487$, y a través de la prueba de igualdad de varianzas se obtuvo un valor de $P=0,450$, lo cual prueba que existe homocedasticidad entre varianza.

Presión Osmótica de *S. annulatus*
(Antes y después de ser expuesto a TIAS-Máx)

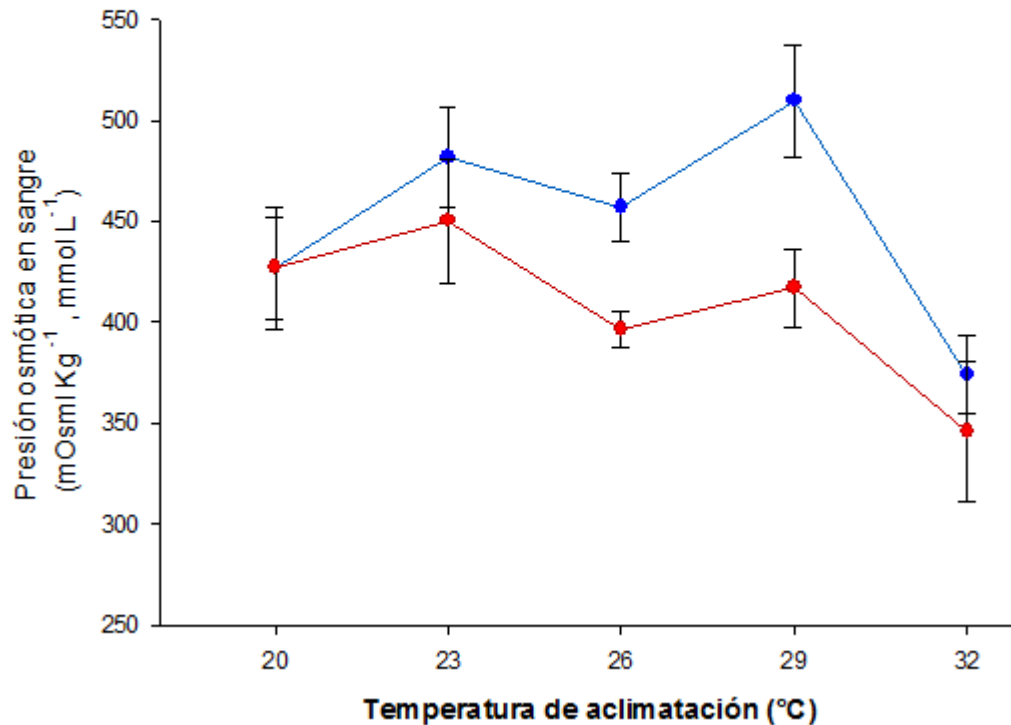


Figura 16. Comparación entre los valores obtenidos para la presión osmótica en sangre de *S. annulatus*. Controles ● y Experimentales ●.

Los valores de presión osmótica más altos para organismos experimentales se registraron para las TAs de 23 °C y 29 °C ($481,6 \pm 55,7$ y $509,7 \pm 78,5$ mOsm/Kg respectivamente), siendo los TAs Experimentales con valores más bajos las de 20 °C y 32 °C, después de haber sido expuesto a las TCMáx con un promedio de $427,1 \pm 79,55$ y $374,1 \pm 58,29$ mOsm/Kg (Tabla 2).

Tabla 2. Valores obtenidos para la presión osmótica en sangre de *S. annulatus*. Controles y Experimentales en mmol kg⁻¹. (Incluyendo la desviación estándar).

TA (°C)	20	23	26	29	32
Control	427 ± 30,13	450,4 ± 30,78	396,6 ± 8,67	417,2 ± 19,34	346 ± 35,14
Experimental	427,1 ± 25,25	481,6 ± 24,9	457 ± 16,7	509,75 ± 27,78	374,11 ± 19,43

6.4 Campo de actividad metabólico mediciones de Consumo de oxígeno en las condiciones de TIRAS-máx. y TIRAS-mín.

Se utilizaron los consumos de oxígeno obtenidos de los experimentos correspondientes a TIASMáx y TIASMín para obtener el Campo de Actividad Metabólico (CAM) de *S. annulatus*. Los consumos de oxígeno para TIASMáx según las temperaturas de aclimatación de 20, 23, 26, 29 y 32 °C fueron los siguientes, 700.40 ± 51.02 , 636 ± 29.49 , 580.70 ± 47.38 , 299 ± 20.7 , 147 ± 11.4 respectivamente. Mientras que los consumos correspondientes a TIASMín para las mismas temperaturas de aclimatación fueron los siguientes, 250 ± 32.4 , 297.5 ± 29.1 , 226 ± 23.4 , 187 ± 31.2 y 106.3 ± 6.1 .

De acuerdo a la metodología para la obtención del CAM que es la diferencia entre la tasa metabólica aeróbica máxima (MMR) y la tasa metabólica estándar (SMR) con los cual se obtuvieron los siguientes datos 450, 338, 354.70, 112 y 40.7 para la realización del gráfico correspondiente al Campo de Actividad Metabólico.

Tabla 3. Datos de las TCMáx y TCMín para obtener las temperaturas correspondientes a las TIASMáx y TIASMín.

Temp. Increm. Activity Scope				
TA	TCMáx	TCMáx-5%	TCMín	TCMín - 105%
20 °C	37.7	36	11.98	12.6
23 °C	38.8	36.9	13.47	14
26 °C	40.0	38.00	15.38	16.15
29 °C	40.9	38.85	18.38	19.3
32 °C	41.3	39	18.68	19.61

TIRAS máx-mín *S. annulatus*

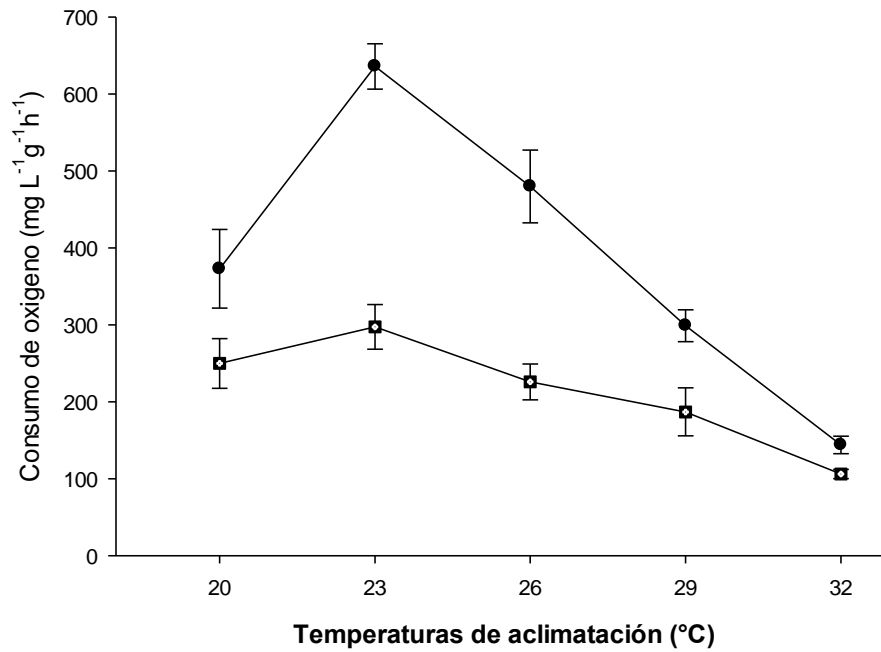


Figura 17. Valores obtenidos para la SMR (Tasa metabólica estándar) y MMR (Tasa metabólica máxima).

Campo de Actividad Metabólico de *S. annulatus*

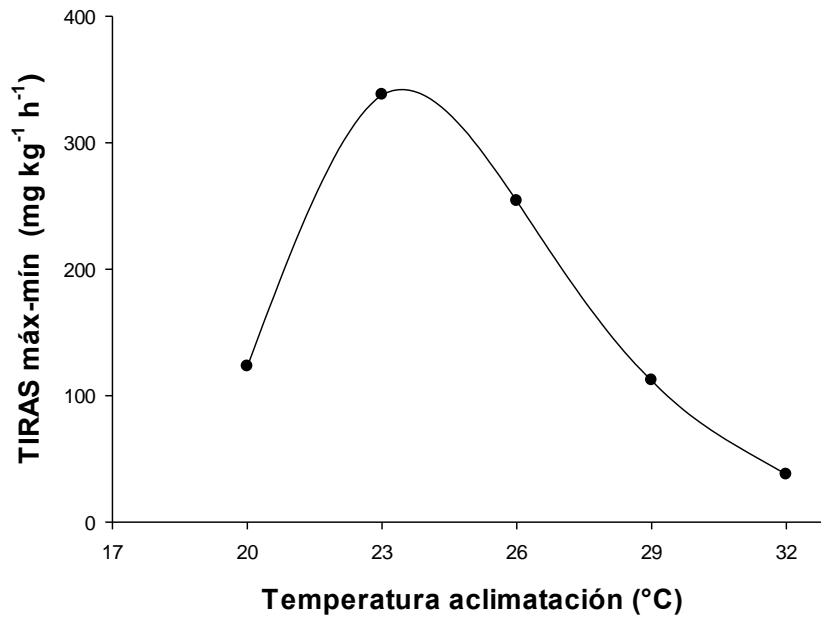


Figura 18. Gráfico obtenido para CAM de *Sphoeroides annulatus*.

Capítulo 7. Discusión

Para teleósteos, como el botete diana, se sabe que el consumo de oxígeno se encuentra influenciado por factores externos, como la temperatura (Pérez-Robles, 2010). En el presente trabajo fue posible observar claramente que los cambios de temperaturas influyen significativamente en las TCO. Das (2005) menciona que la TCO se aumenta significativamente con el incremento de las TAs.

Pérez-Robles (2010) menciona cuatro respuestas fisiológicas descritas por Kinne en 1967, estas respuestas están relacionadas con la salinidad. Con base en lo anterior, pero utilizando como variable la temperatura podemos mencionar tres respuestas fisiológicas en cuanto a temperatura se refiere; (1) La tasa de consumo de oxígeno es influenciada por la temperatura, (2) la tasa metabólica de los organismos se incrementa en temperaturas elevadas y disminuye en bajas temperaturas, (3) la tasa de consumo de oxígeno es elevada en altas temperaturas y disminuida en bajas temperaturas.

En cuanto a la disminución o aumento de la tasa de consumo de oxígeno (TCO) en la respuesta metabólica para *S. annulatus* en las diferentes TAs, arroja la correlación existente, como lo observado para otras especies como *Litopenaeus stylirostris* (Re et al., 2004), *Labeo rohita* (Das, 2005), *Micropterus salmoides* (Díaz et al., 2007), *Lutjanus guttatus* (Larios, 2013), En estos estudios se pudo observar que en TAs abajo de la temperatura óptima existe una reducción de la tasa metabólica y observándose un efecto contrario para TAs arriba de la temperatura óptima, siendo congruente con lo observado en *S. annulatus*. *S. annulatus* exhibió una correlación entre la aclimatación previa y la resistencia o “tolerancia” a cambios de temperatura, contrario a lo descrito por Reyes (2009) en relación a temperatura-preferencia, donde menciona que la temperatura preferida final es independiente a la temperatura de aclimatación previa.

Es evidente que la aclimatación juega un papel importante a la hora de someter a los organismos a experimentos o bioensayos, por lo tanto, se puede corroborar que los peces se encuentran adaptados a las temperaturas ambientales a las que se hayan expuesto previamente. Ya que como sabemos, los ambientes naturales son sumamente

fluctuantes, a causa de que presentan variaciones de temperatura a lo largo del día y de las estaciones del año.

Sin dejar de lado la importancia de la talla y peso de los organismos, ya que en juveniles el gasto energético se deriva a procesos de crecimiento y maduración principalmente. El botete diana es considerado dentro de las especies que presentan un comportamiento termorregulador. Según la información presentada por Reyes-Hernández (2009) y Pérez-Robles et al. (2012) quien manejó como temperatura preferida $26 \pm 1^\circ\text{C}$ para *S. annulatus*, sin embargo en este estudio y con ayuda de las observaciones realizadas y el monitoreo constante se pudo detectar un incremento en la tasa de crecimiento a una temperatura menor, es decir a 23°C , así como mayor consumo de alimento y menor tasa de mortalidad. Las temperaturas más cercanas a la temperatura preferida son las que presentaron un mejor desempeño de los organismos (TAs $23, 26$ y 29°C), siendo las temperaturas de los extremos las que presentaron dificultades para el mantenimiento de los organismos, esto es para las temperaturas de 20 y 32°C .

Por lo anterior es probable que esta temperatura sea óptima para los organismos en esta etapa. Esto coincide con Jobling (1981) donde menciona que el preferéndum térmico final se puede encontrar en un intervalo de $\pm 2^\circ\text{C}$ de la temperatura preferida. En este caso, para botete diana se considera mantener a los organismos 2°C abajo de su temperatura preferida, ya que es preferencial para su desarrollo y supervivencia lo anterior para organismos juveniles mantenidos en cautiverio.

S. annulatus como la mayoría de los peces entra dentro de la clasificación de los ectotermos, la relación existente entre la temperatura del cuerpo del pez y de las aguas donde habita ha sido tema de estudio por más de 150 años (descripción por Morro y Mauro, 1950).

Es importante realizar análisis del comportamiento de los organismos contra cambios climáticos, ya que éstos se encuentran con constantes fluctuaciones de temperatura en el medio ambiente. Van desde cambios que ocurren en un ciclo diurno a corto plazo y a través de las estaciones del año a largo plazo. Y como ejemplo la variación de la temperatura que hay de un hábitat a otro.

Cuando los organismos están expuestos a temperaturas críticas y se encuentren en la zona que corresponde a la transición entre el óptimo y el Pejus estos estarán estresados hasta que pueda escapar o bien disminuya o aumente la intensidad del factor según sea el caso. Dentro de esta zona, los organismos aun estando sometidos a un factor de estrés (para nuestro caso la Temperatura) presentan la capacidad de tolerar estos cambios ambientales adversos, aunque es importante mencionar que dependen de ciertos márgenes; como es la capacidad del organismo, la intensidad del factor y del tiempo de exposición, sin olvidar el tiempo de aclimatación para el caso de organismos experimentales. Ya que es sumamente estudiado y conocido que la aclimatación modifica los límites de tolerancia. Para el caso de la temperatura, varios autores mencionan que el período de aclimatación condiciona de tal manera al animal, que puede tolerar niveles que serían deletéreos por encontrarse fuera de la zona de tolerancia, esto según algunos autores como Hutchinson (1957) y Jobling (1981), quienes son pioneros en el tema.

Los estudios en cuanto a las características comunes que presentan los organismos al estar expuestos a temperaturas letales, en peces destaca la pérdida de horizontalidad, desequilibrio y la aparición de espasmos (OS) los cuales se han considerado como el punto final definitivo para determinar la tolerancia a la temperatura crítica máxima (TCM_{máx}). En un estudio realizado con diferentes especies se midieron las TCM_{máx} de 610 animales en tres clases de vertebrados, Actinopterígios, Amphibia y Reptilia. En este estudio todos los organismos mostraron una pérdida media significativamente menor de la respuesta de enderezamiento. Dicho estudio concuerda que los espasmos son el punto final más significativo porque se ajusta más estrechamente la definición original de la temperatura crítica máxima descrito por Cowles y Bogert en 1944 (Jobling, 1981; Lutterschmidt & Hutchison, 1997).

Para el caso de las temperaturas críticas máximas (TCM_{máx}) la tendencia del organismo es buscar una manera de escape, ya que el tiempo de exposición a altas temperaturas resulta ser letal a menor tiempo en comparación con las temperaturas críticas mínimas (TCM_{mín}). También es importante mencionar que si el organismo es sometido a un estrés

severo, se traducirá en limitaciones en la capacidad del organismo de manera directa o indirectamente a través del aumento de la sensibilidad a patógenos, como los cuadros de infección inicial vistos en los organismos expuestos a altas temperaturas.

Sin embargo para las Temperaturas críticas mínimas el organismo presenta mayor resistencia en cuanto al tiempo de exposición. Razón por lo cual es común que los organismos se observen tranquilos e incluso aletargados, como lo observado en nuestro estudio.

La Ventana térmica que se obtuvo después de la integración de los datos de TC_{mín} y TC_{máx} tuvo un área total de 485.74 °C², esto representa una amplia zona de tolerancia térmica, ésta información nos permite inferir que *S. annulatus* es un organismo euritermo. En 1997 Bennett y Beitinger describieron en el pez bolín *Cyprinodon variegatus* la ventana térmica más amplia que se conoce y que probablemente sea el pez con mayor euritermicidad de todas las especies conocidas, con áreas de 1380 °C² y 1470 °C² para aspectos tanto fisiológicos, como ecológicos respectivamente.

Díaz y colaboradores (1998) obtuvieron un polígono térmico en *Macrobrachium rosenbergii* para postlarvas de 821.2°C² y 816.9°C² para juveniles, el cual también muestra un alto grado de euritermicidad. Para 2002 el equipo de Díaz-Herrera obtuvo el polígono para *Macrobrachium acanthurus* con un área de 644 °C². También hay reportes para especies tropicales como *C. mrigala*, *L. rohita* y *C. catla* con valores de sus zonas de tolerancia térmica de 801.8 °C², 744.8 °C² y 728.8 °C², respectivamente para un intervalo de aclimatación de 12-40 °C² (Das et al., 2005). Eme y Bennett en 2009 reportaron los polígonos de tolerancia térmica para cinco especies; *Bathygobius fuscus*, *Liza viagiensis*, *Bathygobius sp.*, *Dascylus aruanus* y *Apogon novemfasciatus* donde obtuvieron rangos desde 408 °C² hasta 829 °C². Todas las especies anteriormente mencionadas presentan las características de especies euritermas.

Mientras que lo reportado para *L. gutattus* por Larios en 2013 fue un valor de zona de tolerancia térmica de 336.47 °C² bajo un intervalo de aclimatación de 20- 35 ° C, y clasificándose dentro de los organismos estenotermos en comparación con las especies tropicales antes mencionadas. Así como lo reportado para *Octopus maya* con un valor

de 210.0 °C² bajo un rango de aclimatación de 18-30 °C (Noyola et al., 2013). Finalmente y dentro de los trabajos más recientes, se encuentra lo realizado en 2015 por Noyola y su equipo en el cual presentaron seis nuevas ventanas térmicas para predadores y presas de *O. maya*, en donde las especies con ventanas térmicas más grandes fueron *M. corona bispinosa* (328.8°C²), *C. similis* (322.8°C²), *L. dubia* (319.2°C²), *C. undecimalis* (288.6°C²), *O. chrysurus* (237.5°C²), mientras que la ventana con menor área fue para *S. pugilis* (202.0°C²).

La Presión osmótica y su relación con la temperatura se ha estudiado en otros organismos. Para *S. annulatus* Pérez-Robles (2009) menciona que la osmolaridad del plasma en *S. annulatus* está relacionada de manera lineal con la salinidad ambiental, tal como se ha descrito para otros teleósteos eurihalinos, razón por la cual se considera que el botete diana es un organismos fuertemente osmorregulador. Sin embargo, para nuestro caso en el cual la salinidad que se manejó en todos los experimentos fue constante se pudo observar que *S. annulatus* para todas las TAs se encontró dentro de los valores que son considerados normales en teleósteos marinos ya que para organismos experimentales la presión osmótica menor fue de 374,11 mOsm/Kg para TA: 32°C y 509,75 mOsm/Kg a la TA de 29. Y en organismos control la menor fue de 346 mOsm/Kg a la TA: 32 ° C y la mayor a la TA: 23 ° C de 450,4 mOsm/Kg. De lo anterior cabe resaltar que las presiones osmóticas menores se encontraron tanto para control como para experimentales a la temperatura de 32 ° C, esto probablemente se debe a que los organismos expuestos a la temperatura más alta de aclimatación o que se encuentran más alejados de la temperatura óptima presentaron mayores dificultades para mantenimiento, a temperaturas altas, donde los organismos dejan de comer, por lo tanto pierden peso, en nuestro caso fue necesario aclimatar dos lotes de organismos para esta temperatura, ya que el primer lote dejó de consumir alimento dentro de las primeras 3 a 4 semanas, finalmente se perdió todo el lote.

El desempeño de los organismos a altas temperaturas y la baja presión osmótica que presentan se ve disminuido debido a que si no existe un balance osmótico, tampoco existe un correcto funcionamiento fisiológico, por lo tanto no se pueden mantener procesos biológicos esenciales como la digestión y asimilación de nutrientes.

Lo anterior se puede corroborar con los datos obtenidos por Larios (2013), ya que en sus dos últimas temperaturas de aclimatación que fueron 32 ° C y 35 ° C también se observa una disminución de la presión osmótica tanto para organismos control como experimentales, aquí menciona que cuando existe un incremento de temperatura corporal también existe una pérdida de agua en las células, ya sea a través de la orina o debido a la deshidratación a la que se exponen, debido al efecto del aumento de temperatura. Siendo la disminución de la presión osmótica un indicador del impacto energético el cual resulta en un desequilibrio osmótico y altera los procesos gastrointestinales y provoca una disminución en la ingesta de alimento, tal y como lo observado en *S. annulatus*.

A la fecha la mayoría de los estudios correspondientes al campo de actividad metabólico (CAM) se ha realizado en su mayoría en peces polares como son: *Zoarces viviparus*, *Macrozoarces americanus*, *Cyclopterus lumpus*, *Myoxocephalus Scorpius*, *Pagothenia borchgrevinki* , *Oncorhynchus nerka*, *Salmo trutta*, *Carassius auratus*, *Fundulus heteroclitus*, *Gadus morhua*, *Oncorhynchus mykissin*, *Oncorhynchus kisutch* entre muchas otras más (Fry *et al.*, 1942 ;Tytler & Calow,1985; Forster, Franklin, Taylor & Davison, 1987; Pörtner & Knust, 2007; Farrell *et al.*, 2008; Eliason *et al.*, 2011; Auer, Salin, Rudolf, Anderson & Metcalfe,2015; Holt & Jørgensen, 2015; Brennan, Hwang, Tse, Fangue & Whitehead, 2016; Raby *et al.*, 2016).

Los estudios para encontrar el CAM en especies tropicales no es tan extenso, sin embargo ya hay equipos que están ayudando a que esta lista aumente. Entre ellos se encuentran especies como: *Elacatinus lobeli* , *Elacatinus oceanops* y *Pseudocrenilabrus multicolor victoriae*, aunque si es posible encontrar información para otras especies marinas como lo es en artrópodos y moluscos (Le , Alfaro, Ragg Hilton & King , 2016; McDonnell & Chapman; 2016; Di Santo & Lobel; 2016).

En nuestro estudio se utilizaron las TIASMáx Y TIASMín para obtener el Campo de Actividad Metabólico (CAM) de *Sphoeroides annulatus*. Los experimentos referentes a las tasas de consumo de oxígeno en relación a temperatura son bastante amplios, sin embargo, no es común llevar a cabo la integración de ambas tasas, ya que implica mayor trabajo. Efectuar dicha integración nos proporciona información en cuanto a la amplitud o campo en el cual la especie presenta un mayor y mejor desempeño, y debido a que

hay especies que son más vulnerables ante cambios tales como la disminución de oxígeno disuelto y el ascenso o descenso de temperatura, es que se han desarrollado los estudios para la obtención del CAM en especies con interés comercial.

Las mediciones del campo aeróbico (la diferencia entre la tasa de consumo de oxígeno máximo y mínimo), se ha incrementado como una herramienta para responder cuestiones en relación a la ecología de los peces y los efectos del cambio climático (Clark, Sandblom & Jutfelt, 2013).

El campo metabólico aeróbico (CAM, campo de actividad metabólico) varía de acuerdo a las especies y el estadio de desarrollo, así como también es influenciado por variables ambientales, como lo es la temperatura. Por lo tanto se ha convenido normalizar los datos con respecto a las tasas metabólicas máxima y estándar (MMR y SMR, respectivamente) (Pride, 1985) para la obtención del campo aeróbico.

En los estudios del CAM generalmente solo se toman ciertos estadios de vida, no obstante son pocos los estudios que abarcan la historia completa de los organismos. En 2007, Killen, Costa, Brown y Gamperl se dieron a la tarea de realizar una investigación que abarcara todas las etapas de vida de tres especies de peces marinos, encontrando que el Campo aeróbico (SA, CAM) depende ampliamente del tamaño y la trayectoria de desarrollo de los organismos experimentales, siendo extremadamente pequeño en las primeras etapas ($\text{factorial aerobic scope} \leq 1.5$). Sus hallazgos sugieren que el campo aeróbico se modifica en relación a la etapa en la que se encuentre el organismo. Lo anterior tiene una implicación sobre los estudios que se han realizado, ya que basándose en su información el CAM para *S. annulatus* tendería a presentar un aumento en etapas posteriores.

También hay estudios que muestran una relación entre la amplitud o el tamaño del campo de actividad metabólica en relación a la alimentación, es decir, en una mejor dieta los organismos tienden a un mejor desempeño, y su Campo aeróbico aumenta (Auer et al., 2015).

Muchas son las variables que modifican el Campo de actividad metabólica, para el caso de *S. annulatus* nuestro análisis responde solo una pequeña parte de todas las interrogantes en cuanto a su termotolerancia, así como sus respuestas metabólicas.

Capítulo 8. Conclusiones

1. Se determinaron las Temperaturas críticas mínimas (TCMín) para juveniles de botete diana, los valores obtenidos son 11.98, 13.47, 15.38, 18.38 y 16.68 °C, con respecto a las cinco Temperaturas de aclimatación (20, 23,26, 29 y 32 °C).
2. Con base en el trabajo realizado, *S. annulatus* puede ser considerado como un organismo euritermo, ya que al ser expuesto a las temperaturas críticas se pudo obtener una ventana térmica con una zona de tolerancia térmica amplia (485.74 °C²).
3. Se evaluó la presión osmótica asociada al cambio térmico de los organismos después de ser expuestos a las TCMáx, donde se encontró que el valor más bajo (374,11 ± 19,43 mOsmol/kg) fue a la TA más alta, correspondiente a 32 °C, lo anterior nos ayuda a esbozar el estado de salud del organismo.
4. Con las mediciones de consumo de oxígeno en las TIASMáx y TIASMín se calcularon las TIRASmáx y TIRASmín para obtener el Campo de Actividad Metabólico (CAM) de *Sphoeroides annulatus*, el cual muestra gráficamente la forma típica correspondiente a un organismo que tiene una alta capacidad para tolerar temperaturas críticas.
5. La termotolerancia reflejada por *S. annulatus* es característica de esta especie, debido a su amplia distribución, que va desde zonas con temperaturas frías a zonas con temperaturas bastante cálidas, para nuestro estudio los juveniles mostraron sus mejores características de crecimiento a la temperatura de 23 °C.

Capítulo 9. Perspectivas

En los estudios fisiológicos realizados se obtuvieron las respuestas esperadas, sin embargo el corroborar resultados con los aspectos moleculares nos da una mayor validez en cuanto a la información obtenida, en este estudio se tomaron muestras correspondientes a las TIASMáx para confirmar la expresión de las Hsp70 y Hsp90, a su vez se diseñaron primers y se enviaron a secuenciar los productos PCR, falta obtener la secuencia completa de la Hsp70, someterla al NCBI y realizar análisis de PCR en tiempo real (QPCR).

Como ya se ha mencionado los cambios de temperatura están directamente relacionados con el consumo de oxígeno en los organismos, se sabe que bajos niveles en las concentraciones de oxígeno disuelto estimulan la respuesta respiratoria de los peces. Es por esto que al someter al organismo a disminución o aumento de la temperatura (factor de estrés) conlleva a una condición hipóxica en los tejidos lo cual llevaría a la muerte del organismo, por lo anterior también es recomendable analizar los genes relacionados a hipoxia.

Lista de referencias bibliográficas

- Abdo de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, L. E., Hernández, C., Hernández, K., González-Rodríguez, B., Martínez-Rodríguez, I., and García-Ortega, A. (2010). Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 45(3), 433-439.
- Abdo de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, L. E., García-Aguilar, N., Velasco-Blanco, G., and Ibarra-Castro, L. (2013). Biotecnología para la producción masiva de juveniles del botete diana *Spherooides annulatus*: inducción hormonal y cultivo larvario. *Revista de biología marina y oceanografía*, 48(3), 409-420.
- Arias-Rodríguez, L. y Del Valle Pignataro, G. (2008). Cariotipo del pez marino botete diana *Spherooides annulatus* (pisces:tetraodontidae). Semana de Divulgación y Video Científico 2008 pp. 332-335.
- Ashburner, M. (1970) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. *Chromosoma*, 31(3), 356-376.
- Auer, S. K., Salin, K., Rudolf, A. M., Anderson, G. J., and Metcalfe, N. B. (2015). The optimal combination of standard metabolic rate and aerobic scope for somatic growth depends on food availability. *Functional Ecology*, 29(4), 479-486. doi: 10.1111/1365-2435.12396
- Auer, S. K., Salin, K., Anderson, G. J., and Metcalfe, N. B. (2016). Aerobic scope explains individual variation in feeding capacity. *Biology letters*, 11(11), 20150793. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0793>
- Aziz, K. A., and Greenwood, J. G. (1981). A laboratory investigation of temperature and salinity tolerances of juvenile *Metapenaeus bennettiae* Racek and Dall (Crustacea: Penaeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 54(2), 137-147.
- Barnett, T., Altschuler, M., McDaniel, C. N., and Mascarenhas, J. P. (1980) Heat shock induced proteins in plant cells. *Developmental Genetics*, 1(4), 331-340.
- Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M., and Iwama, G. K. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2), 173-183.
- Becker, C. D., and Genoway, R. G. (1979). Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes*, 4(3), 245-256.
- Beitinger, T. L., Bennett, W. A., and McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental biology of fishes*, 58(3), 237-275.

- Berendes, H. D., Van Breugel, F. M. A., and Holt, T. K. (1965) Experimental puffs in salivary gland chromosomes of *Drosophila hydei*. *Chromosoma*, 16(1), 35-46.
- Bergillos, F. y Rivas, M.A. (2013). Toxinología clínica. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales. Tomo I. Bubok Publishing. España.
- Bosch, T. C., Krylow, S. M., Bode, H. R., and Steele, R. E. (1988). Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: these responses are present in *Hydra attenuata* but absent in *Hydra oligactis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(21), 7927-7931.
- Bowler, K. (1963). A study of the factors involved in acclimatization to temperature and death at high temperatures in *Astacus pallipes*. I. Experiments on intact animals. *Journal of cellular and comparative physiology*, 62(2), 119-132.
- Brennan, R. S., Hwang, R., Tse, M., Fanguie, N. A., and Whitehead, A. (2016). Local adaptation to osmotic environment in killifish, *Fundulus heteroclitus*, is supported by divergence in swimming performance but not by differences in excess post-exercise oxygen consumption or aerobic scope. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 196, 11-19.
- Brett, J. R. (1952). Temperature tolerance in young Pacific salmon, genus *Oncorhynchus*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 2(6), 265-323.
- Brett, J. R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 21(5), 1183-1226.
- Brett, J. R. (1971). Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *American zoologist*, 11(1), 99-113.
- Buchanan, J. A., Stewart, B. A., and Davies, B. R. (1988). Thermal acclimation and tolerance to lethal high temperature in the mountain stream amphipod *Paramelita nigroculus* (Barnard). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 89(3), 425-431.
- Buckley, B. A., Owen, M. E., and 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. *Journal of Experimental Biology*, 204(20), 3571-3579.
- Burton, D. T., Capizzi, T. P., Margrey, S. L., and Wakefield, W. W. (1981). Effects of rapid changes in temperature on two estuarine crustaceans. *Marine Environmental Research*, 4(4), 267-278.
- Carter, W.A. (1887). Temperature in relation to fish. *Nature* 36, 213–214.
- Chabot, D., Steffensen, J. F., and Farrell, A. P. (2016). The determination of standard metabolic rate in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 81-121.

- Chabot, D., Koenker, R., and Farrell, A. P. (2016). The measurement of specific dynamic action in fishes. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 152-172.
- Chávez Sánchez, M. C., Álvarez-Lajonchère, L., de la Parra, A., Isabel, M., and García Aguilar, N. (2008). Advances in the culture of the Mexican bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*, Jenyns (1842). *Aquaculture Research*, 39(7), 718-730.
- Claireaux, G., and Lefrançois, C. (2007). Linking environmental variability and fish performance: integration through the concept of scope for activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 362(1487), 2031-2041.
- Claireaux, G., and Chabot, D. (2016). Responses by fishes to environmental hypoxia: integration through Fry's concept of aerobic metabolic scope. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 232-251.
- CONAPESCA (2013) Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca
- Cowles, R. B., and Bogert, C. M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist*, 83(5), 261-296.
- Cox, D. K., and Beauchamp, J. J. (1982). Thermal resistance of juvenile crayfish, *Cambarus bartoni* (Fabricius): Experiment and Model. *American Midland Naturalist*, 187-193.
- Craig, E. A., McCarthy, B. J., and Wadsworth, S. C. (1979). Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat shock-induced protein of *D. melanogaster*. *Cell*, 16(3), 575-588.
- Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C., Prohászka, Z., and Nardai, G. (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics*, 79(2), 129-168.
- Curtis, H., Barnes, N.S., Schnek, A. and Massarini, A. (2008) Curtis Biología Ed. Médica Panamericana. 7ma Edición en español. Madrid, España. 1 Ed. 1975. 1160 pp.
- Dalvi, R. S., Pal, A. K., Tiwari, L. R., and Baruah, K. (2012). Influence of acclimation temperature on the induction of heat-shock protein 70 in the catfish *Horabagrus brachysoma* (Günther). *Fish physiology and biochemistry*, 38(4), 919-927.
- Di Santo, V., and Lobel, P. S. (2016). Size affects digestive responses to increasing temperature in fishes: physiological implications of being small under climate change. *Marine Ecology*. doi: 10.1111/maec.12358.
- Diaz, F., Espina, S., and Bückle, L. F. (1994). Thermal stress responses of *Procambarus clarkii*. *Riv. Ital. Acquacol*, 29, 149-154.

- Díaz, F., Re, A. D., González, R. A., Sánchez, L. N., Leyva, G., and Valenzuela, F. (2007). Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*, 38(13), 1387-1394.
- Díaz, F., Salas, A., Re, A. D., Gonzalez, M., and Reyes, I. (2011). Thermal preference and tolerance of *Megastrea (Lithopoma) undosa* (Wood, 1828; Gastropoda: Turbinidae). *Journal of Thermal Biology*, 36(1), 34-37.
- Dietz, T. J., and Somero, G. N. (1992). The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus *Gillichthys*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), 3389-3393.
- Dietz, T. J., and Somero, G. N. (1993). Species- and tissue-specific synthesis patterns for heat-shock proteins HSP70 and HSP90 in several marine teleost fishes. *Physiological zoology*, 863-880.
- Dietz, T. J. (1994). Acclimation of the threshold induction temperatures for 70-kDa and 90-kDa heat shock proteins in the fish *Gillichthys mirabilis*. *Journal of Experimental Biology*, 188(1), 333-338.
- Eliason, E. J., Clark, T. D., Hague, M. J., Hanson, L. M., Gallagher, Z. S., Jeffries, K. M., Gale, M.K., Patterson, D.A., Hinch, S.G. and Farrell, A. P. (2011). Differences in thermal tolerance among sockeye salmon populations. *Science*, 332(6025), 109-112.
- Elliott, J. M., and Elliott, J. A. (2010). Temperature requirements of Atlantic salmon *Salmo salar*, brown trout *Salmo trutta* and Arctic charr *Salvelinus alpinus*: predicting the effects of climate change. *Journal of fish biology*, 77(8), 1793-1817.
- Elsas II, L.J. (2011) 212: Approach to Inborn Errors of Metabolism. En A.A. Goldman, L., and Schafer, A. I (Eds.), *Goldman's Cecil medicine*, 24th Edition Philadelphia, Pa: Saunders. Elsevier Health Sciences. 1340 pp.
- Eme, J., and Bennett, W. A. (2009). Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. *Journal of Thermal Biology*, 34(5), 220-225.
- Espina, S., and Vanegas, C. (2005). Ecofisiología y contaminación. . En A.A. Botello, A. V., Rendón- von Osten, J., Gold-Bouchot, G. y Agraz-Hernández, C. (Eds.), *Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, México, 53-78. **Pp. 696.**
- Fanjul, M. L. e Hiriart, M. (2008) *Biología funcional de los animales I. Una fisiología comparada metabólica y ambiental*. Siglo XXI editores. Buenos Aires, Argentina. Pp. 393.
- FAO 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura. Roma, 253 pp.

- Farrell, A. P., Hinch, S. G., Cooke, S. J., Patterson, D. A., Crossin, G. T., Lapointe, M., and Mathes, M. T. (2008). Pacific salmon in hot water: applying aerobic scope models and biotelemetry to predict the success of spawning migrations. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(6), 697-709.
- Farrell, A. P. (2016). Pragmatic perspective on aerobic scope: peaking, plummeting, pejus and apportioning. *Journal of fish biology*, 88(1), 322-343.
- Feder, M. E., and Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1), 243-282.
- Forster, M. E., Franklin, C. E., Taylor, H. H., and Davison, W. (1987). The aerobic scope of an Antarctic fish, *Pagothenia borchgrevinki* and its significance for metabolic cold adaptation. *Polar Biology*, 8(2), 155-159.
- Fry, F. E. J., Brett, J. R., and Clawson, G. H. (1942). Lethal limits of temperature for young goldfish. *Rev. can. biol*, 1, 50-56.
- Fry, F. E. J. (1947). Effects of the Environment on Animal Activity. Department of Zoology, Studies Biological Series, No. 55. Publications of Fisheries Research Laboratory, The University of Toronto Press. No. 68.
- Fry, F. J. (1967). Responses of vertebrate poikilotherms to temperature. *Thermobiology*. Academic Press, New York, 375-409.
- Fry, F. E. J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. *Fish physiology*, 6, 1-98.
- García-Ortega, A., Hernández, C., Abdo de la Parra, I., and González-Rodríguez, B. (2002, September). Advances in the nutrition and feeding of the bullseye puffer *Sphoeroides annulatus*. In *Proceedings of the VI International Symposium on Aquatic Nutrition* (pp. 187-196). Cancún, Quintana Roo, México.
- García-Ortega, A., and Lazo, J. P. (2004, November). Marine fish larviculture in Mexico: advances and challenges in nutrition and feeding. In *Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias de la VII Conferencia Internacional* (pp. 16-19). Hermosillo, Sonora, México
- García-Ortega, A. (2007). Estado actual de la investigación y producción de botete diana *Sphoeroides annulatus*. *Memorias del 3er Foro Internacional de Acuicultura*, 58-83. Hermosillo, Sonora, México
- García-Aguilar, N., Ibarra-Soto, A., Abdo de la Parra, M. I. Rodríguez-Ibarra, E. Y Velasco-Blanco, G. (2008) Creación de un banco de reproductores de botete Diana. Colección Resultados de Proyectos. Fundación Produce Sinaloa, A. C., Laboratorio de reproducción y producción de larvas de peces marinos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A. C., unidad Mazatlán.
- García-Ortega, A. (2009). Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper

(*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 69-80.

- Gupta, R. S., and Golding, G. B. (1993). Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between *archaebacteria*, *eubacteria*, and *eukaryotes*. *Journal of Molecular Evolution*, 37(6), 573-582.
- Hazel, J. R., and Prosser, C. L. (1974). Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiological reviews*, 54(3), 620-677.
- Heath, N. (1884). Effect of cold on fishes. *Bull. US Fish Comm.* (4), 369–371.
- Hill, R.W., Wyse, G.A. y Anderson, M. (2006) Fisiología Animal (Animal Physiology) Editorial Médica Panamericana S.A.; Traducción en español: 1 ed. Junio de 2006, pp. 820.
- Holt, R. E., and Jørgensen, C. (2015). Climate change in fish: effects of respiratory constraints on optimal life history and behaviour. *Biology letters*, 11(2), 20141032.
- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., and Vijayan, M. M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(1), 35-56.
- Jobling, M. (1981). Temperature tolerance and the final preferendum—rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *Journal of Fish Biology*, 19(4), 439-455.
- Jørgensen, C., Enberg, K., and Mangel, M. (2016). Modelling and interpreting fish bioenergetics: a role for behaviour, life-history traits and survival trade-offs. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 389-402.
- Kelley, P. M., and Schlesinger, M. J. (1978). The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell*, 15(4), 1277-1286.
- Kiang, J. G., and Tsokos, G. C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & therapeutics*, 80(2), 183-201.
- Killen, S. S., Glazier, D. S., Rezende, E. L., Clark, T. D., Atkinson, D., Willener, A. S., and Halsey, L. G. (2016). Ecological Influences and Morphological Correlates of Resting and Maximal Metabolic Rates across Teleost Fish Species. *The American Naturalist*, 187(5), 592-606.
- Kregel, K. C. (2002). Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of applied physiology*, 92(5), 2177-2186.
- Kültz, D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology*, 206(18), 3119-3124.

- Lemaux, P. G., Herendeen, S. L., Bloch, P. L., and Neidhardt, F. C. (1978). Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts. *Cell*, 13(3), 427-434.
- Lindquist, S., and Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), 631-677.
- Lutterschmidt, W. I., and Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1561-1574.
- Lutterschmidt, W. I., and Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1553-1560.
- McAlister, L., and Finkelstein, D. B. (1980). Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochemical and biophysical research communications*, 93(3), 819-824.
- McDonnell, L. H., and Chapman, L. J. (2016). Effects of thermal increase on aerobic capacity and swim performance in a tropical inland fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 199, 62-70.
- Metcalfe, N. B., Van Leeuwen, T. E., and Killen, S. S. (2016). Does individual variation in metabolic phenotype predict fish behaviour and performance?. *Journal of fish biology*, 88(1), 298-321.
- Miller, R.R., Minckley W.L. and Norris, S.M. (2005). *Freshwater fishes of Mexico*. University of Chicago press, Chicago and London. 490 p.
- Mitchell, H.K., Tissieres, A. and Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary-glands of *Drosophila melanogaster* ± relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84, 389-398.
- Mitchell, H.K., Tissi eres, A. and Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology*, 84(3), 389-398.
- Mitchell, H. K., and Petersen, N. S. (1982). Developmental abnormalities in *Drosophila* induced by heat shock. *Developmental genetics*, 3(2), 91-102.
- Morimoto, R.I., Tiss eres, A. and Georgopoulos, C. (1990). Stress Proteins in Biology and Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 166–190.
- Morimoto, R. I., and Santoro, M. G. (1998). Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotechnology*, 16(9), 833-838.
- Nagao, R. T., Kimpel, J. A., and Key, J. L. (1990). Molecular and cellular biology of the heat-shock response. *Advances in genetics*, 28, 235.
- National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington, D.C.: The National Academies Press.

- Nelson, J.S. (1984). *Fishes of the World* (Third edition). John Wiley and Sons: pp. 523
- Newell, R.C. (1978) Factors controlling metabolic capacity in marine invertebrates, p 111-127. In: Vernberg, F.J. (Ed). *Physiological Ecology of Marine Organisms*. The Belle W Baruch Library in Marine Science. No. 3 University of South Carolina Press. Columbia South Carolina.
- Norin, T., and Clark, T. D. (2016). Measurement and relevance of maximum metabolic rate in fishes. *Journal of fish biology*, 88(1), 122-151.
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, D., Sánchez, A., and Rosas, C. (2013). Thermopreference, tolerance and metabolic rate of early stages juvenile *Octopus maya* acclimated to different temperatures. *Journal of thermal biology*, 38(1), 14-19.
- Núñez-Vázquez, E. J., Yotsu-Yamashita, M., Sierra-Beltrán, A. P., Yasumoto, T., and Ochoa, J. L. (2000). Toxicities and distribution of tetrodotoxin in the tissues of puffer fish found in the coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Toxicon*, 38(5), 729-734.
- Núñez-Vázquez, E. J., García-Ortega, A., Campa-Córdova, A. I., de la Parra, I. A., Ibarra-Martínez, L., Heredia-Tapia, A., and Ochoa, J. L. (2012). Toxicity of cultured bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Marine drugs*, 10(2), 329-339.
- Ochoa, J. L., Núñez-Vázquez, E. J., García-Ortega, A., and Abdo de la Parra, M.I. (2006). Food safety: study about the toxicity of the cultivated bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns, 1843). *Panorama Acuícola Magazine*, 11(4), 22-27.
- Paladino, F. V., Spotila, J. R., Schubauer, J. P., and Kowalski, K. T. (1980). The critical thermal maximum: a technique used to evaluate physiological stress and adaptation in fishes. *Revue Canadienne de Biologie*, 9, 115-122.
- Payne, N.L., Smith, J.A., Meulen, D.E. van der, Taylor, M.D., Watanabe, Y.Y., Takahashi, A., Marzullo, T.A., Gray, C.G, Cadiou, G. and Suthers, I.M. (2015) Temperature dependence of fish performance in the wild: links with species biogeography and physiological thermal tolerance. *Functional Ecology*. British Ecological Society. Standard paper. DOI: 10.1111/1365-2435.12618
- Payne, N. L., Smith, J. A., Meulen, D. E., Taylor, M. D., Watanabe, Y. Y., Takahashi, A., and Suthers, I. M. (2016). Temperature dependence of fish performance in the wild: links with species biogeography and physiological thermal tolerance. *Functional Ecology*.
- Pearl, L. H., and Prodromou, C. (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Current opinion in structural biology*, 10(1), 46-51.
- Pérez-Robles, J. (2010). Análisis del efecto de la salinidad constante sobre el consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y la osmorregulación en botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). Tesis de Maestría en Ciencias, CICESE.

- Pérez-Robles, J., Re, A. D., Giffard-Mena, I., and Díaz, F. (2012). Interactive effects of salinity on oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and Na⁺/K⁺-ATPase expression in the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). *Aquaculture Research*, 43(9), 1372-1383.
- Pérez-Robles, J., Diaz, F., Denise Re, A., Giffard-Mena, I., Abdo-de la Parra, M. I., and Ibarra-Castro, L. (2015). Osmoregulation, growth, and survival during the larval development of bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842, Pisces: Tetraodontidae). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48(6), 397-415.
- Pérez-Robles, J., Diaz, F., Ibarra-Castro, L., Giffard-Mena, I., Re, A. D., Ibarra, L. E. R., and Soto, J. A. I. (2014). Effects of salinity on osmoregulation during the embryonic development of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus* Jenyns 1842). *Aquaculture Research*.
- Pörtner, H.O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88(4), 137-146.
- Pörtner, H. O., and Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315(5808), 95-97.
- Pörtner, H. O. (2012). Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Marine Ecology Progress Series*, 470, 273-290.
- Prosser, C. L. (1991). *Comparative animal physiology, environmental and metabolic animal physiology* (Vol. 1). John Wiley & Sons. Pub. New York.
- Raby, G. D., Casselman, M. T., Cooke, S. J., Hinch, S. G., Farrell, A. P., and Clark, T. D. (2016). Aerobic scope increases throughout an ecologically relevant temperature range in coho salmon. *Journal of Experimental Biology*, jeb-137166.
- Re-Araujo, A.D. (2004) Fisiología termorreguladora, osmorreguladora y energética en el camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) (Crustácea: Penaeidae). Tesis de Doctorado en Ciencias de la vida, CICESE.
- Reyes-Hernández, I. (2009) Temperatura preferida, termotolerancia y consumo de oxígeno en juveniles de botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). Tesis de Maestría en Ciencias, CICESE.
- Reyes, I., Díaz, F., Re, A. D., and Pérez, J. (2012). Behavioral thermoregulation, temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 36(3), 200-205.
- Roberts, D. A., Hofmann, G. E., and Somero, G. N. (1997). Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: acclimatization (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects. *The Biological Bulletin*, 192(2), 309-320.

- Robertson, D. R., and Allen, G. R. (2008). Shorefishes of the Tropical Eastern Pacific online information system. *Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa* (available at: www.stri.org/sfstep). Recuperado el 3 de septiembre de 2014 http://biogeodb.stri.si.edu/sfstep/taxon_option_main.php?book=o&lvl=S&id=671
- Robinson, M. B., Tidwell, J. L., Gould, T., Taylor, A. R., Newbern, J. M., Graves, J., and Milligan, C. E. (2005). Extracellular heat shock protein 70: a critical component for motoneuron survival. *The Journal of neuroscience*, 25(42), 9735-9745.
- Rosewarne, P. J., Wilson, J. M., and Svendsen, J. C. (2016). Measuring maximum and standard metabolic rates using intermittent-flow respirometry: a student laboratory investigation of aerobic metabolic scope and environmental hypoxia in aquatic breathers. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 265-283.
- Sandersfeld, T., Mark, F. C., and Knust, R. (2016). Temperature-dependent metabolism in Antarctic fish: Do habitat temperature conditions affect thermal tolerance ranges?. *Polar Biology*, 1-9.
- Sánchez-Cárdenas, R. (2007) Estrategia reproductiva de *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Tetraodontidae) en la costa de Mazatlán, Sinaloa, México. Tesis de maestría en Ciencias, CICIMAR-IPN.
- Sanders, B. M. (1993) Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical reviews in toxicology*, 23(1), 49-75.
- Schlesinger, M. J. (1990). Heat shock proteins. *J Biol Chem*, 265(21), 12111-12114.
- Schmidt-Nielsen, K. (2007) Animal physiology: Adaptation and environment. Cambridge University Press. Fifth edition. 7th printing. England
- Schurmann, H., and Steffensen, J. F. (1997). Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. *Journal of fish biology*, 50(6), 1166-1180.
- Selvakumar, S., and Geraldine, P. (2005). Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140(2), 209-215.
- Sokolova, I. M. (2013) Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, ict028.
- Svendsen, M. B. S., Bushnell, P. G., Christensen, E. A. F., and Steffensen, J. F. (2016). Sources of variation in oxygen consumption of aquatic animals demonstrated by simulated constant oxygen consumption and respirometers of different sizes. *Journal of Fish Biology*, 88(1), 51-64.
- Thomson, D. A.; Findley, L. T. Y Kerstitch, A. N. (2000). Reef Fishes of the Sea of Cortez.

The rocky- shore fishes of the Gulf of California. First University of Texas, Press edition, E. U. A.

- Tissi eres, A., Mitchell, H. K., and Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of molecular biology*, 84(3), 389-398.
- Tomanek, L., and Somero, G. N. (2002). Interspecific-and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): implications for regulation of hsp gene expression. *Journal of Experimental Biology*, 205(5), 677-685.
- Tytler, P. and Calow, P. (1985). *Fish Energetics: New Perspectives*. Baltimore, Md.: Johns Hopkins University Press, Springer Science pp. 349.
- UMDI (2014) Proyectos de Investigaci on, Red para el estudio de los efectos de la temperatura y el oxígeno disuelto en organismos marinos de importancia ecológica, pesquera y acuícola (TEMPOXMAR), 21 de Julio de 2014. Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigaci on, Facultad de Ciencias, UNAM, Sisal, Yucatán, México. 13 p.
- Vanegas, C. (1988) Preferéndum final de temperatura y tolerancia térmica del camarón café *Penaeus aztecus Ives*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias UNAM.
- Vanegas C., Espina, S. y Sánchez, A. (1990) Determinación de las respuestas fisiológicas y de comportamiento del camarón *Penaeus aztecus Ives*, a la temperatura. II Congreso de Ciencias del Mar. La Habana, Cuba. Junio 18-22 de 1990. Res. BM-163M.
- Verberk, W. C., Overgaard, J., Ern, R., Bayley, M., Wang, T., Boardman, L., and Terblanche, J. S. (2016). Does oxygen limit thermal tolerance in arthropods? A critical review of current evidence. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 192, 64-78.
- Lo, W. Y., Liu, K. F., Liao, I. C., and Song, Y. L. (2004). Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Cell stress & chaperones*, 9(4), 332-343.
- Welch, W.J. (1993) How cells respond to stress. *Scientific American*, 268(5), 56-56.
- Wiesepape, L. M., Aldrich, D. V., and Strawn, K. (1972). Effects of temperature and salinity on thermal death in postlarval brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Physiological Zoology*, 45(1), 22-33.
- Yamamori, T., Ito, K., Nakamura, Y., and Yura, T. (1978). Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *Journal of bacteriology*, 134(3), 1133-1140.

Young, J. C., Moarefi, I., and Hartl, F. U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *Journal of Cell Biology*, 154(2), 267-274.

Anexos

1. Tratamiento con formaldehído.

Durante el período de cuarentena los organismos presentaron signos de inapetencia, se pudo observar que dejaron de comer, y a los pocos días comenzaron a morir, la mortandad se incrementó progresivamente, de los 400 organismos con los que se contaba al iniciar el mantenimiento y aclimatación se perdieron alrededor de 100 organismos en tan solo 5 días, razón por la cual se solicitaron asesorías al Dr. Leonardo Ibarra del CIAD, quien nos recomendó aplicar un tratamiento con formaldehído, 0.17 ml/L, el primer tratamiento se dio al estanque 4 (E4) organismos que corresponden al lote 1, los cuales fueron los primeros en presentar los síntomas. En un estanque de aproximadamente 150 litros se agregaron 25.5 ml de formaldehído y se dejó actuar por una hora. La recomendación del investigador, fue que se les diera un baño con agua dulce durante 20 minutos, sin embargo nos pareció que el cambio de salinidad sería muy brusco y el tiempo muy prolongado, razón por lo cual solo se disminuyó la salinidad a 10.5 ppm, la cual corresponde a la isoosmótica. Se mantuvieron los peces en esa salinidad durante 30 minutos, para regresar a la salinidad de 35 ppm se conectó al sistema de agua oceánica, y recambio constante, se verificó la salinidad, hasta constatar que había regresado a la salinidad de agua de mar.

De los 50 peces que recibieron el tratamiento se pudo observar una gran mejoría (90% de los peces), así como una disminución notable en la cantidad de peces muertos, razón por la que se les dio el tratamiento al resto de los organismos.

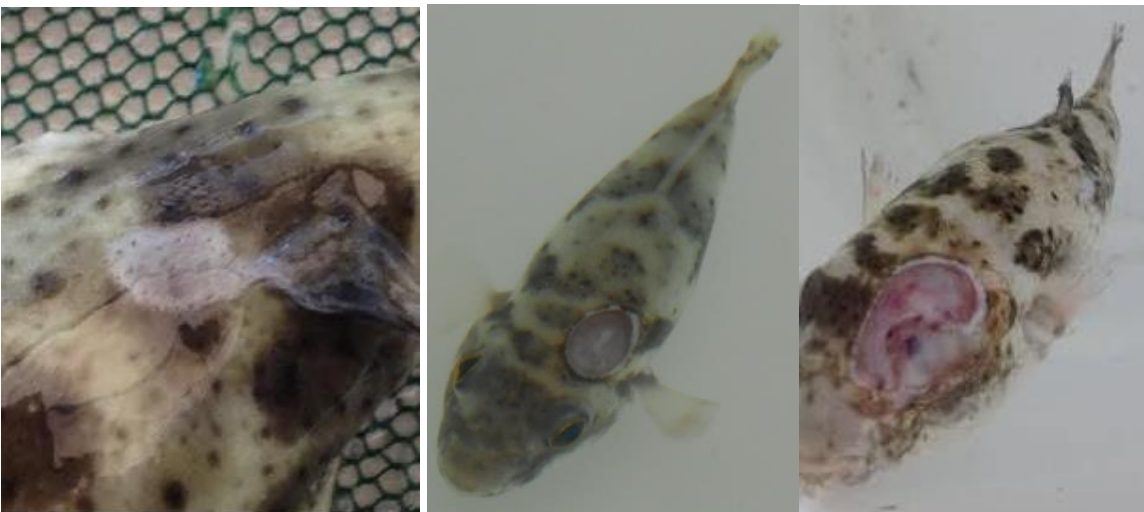


Figura 19. Avance de primer cuadro de infección y laceraciones.

Hubo un segunda ocasión de pérdida de organismos masiva, sin embargo no existía un cuadro de infección aparente o no presentaban los mismos signos del primer cuadro de infección, razón por lo cual se procedió a realizar un análisis de los tejidos de los organismos en los cuales se encontró una infestación por un parásito el cual aparentemente tapa las branquias y ocasiona la muerte de los organismos por asfixia.

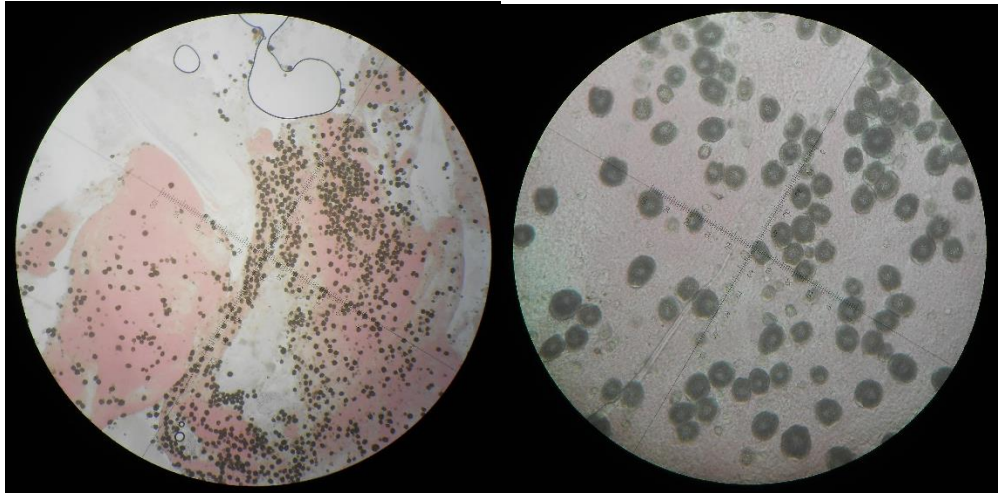


Figura 20. Frotis de branquia de *S. annulatus*, donde se muestra la infestación por *Amyloodinium ocellatum* (Colaboración de: Candy Armuelles Laboratorio de fisiopatología-CICESE).

2. Toma de muestra en branquias para evaluar la expresión de las proteínas de choque térmico (HSPs).

Se tomaron 15 muestras para cada organismo proveniente de las TA (20, 23, 26, 29 y 32 °C), dando un total de 75 muestras.

La toma de muestra fue a la par de los experimentos antes mencionados. Las cuales se dividieron de la siguiente manera: 5 peces corresponden a los expuestos a TCM_{max}, pero sin pasar por el estrés del respirómetro, otros 5 peces que pasaron por TCM_{max}, y también pasaron por el respirómetro y finalmente otros 5 organismos que corresponden al control, los cuales no fueron ni sometidos a TCM_{max}, ni entraron al respirómetro, estos solo se mantuvieron en los acuarios a la TA, durante 25 minutos, para proceder con la toma de muestras.

Una vez que los organismos pasaron por la fase experimental, inmediatamente eran introducidos en un recipiente con 1 litro de agua de mar (a la TA), a la cual se le adicionó anestésico (2-phenoxyethanol), para proceder a la toma de la branquia izquierda, esto se realizó con material esterilizado y pasado por un tren de agua oxigenada (H₂O₂), seguido de agua destilada (H₂O_d) y finalmente de agua destilada adicionada con DEPC (H₂O_d + Dietilpirocarbonato), este funciona para eliminar ribonucleasas.

Una vez que se tomó la muestra, ésta se pasaba a un portaobjetos también esterilizado y con ayuda de navajas nuevas y estériles se eliminaba la parte correspondiente al arco branquial, solo se recuperaban las lamelas branquiales, estas eran pesadas para obtener un peso aproximado a 50 mg de tejido, posterior a este paso era introducida inmediatamente a un tubo eppendorf con 500 µl de TRI Reagent®, y puesto inmediatamente en frío, una vez en frío este se homogenizaba con un pistilo previamente esterilizado y tratado con agua-DEPC. Todos los pasos realizados fueron con material esterilizado.

3. Metodología para extracción de RNA en *Spherooides annulatus*.

Primeramente se tomaron muestras de tejidos de botete diana (branquia y músculo) para evaluar la expresión de las proteínas de choque térmico (HSPs).

Se tomaron 15 muestras para cada organismo proveniente de las TA, dando un total de 75 muestras, las anteriores se dividieron como se muestra en la siguiente tabla (4).

Tabla 4. Distribución de organismos experimentales por TA y prueba realizada. 5 peces por prueba y temperatura.

Prueba/ TA	TCMáx	TCMáx y respirómetro	Control
20 ° C	20 °C TCMáx	20 °C TCMáx	20 °C TCMáx Control
23 ° C	23 °C TCMáx	23 °C TCMáx	23 °C TCMáx Control
26 ° C	26 °C TCMáx	26 °C TCMáx	26 °C TCMáx Control
29 ° C	29 °C TCMáx	29 °C TCMáx	29 °C TCMáx Control
32 ° C	32 °C TCMáx	32 °C TCMáx	32 °C TCMáx Control

Los organismos control no fueron sometidos a TCMáx ni entraron al respirómetro, sólo se mantuvieron en los acuarios a la TA durante 25 minutos y se procedió con la toma de muestras. Al tomar la muestra se pretendía obtener un peso aproximado a 50 mg de tejido, posterior a este paso se introducían inmediatamente a un tubo eppendorf con 500 µl de TRI Reagent®, y puestas inmediatamente en frío, una vez en frío se homogenizaba con un pistilo previamente esterilizado y tratado con agua-DEPC. Todos los pasos realizados fueron con material esterilizado, los pasos realizados fueron siempre en frío. La extracción de RNA se realizó con ayuda del reactivo TRI Reagent® (Sigma), se utilizó el protocolo recomendado por el proveedor con algunas modificaciones.

Las muestras obtenidas previamente con un peso de 50 mg de tejido (branquial y músculo), se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo el tejido se homogenizó en 500 µl del TRI Reagent®. Se procedió a centrifugar las muestras a una velocidad de 12,000 g durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (procurando eliminar grasas, en caso de que existieran en la superficie del sobrenadante).

Se dejaron las muestras durante 1 hora a -80 ° C. Después se dejaron a Temperatura Ambiente (TA) por 5 minutos.

En el protocolo original sugiere utilizar 500 µl de 1-bromo-3-cloropropano, sin embargo la

extracción no fue posible con este reactivo, por lo cual se procedió a utilizar 250 μ l cloroformo con sus debidas precauciones por cada 50 mg de tejido, se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Se dejó incubar durante 2 minutos a TA. Se realizó una centrifugación a: 12,000 g por 15 minutos a 4°C, con los anterior se obtuvieron 3 fases, observando el tubo Eppendorf (de 1.5 ml) de la parte posterior a inferior las fases corresponden a RNA-DNA-Proteína, respectivamente. Se transfirió sólo la fase acuosa a un tubo limpio, la cual corresponde a RNA. Fue necesario prestar especial cuidado en este paso para así evitar tocar cualquiera de las otras fases, ya que existía el riesgo de contaminar la muestra con ADN o proteína (se almacenaron los tubos a 4° C, los cuales contenían las fases restantes, esto en caso de desear aislar DNA y/o proteína).

Se añadieron 250 μ l de 2-propanol y se mezcló con cuidado. Se dejó incubando durante 5 minutos a TA. Después se realizó una centrifugación a: 12,000 g / 10 min/ 4°C y se removió el sobrenadante. Aquí se añadieron 500 μ l EtOH al 75 % y se da un pulso con vórtex para que se homogenizaran las muestras. Se ingresaron de nuevo a Centrifugar a: 7,500 g o 12,600 g / 5 min/ 4°C. En este paso es posible observar un pellet que se forma en la punta del tubo, por lo cual fue necesario eliminar el EtOH de manera cuidadosa para evitar perder el pellet, ya que corresponde al RNA, los tubos se dejaron boca abajo encima de un papel secante durante 5 min a TA, es muy importante que quede lo más seco posible. Para realizar la cuantificación de la cantidad de RNA concentrado en el pellet se disuelve la pastilla obtenida en 20 μ l en H₂O_{ppi} y se leyó en un NanoDrop a una Absorbancia de 260/280, posteriormente se realizó un gel de poliacrilamida para electroforesis. Lo anterior se realizó de acuerdo a lo que se muestra en la siguiente figura 21.

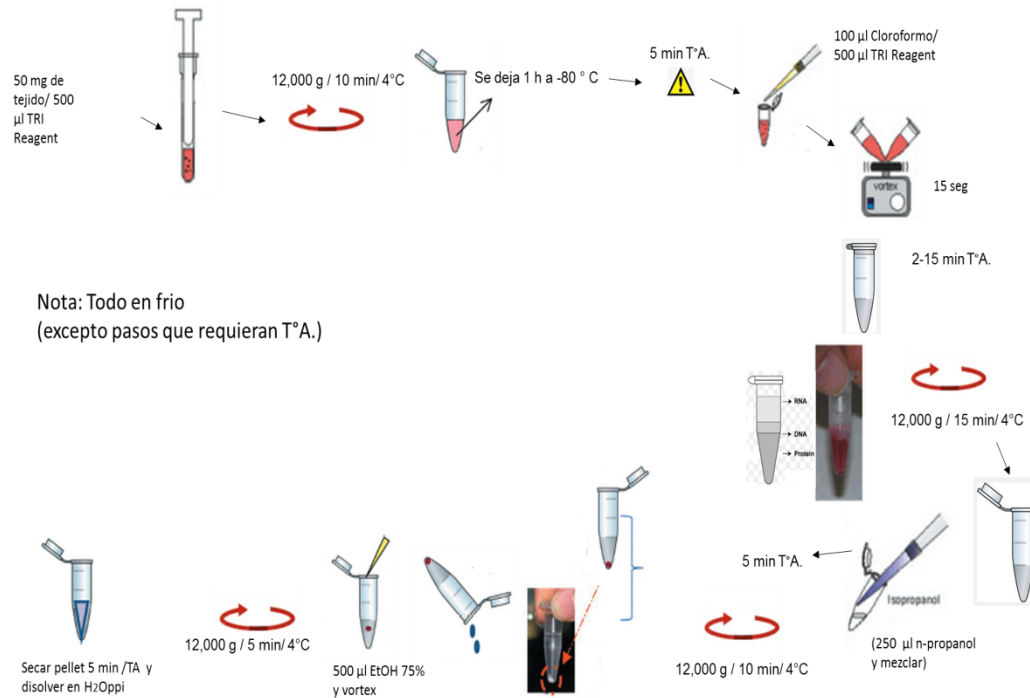


Figura 21. Metodología utilizada para extracción de RNA, realizado en tejido de *S. annulatus*.

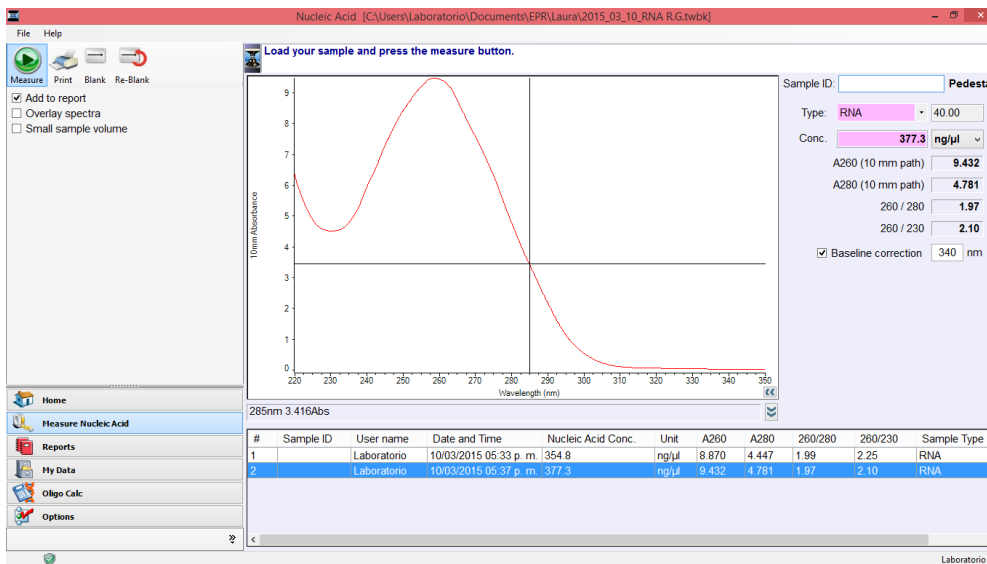


Figura 22. Ejemplo de una de las curvas obtenidas con ayuda del NanoDrop, la cual muestra la concentración de RNA en muestra de *S. annulatus*.

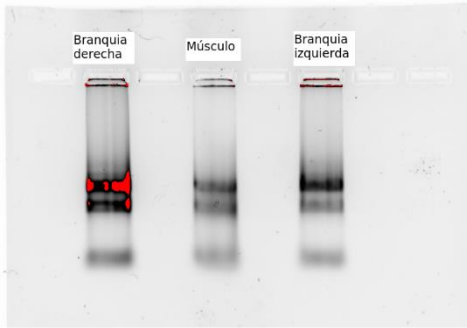
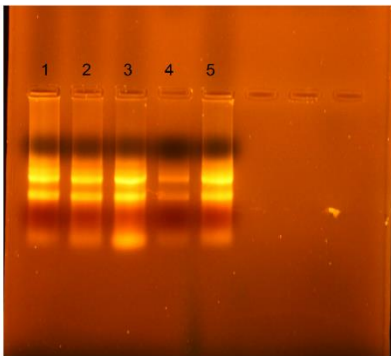


Figura 23. Resultado de la extracción de RNA de branquias de un organismo control, donde se observan las bandas correspondientes a RNAm.



Muestra (carril)	Clave
1	BI P1
2	BI P2
3	BI P3
4	BI P4
5	BI P5

Gel Electroforesis DNAsa 02/03/2015
 Tiempo de corrida: 5 min/ 50 mV + 35 min / 85 mV

Figura 24. Resultado después de recibir el tratamiento con DNAsa, donde se observan las bandas correspondientes a RNAm en branquias de *S. annulatus*. BI: Branquia izquierda, P: pez.

4. Diseño de Primers para *Sphoeroides annulatus* (cebadores).

Búsqueda informática de secuencias y diseño de primers (cebadores) degenerados.

Se realizó un rastreo de secuencias homólogas para genes Hsp70 y Hsp90, donde se incluyeron a organismos de todas las especies pero preferencialmente peces cercanos al organismo de estudio. La búsqueda se realizó ingresando al banco de genes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Se realizó la alineación de las secuencias obtenidas utilizando los programas Blast y Geneious (<http://www.geneious.com/>). Una vez realizados los alineamientos múltiples se identificaron las regiones más conservadas entre las secuencias. A partir de estas regiones se diseñaron los cebadores degenerados, con ayuda de los programas Vector NTI. Finalmente para ver la calidad de los primers diseñados se analizaron con el programa Oligo Analysis.

Seleccionando aquellos que reunieran las mejores características (Pérez, 2013).

1. Cada cebador debe contar con una longitud de entre 12 a 25 bases.
2. Se debe mantener un contenido de G: C (Guanina:Citosina) entre 45 y 55 %.
3. Los cebadores deben de tener temperatura de fusión — T_{m} de entre 50°C a 60°C y con una diferencia entre ambos de 5 °C como máximo.
4. La secuencia de los cebadores individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.
5. Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.
6. Evitar poli X.
7. Evitar nucleótidos degenerados en los extremos 5´.

Código IUPAC/IUB:

A: adenina R: A o G

C: citosina W: A o T

G: guanina S: C o G

T: timina en el ADN Y: C o T

U: uracilo en el ARN K: G o T

N: A o C o G o T H: A o C o T; no G

M: A o C B: C o G o T; no A

V: A o C o G; no T D: A o G o T; no C

5. Resultados de los primers obtenidos y enviados a sintetizar.

HSP90

Forward posición: 235-254 pb (pares de bases).

PFSaHSP90 5'-CAUCAACAACCUGGGCACC-3'

Reverse posición: 319-337 pb

5'CGGUCAGUUCGGAGUGGG-3'

Inverso complementario

PRSaHSP90 5'-CCCACTCCGAACTGACCG-3'

F&R 102 pb

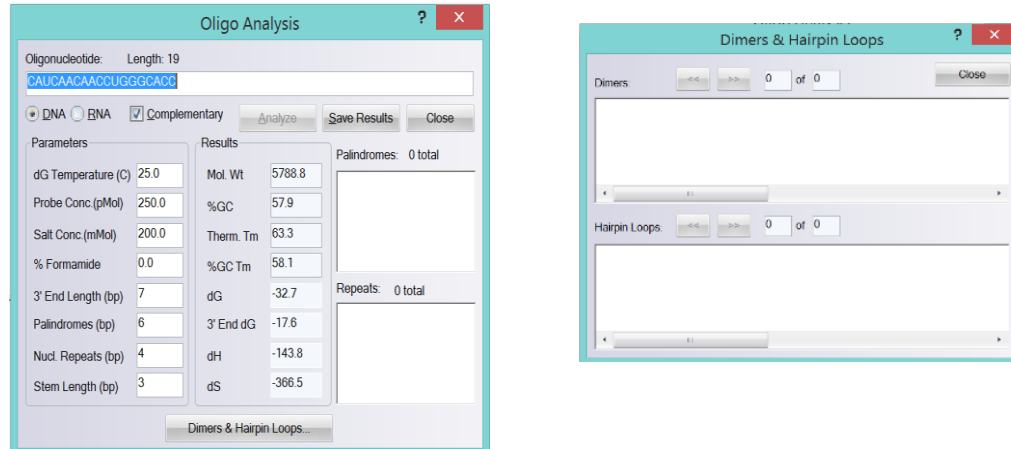


Figura 25. a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer PFSaHSP90.

R2 posición: 372-391 pb

CGGUCAUCACGAAGCACAAC

Inverso complementario

PR2SaHSP90 5'-GTTGTGCTTCGTGATGACCG-3'

F&R2 157 pb

HSP70

Posición: 1324-1346 = 17 pb (pares de bases).

Hsp70 SaF 5'-GGCACCACCTACTCCTG-3'

Hsp70 SaFD 5'-GGCACCACCTACTCCTGBGTTBGG-3'

B=T, G, C

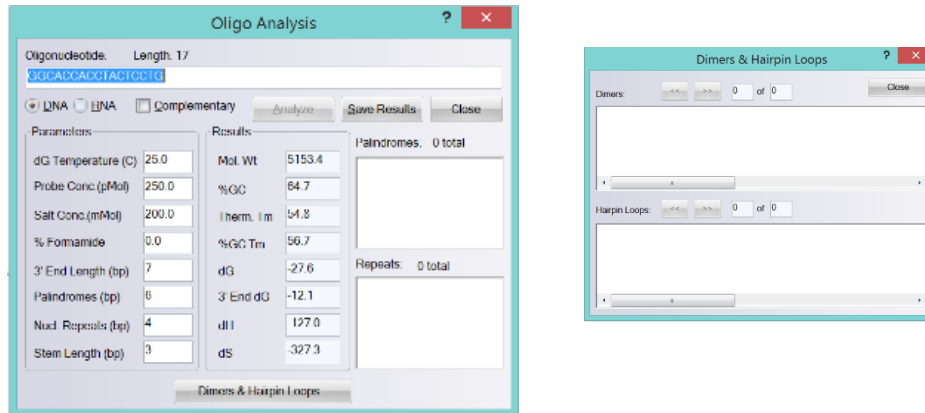


Figura 26. a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 SaF.

Posición: 1546-1562 = 17 pb

Reverse1 GACATGAAGCAYTGGYC

Inversa complementaria GRCCARTGCTTCATGTC

F1 & R1 238 pb

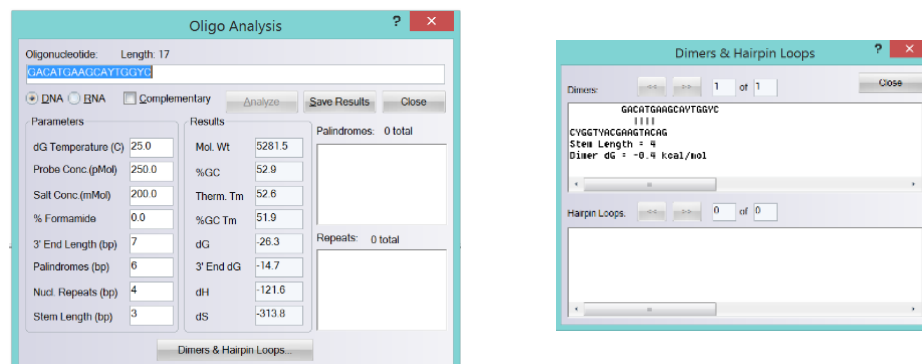


Figura 27. a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 Reverse1.

Posición: 1913-1930, 18 pb

Reverse2 CCATCCTGACVATYGANG

Inversa complementaria CNTCRATBGTCAGGATGG

F1 & R2 606 pb

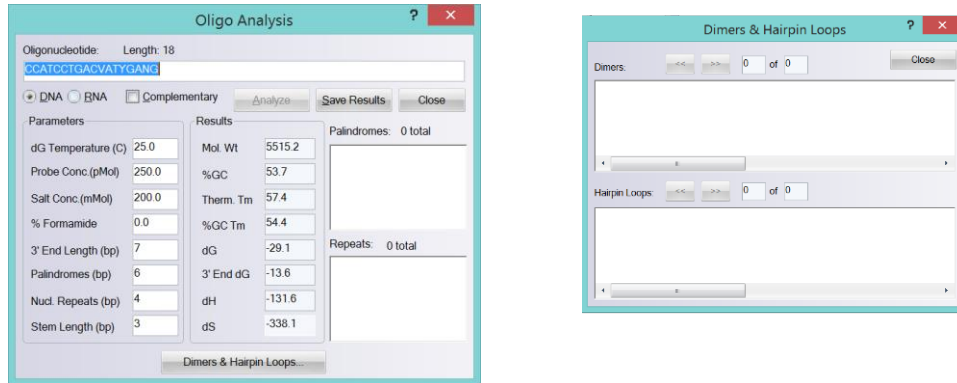


Figura 28. a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 Reverse2.

Posición: 2370-2386, 17 pb

Reverse3 CAARAGCATYAACCCNG

Inversa Complementaria CNGGGTTRATGCTYTTG

F1 & R3 1062 pb

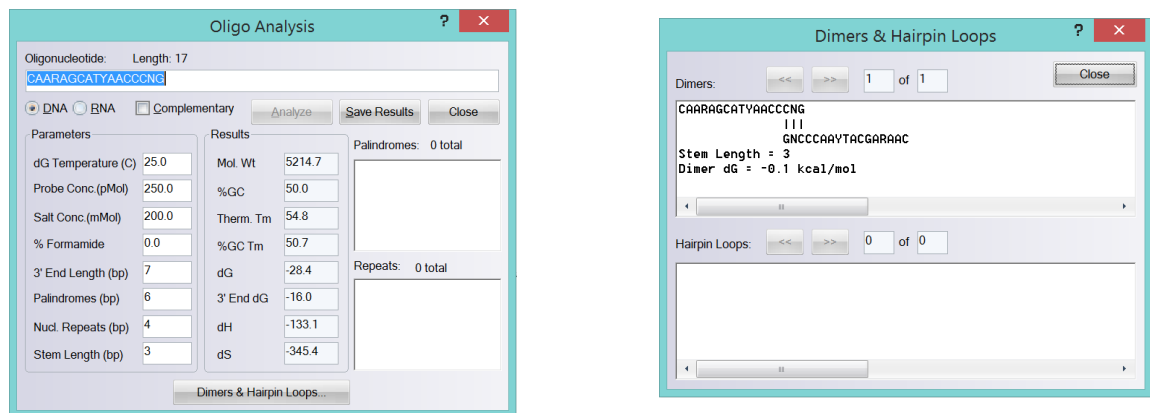


Figura 29. a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 Reverse3.

Posición: 2637-2653 = 17 pb

Reverse4 GACNARRGACAACAACC

Inv Compl GGTTGTTGTCYYTNGTC

F1 & R4 1329 pb

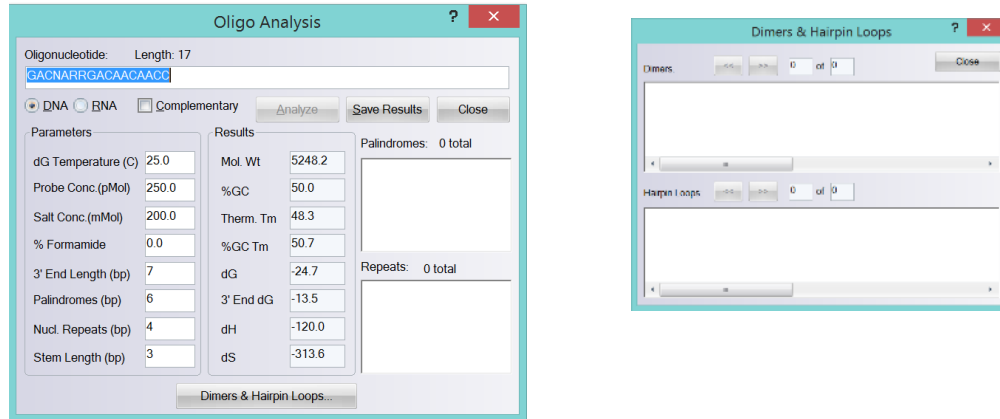


Figura 30. a) Oligo Analysis y b) Dimers & Hairpin Loops de primer Hsp70 Reverse4.

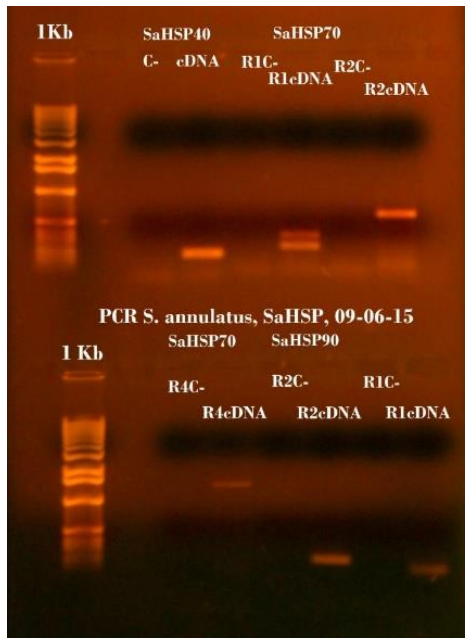


Figura 31. Resultados del PCR con los primers diseñados para HSPs en *S. annulatus*. (PCR y fotografía realizados por Maricela Cortez-García).